

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**AVALIAÇÃO ECOLÓGICA DE AMBIENTES COSTEIROS POR MEIO
DE BIOINDICADORES E BIOMARCADORES**

LAILA CARINE CAMPOS MEDEIROS

**VILA VELHA - ES
SETEMBRO 2016**

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**AVALIAÇÃO ECOLÓGICA DE AMBIENTES COSTEIROS POR MEIO
DE BIOINDICADORES E BIOMARCADORES**

Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutora em Ecologia de Ecossistemas.

LAILA CARINE CAMPOS MEDEIROS

**VILA VELHA - ES
SETEMBRO 2016**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M488a

Medeiros, Laila Carine Campos.

Avaliação ecológica de ambientes costeiros por meio de bioindicadores e biomarcadores / Laila Carine Campos Medeiros – 2015.

182 f.: il.

Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes

Tese (doutorado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2015.

Inclui bibliografias. bioindicadores e biomarcadores

1. Ecologia. 2. Poluição marinha. 3. Contaminação.
I. Chippari-Gomes, Adriana Regina, II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

LAILA CARINE CAMPOS MEDEIROS

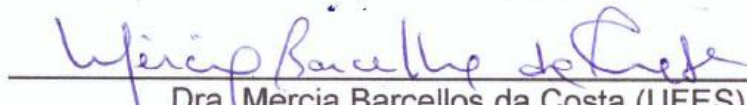
**AVALIAÇÃO ECOLÓGICA DE AMBIENTES COSTEIROS POR MEIO
DE BIOINDICADORES E BIOMARCADORES**

Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutora em Ecologia de Ecossistemas.

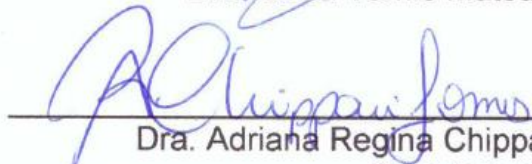
Aprovada em 27 de setembro de 2016,

Banca Examinadora:


Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez (UEL)


Dra. Mercia Barcellos da Costa (UFES)


Dra. Silvia Tamie Matsumoto (UFES)


Dra. Adriana Regina Chippari Gomes (UVV)
Orientadora

DEDICATÓRIA

Aos meus pais acadêmicos, Adriana Regina Chippari-Gomes e Levy de Carvalho Gomes, que apesar de tudo me conduziram com muito carinho, incentivo e apoio em todos os momentos de amadurecimento desta metamorfose científica. Até o enfim: Doutora.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Vila Velha, em especial a todo programa de Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas da Universidade Vila Velha (PPGEE-UVV), pela oportunidade de realização do Doutorado. E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) por disponibilizar o financiamento em mais este curso de minha formação.

À Orientadora, professora Dr^a. Adriana Regina Chippari-Gomes por ter aceitado mais uma vez me orientar. Muito obrigada por toda paciência, incentivo, exemplo profissional e, principalmente, por todo amor e carinho que apenas uma verdadeira mãe poderia fornecer por todos estes anos. Você transformou uma menina em uma “Bióloga”, depois em uma “Mestre” e agora em uma “Doutora”. Minha eterna gratidão.

Ao professor Dr. Levy de Carvalho Gomes, igualmente por toda orientação, exemplo profissional e, principalmente, por todo amor e carinho que apenas um verdadeiro pai poderia me dar. Ao lado da Dr^a. Adriana participou igualmente de toda minha transformação, guiando e balanceando os ingredientes para esta metamorfose.

Ao Dr. Paulo Dias Ferreira Júnior e aos demais professores da PPGEE por todo incentivo, apoio e exemplo profissional durante todo o meu amadurecimento e formação profissional.

À Dra Tatiana Heid Furley por ter disponibilizado seu laboratório na Aplysia Soluções Ambientais, com fornecimento de organismos para realização dos testes ecotoxicológicos que fizeram parte deste trabalho. E também por todo seu carinho, orientação e exemplo profissional.

À Dr^a. Larissa Novaes Simões pela incrível amizade, incansável apoio, inúmeras noites de conversas, zilhões de mensagens trocadas e acima de tudo pelo fantástico exemplo profissional. Mesmo de longe me mostrou, que apesar de todas as dificuldades, eu sou uma pessoa de sorte. E assim pude perceber que minha maior sorte é ter pessoas como você ao meu lado.

Ao querido Msc. Frederico Augusto C. Delunardo pela amizade, apoio incondicional, exemplo profissional e, principalmente, pela contribuição na elaboração do projeto que originou e financiou todo este trabalho. Desejo a você, meu querido, toda sorte e amor deste mundo.

Ao Luiz Augusto Altenburg G. Oliveira por transferir a ideia inicial deste projeto maravilhoso, orientando e guiando os primeiros passos.

Ao Vinicius Cavicchioli Azevedo pelo enorme carinho e atenção prestada desde minhas atividades no mestrado, e agora, apesar de estar tão longe, disponibilizou horas para conversas e conselhos motivadores na tentativa de identificar minhas faltas ao executar as análises propostas.

À Lara Medeiros, Alexandre Simões e Lucas Koscky pela enorme amizade e incrível apoio nas horas mais difíceis, que incluíram horas de trabalho noturno no laboratório após o expediente.

Ao meu incrível Urso, Gabriel Ferreira Pestana, pelo amor imensurável, pelo apoio incalculável e pela paciência infinita. Tive a sorte de contar com a ajuda do mais completo advogado, dominador de balanças analíticas e especialista em análises enzimáticas. Com certeza sem você esta conquista seria muito mais difícil. Se possível, você deveria receber este título junto comigo e seria, provavelmente, o primeiro advogado com doutorado em ecologia.

À Lucia Maria Coutinho Caldas, a quem tenho minha eterna admiração e gratidão. Desde os primeiros momentos me apoiando e fornecendo ovos para minha primeira caminhada científica. Obrigada pelas inúmeras conversas e conselhos. Obrigada por ser minha família por tanto tempo e, principalmente, por me ensinar a usar minhas asas, sinalizando a hora de partir, me permitindo vislumbrar novas perspectivas de felicidade.

Aos meus demais colegas do Laboratório de Ictiologia Aplicada, são inúmeros e por isso não vou citar mais nomes para não ocorrer de esquecer algum, pelo auxílio nas coletas árduas, pelo auxílio nas análises e pelas trocas de conhecimentos.

Aos colegas e técnicos do laboratório de Química da UVV, pela amizade, dedicação e competência que auxiliaram nas análises de metais junto ao Absorção Atômica.

À todos os meus familiares e demais amigos por todo apoio, atenção orações e conselhos.

À todos muito Obrigada!

“Contudo, se empunharmos a espada do extermínio à medida que avançarmos, não teremos direito de lamentar a devastação.”

CHARLES LYELL, *Principles of geology*
(1832)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1 Contaminação costeira	15
1.2 Contaminação por Metais	15
1.3 Biomonitoramento - Uso de bioindicadores e biomarcadores.....	16
1.4 Bioindicadores e biomarcadores focos deste estudo.....	18
1.4.1 Mexilhão Perna perna e seus biomarcadores	18
1.4.2 Ouriço do mar (<i>Echinometra lucunter</i>)	20
1.4.2 Copépodo bentônico <i>Nitokra</i> sp.	22
2. REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 2. Using ecotoxicological tests to assess the sediment quality of a tropical coastline: The case of Aracruz's coast, north of Espírito Santo, Brazil	
ABSTRACT.....	46
1. INTRODUCTION.....	47
2. MATERIAL AND METHODS.....	49
2.1. Study site	49
2.2. Sediment sampling	50
2.3. Physicochemical analysis of the sediments	51
2.4. Sediment toxicity.....	51
2.4.1. Solid-phase bioassays with <i>Nitokra</i> sp. (reproduction).....	51
2.4.2. Elutriates bioassays with <i>Echinometra lucunter</i>	52
2.5. Data analysis	53
3. RESULTS.....	54
4. DISCUSSION.....	62
5. CONCLUSION.....	66
6. REFERENCES.....	67
CAPÍTULO 3. Biomarcadores genotóxicos e bioquímicos em mexilhão (<i>Perna perna</i>), expostos à água coletada no litoral	
RESUMO.....	88
ABSTRACT.....	89
1. INTRODUÇÃO.....	90
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	92
2.1 Área de estudo	92
2.2 Coleta e armazenamento das amostras de água	93

2.3	Quantificação de metais e de arsênio na água	94
2.4	Ensaio com mexilhão <i>Perna perna</i>	94
2.4.1	Coleta e aclimatação.....	94
2.4.2	Cultura de mexilhões com água teste dos pontos de coleta.....	95
2.4.3	Coleta de material biológico	95
2.4.4	Bioacumulação de metais em <i>Perna perna</i>	95
2.4.5	Ensaio Cometa.....	96
2.4.6	Atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST) e quantificação de proteína.....	97
2.5	Análise estatísticas	98
3.	RESULTADOS.....	98
4.	DISCUSSÃO.....	107
5.	CONCLUSÃO.....	111
6.	REFERÊNCIAS.....	113
CAPÍTULO 4. Avaliação da contaminação por metais utilizando biomarcadores genotóxicos e enzimáticos em mexilhões (<i>Perna perna</i>) transplantados		
	RESUMO.....	135
	ABSTRACT.....	136
1.	INTRODUÇÃO.....	137
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	140
2.1.	Desenho amostral	140
2.2	Vistorias das estruturas de cultivo	142
2.3	Coleta e definição de parâmetros	142
2.3.1	Coleta de água.....	142
2.3.2.	Quantificação de metais e de arsênio na água.....	143
2.3.3	Coleta e análise de mexilhões	143
2.3.4	Bioacumulação de metais	144
2.3.5	Ensaio Cometa.....	144
2.3.6	Atividade enzimática da Glutathione S-transferase (GST) e quantificação de proteína.....	146
2.4	Análises estatísticas	146
3.	RESULTADOS.....	147
4.	DISCUSSÃO.....	153
5.	CONCLUSÃO.....	156
6.	REFERÊNCIAS.....	157
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	180

APRESENTAÇÃO

Esta tese é fruto de trabalho de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Ictiologia Aplicada – LABPEIXE, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (Fapes) e é requisito para conclusão do curso de Doutorado em Ecologia de Ecossistemas de Laila Carine Campos Medeiros, que teve como orientadora a professora Dr^a. Adriana Regina Chippari-Gomes, do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas de Universidade Vila Velha.

A hipótese que permeou este trabalho é de que a saúde do ambiente marinho e estuarino, determinada pelo uso de biomarcadores, é dependente das concentrações de metais presentes no ambiente. Com isso esta tese teve como objetivo biomonitorar regiões costeiras do Estado do Espírito Santo, utilizando organismos indicadores da qualidade da água e do sedimento, a fim de conhecer o impacto das perturbações ambientais já existentes, bem como o da implantação de novos empreendimentos. Contribuindo assim, com informações que auxiliem na gestão e preservação de ecossistemas costeiros do litoral do Espírito Santo. Os objetivos específicos foram: (1) Determinar a saúde ambiental do litoral de Aracruz-ES, por meio de testes de toxicidade crônica com ouriço do mar (*Echinometra lucunter*), expostos ao elutriado desta região. (2) Determinar a saúde ambiental do litoral de Aracruz-ES, por meio de testes de toxicidade crônica com o copépoda bentônico *Nitokra* sp. expostos ao sedimento marinho desta região. (3) Determinar a saúde ambiental do litoral de Aracruz-ES, por meio da avaliação de biomarcadores citopatológicos e enzimáticos em mexilhão *Perna perna*, expostos à água da região avaliada, e correlacionar os resultados encontrados com os níveis de metal tecidual quantificados. (4) Monitorar parâmetros físicos-químicos da água e do sedimento do litoral de Aracruz-ES. (5) Determinar a saúde ambiental da Baía de Vitória-ES, por meio da avaliação de biomarcadores citopatológicos e enzimáticos em mexilhão *Perna perna*, implantados na região, e correlacionar os resultados encontrados com os níveis de metal tecidual quantificados.

Com base nos objetivos propostos, a tese está estruturada em cinco capítulos. No primeiro capítulo é apresentada uma introdução geral com o intuito de fornecer um pouco mais de informações sobre contaminação costeira, com foco em

elementos metálicos e o uso de bioindicadores e biomarcadores em programas de biomonitoramento aquático, apresentando os organismos focos deste estudo: mexilhão (*Perna perna*), ouriço do mar (*Echinometra lucunter*) e copépodo bentônico (*Nitokra* sp.).

No capítulo dois os dados da pesquisa estão apresentados em forma de um artigo com o título “Using ecotoxicological tests to assess sediment quality in a tropical coastline: The case of Aracruz's coast, north of the Espírito Santo, Brazil”. O objetivo deste trabalho foi determinar a qualidade ambiental do litoral de Aracruz-ES, por meio de testes de toxicidade com duas espécies de invertebrados (*Nitokra* sp. e *Echinometra lucunter*) expostos ao sedimento marinho bruto e ao elutriado, respectivamente, aliados à análise de componente principal, para identificar as variáveis físico-químicas (TOM, TOC, TP, Fe, Cd, Pb, Cr, Mn, Ni and As) que melhor explicam as variações dos dados encontrados. Esse artigo foi submetido a revista Marine Pollution Bolletin e está em fase de análise.

O terceiro capítulo da tese teve como objetivo a qualidade ambiental do litoral de Aracruz-ES, por meio da avaliação de biomarcadores genotóxicos e bioquímicos em mexilhão, *Perna perna*, expostos à água da região avaliada, e correlacionar os resultados encontrados com os níveis de metal presentes na água e quantificados nos tecidos dos organismos expostos. Este capítulo recebeu o título de “Biomarcadores genotóxicos e bioquímicos em mexilhão (*Perna perna*), expostos à água coletada no litoral”.

O quarto capítulo teve como objetivo avaliar a aplicabilidade da abordagem de transplantação de organismos bivalves em um ambiente marinho costeiro antropicamente impactado, estabelecendo a relação da bioacumulação corporal de metais com biomarcadores de exposição: genotóxico e bioquímico. Este capítulo recebeu o nome de “Avaliação da contaminação por metais utilizando biomarcadores genotóxicos e enzimáticos em mexilhões (*Perna perna*) transplantados”.

Finalizando a tese, o quinto capítulo trata das considerações finais elaboradas com o intuito de resumir aos leitores as principais conclusões da tese.

RESUMO

MEDEIROS, L. C. C., D.Sc, Universidade Vila Velha – ES, setembro de 2016. **Avaliação ecológica de ambientes costeiros por meio de bioindicadores e biomarcadores.** Orientador: Adriana Regina Chippari-Gomes.

O ambiente litorâneo apresenta grande importância no desenvolvimento econômico e social, sendo habitat de inúmeros recursos biológicos marinhos. Por muito tempo foi o último destinatário dos poluentes produzidos por fontes naturais e antropogênicas tornando a acumulação e a persistência dos efluentes industriais uma ameaça para a vida. Muitos resíduos contêm elementos metálicos e apresentam grande potencial tóxico, dependendo de suas formas físico-químicas, capacidade de bioacumulação e translação por meio da cadeia trófica. Assim, o teor de metais é usado como parâmetro para definir a qualidade do ambiente em programas de monitoramento. Acredita-se que a saúde do ambiente marinho e estuarino, determinada pelo uso de biomarcadores, seja dependente das concentrações de metais presentes no ambiente. Com isso, esta tese teve como objetivo biomonitorar regiões costeiras do Espírito Santo, utilizando organismos indicadores da qualidade da água e sedimento, a fim de conhecer o impacto das perturbações ambientais existentes, bem como de novos empreendimentos. Trazendo informações que auxiliem na gestão e preservação de ecossistemas costeiros do litoral do Espírito Santo. Por meio de testes de toxicidade crônica e aguda com ouriço do mar (*Echinometra lucunter*), expostos ao elutriado, testes de toxicidade crônica com o copépoda bentônico *Nitokra* sp., expostos ao sedimento bruto bem como avaliação de biomarcadores citopatológicos e enzimáticos, assim como, quantificação de metal tecidual em mexilhão *Perna perna*, expostos à água superficial coletada, determinou-se a saúde ambiental do litoral de Aracruz-ES. E por meio da, avaliação de biomarcadores citopatológicos e enzimáticos, assim como, quantificação de metal tecidual em mexilhão *Perna perna*, implantados, determinou-se a saúde ambiental da Baía de Vitória-ES. Os resultados das regiões avaliadas mostram impactados pela presença de metais assim como pela presença de outros fatores que não foram mensurados neste estudo.

Palavras-Chave: Biomonitoramento, teste de toxicidade, bivalves, danos ao DNA.

ABSTRACT

MEDEIROS, L. C. C., D.Sc, University of Vila Velha – ES, september 2016.

Ecological assessment of coastal environments through bioindicators and biomarkers. Advisor: Adriana Regina Chippari-Gomes.

The coastal environment presents great importance in the economic and social development, being habitat of numerous marine biological resources. For a long time it was the last recipient of pollutants produced by natural and anthropogenic sources making the accumulation and persistence of industrial effluents a threat to life. Among the composition of many of the residues, the metallic elements may present great toxic potential, depending on their physicochemical forms and the ability to bioaccumulate and translate through the trophic chain. Thus, the metal content has been used as a parameter to define the quality of an environment in monitoring programs. It is believed that the health of the marine and estuarine environment, determined by the use of biomarkers, may be dependent on the concentrations of metals present in the environment. This thesis aimed at biomonitoring coastal regions of the State of *Espírito Santo*, using organisms that indicate water quality and sediment, in order to know the impact of existing environmental disturbances, as well as the implementation of new ventures. Thus contributing with information that helps in the management and preservation of coastal ecosystems of the coast of *Espírito Santo*. Chronic and acute toxicity tests with sea urchin (*Echinometra lucunter*), exposed to elutriate, chronic toxicity tests with benthic copepod *Nitokra* sp., exposed to crude sediment, and evaluation of cytopathological and enzymatic biomarkers, as well as, quantification of tissue metal in *Perna perna* mussel, exposed to surface water collected, the environmental health of the coast of Aracruz-ES was determined. The evaluation of cytopathological and enzymatic biomarkers, as well as quantification of tissue metal in *Perna perna* mussel, were carried out, and the environmental health of Vitória-ES Bay was determined. The results showed that the two regions were impacted by the presence of metals as well as the presence of other factors that were not measured in this study.

Keywords: Biomonitoring, toxicity testing, bivalves, DNA damage.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Contaminação costeira

Os ecossistemas litorâneos e costeiros são habitats de uma grande parte dos recursos biológicos marinhos, pois são áreas de criação, de refúgio permanente ou temporário de inúmeras espécies de peixes, crustáceos e moluscos capturados pela pesca industrial e artesanal (Diegues, 2001). O ambiente litorâneo apresenta múltiplos usos para o homem e grande importância no desenvolvimento econômico e social. Devido ao grande número de atividades desenvolvidas no litoral, os impactos provocados são quase sempre inevitáveis e, infelizmente, a contaminação de regiões costeiras por atividades antrópicas tem se intensificado (Pereira et al., 2007). De maneira geral, a introdução de contaminantes ocorre por diversas vias, tais como esgotos domésticos, barcos, rios, deposição atmosférica, agricultura e atividades de aquicultura intensiva em algumas regiões costeiras (Goldburg et al., 2001; Kennish, 1991). Desta forma, o ambiente aquático é o último destinatário dos poluentes produzidos por fontes naturais e antropogênicas tornando a acumulação e a persistência dos efluentes industriais uma ameaça para a vida (Çavaş e Ergene-Gözükara, 2005; Fleeger et al., 2003) trazendo riscos inclusive ao homem (Souza et al., 2003).

A compreensão da resposta do ecossistema a diferentes perturbações é essencial para apropriar o sistema de manejo em regiões costeiras (Lercari et al., 2002). Portanto, o entendimento da dinâmica funcional deste ecossistema litorâneo poderá servir de subsídio para a sua utilização a favor do uso sustentável dos recursos naturais, pois são importantes para o desenvolvimento, e para o estabelecimento de mecanismos e adoção de medidas para manutenção e gestão da biodiversidade.

1.2 Contaminação por Metais

Processos geoquímicos e de intemperismo promovem naturalmente a introdução de metais nos sistemas aquáticos, enquanto a contribuição atribuída à atividade humana é um reflexo da ampla utilização dos recursos naturais pela atividade industrial (Yabe e Oliveira, 1998). Desta forma, nas últimas décadas, o rápido desenvolvimento da indústria e da agricultura resultou em aumento da poluição de metais, o que é um risco ambiental significativo para diversos

organismos tais com invertebrados, peixes e inclusive os seres humanos (Uluturhan e Kucuksezgin, 2007).

Os elementos metálicos ao possuírem elevado número atômico e grande massa atômica, tornam-se não biodegradáveis, passando por um ciclo ecológico global (Niencheski et al., 2008). Alguns destes elementos em baixas concentrações nos ambientes hídricos são essenciais à vida, como o ferro e o cobre, participando de reações químicas do metabolismo celular. Desta forma, seu potencial tóxico é amplamente controlado por suas formas físico-químicas e capacidade de bioacumulação e translação por meio de da cadeia trófica nos ecossistemas aquáticos (Marques et al., 2009; Nadmitov et al., 2015; Sloman, 2007). No entanto, muitos outros elementos metálicos não são essenciais ao organismo e podem ser tóxicos mesmo em baixas concentrações, como o cádmio e chumbo (Niencheski et al., 2008).

Diversas pesquisas tem abordado a avaliação da poluição ambiental aquática por meio da quantificação de metais, objetivando determinar seus limites tolerantes e identificar possíveis fontes de poluição (Bubb e Lester, 1991; Ilnat et al., 1993). Assim, o teor de metais tem sido usado como parâmetro para definir o nível de contaminação de diferentes compartimentos ambientais, incluindo os ambientes aquáticos, tendo sido incorporado definitivamente na lista de parâmetros de investigação necessária para definir a qualidade de um ambiente em programas de monitoramento (Niencheski et al., 2008).

1.3 Biomonitoramento - Uso de bioindicadores e biomarcadores

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de monitorar o ambiente, principalmente, o ambiente marinho, uma vez que, esta área é frequentemente afetada por eventos antrópicos (Almeida, 2003; Hayase et al., 2009; Sáenz et al., 2010). Entretanto, o monitoramento e a avaliação dos riscos ambientais não podem ser baseados exclusivamente em análises químicas que identificam e quantificam as substâncias presentes na água ou no sedimento, como por exemplo os metais, pois não são apropriadas na indicação e predição dos efeitos deletérios causados por contaminantes na biota (Baršienė et al., 2006; Cajaraville et al., 2000) Por isso, os ensaios ecotoxicológicos devem ser considerados como uma análise indispensável no controle da poluição hídrica, pois se fundamentam na utilização de organismos

vivos diretamente afetados pelos desequilíbrios ocorridos eventualmente nos ecossistemas aquáticos onde vivem (Zagatto e Bertoletti, 2006). Estes estudos de monitoramento que envolvem organismos são denominados de biomonitoramento.

O principal objetivo na maioria destes estudos de biomonitoramento costeiro é detectar diferenças espaciais e/ou temporais nas respostas biológicas do organismo alvo (Fang et al., 2008), utilizados como bioindicadores, sendo os invertebrados os organismos aquáticos que têm sido preferencialmente utilizados na avaliação ambiental, pois constituem 95 % de todas as espécies de animais conhecidas (Barnes et al., 2009), e sua população é, geralmente, numerosa, de modo que as amostras podem ser coletadas para análise sem a ocorrência de alterações consideráveis na dinâmica populacional (Depledge e Fossi, 1994; Fossi et al., 2000). Estes ensaios são uma importante ferramenta na avaliação dos efeitos das substâncias químicas em diferentes organismos e populações, fornecendo subsídios para avaliar e proteger adequadamente a qualidade ambiental (Chapman et al., 2002).

Dessa forma, para avaliar os impactos dos poluentes no ambiente é pertinente que sejam mensurados os efeitos que essas substâncias causam nos organismos vivos desses ecossistemas (Wells et al., 2001). Neste contexto, um grupo apropriado de respostas biológicas, denominados marcadores biológicos ou biomarcadores, pode ser útil para determinar o grau de impacto na biota, além de identificar os estressores ou contaminantes responsáveis por esses efeitos (Fuentes-Rios et al., 2005). Esses testes monitoram as respostas dos organismos, nos diversos níveis da organização biológica, desde o nível molecular e celular até os níveis morfológicos, na avaliação da exposição e dos efeitos de diferentes contaminantes, tais como metais, xenobióticos orgânicos e compostos organometálicos (Ross et al., 2002).

Os biomarcadores podem ser sensíveis às mínimas concentrações dos compostos tóxicos presentes no ambiente, diagnosticando assim o status “de saúde” dos organismos, obtendo respostas iniciais de advertência a riscos ambientais (Payne, 1987). E dessa forma, os biomarcadores podem ser utilizados preventivamente, permitindo que sejam tomadas ações de biorremediação antes que ocorram danos ambientais irreversíveis com consequências ecológicas severas (Cajaraville et al., 2000). A utilização de diversos biomarcadores é mais vantajosa do

que o uso de um único biomarcador, pois o conjunto deles apresenta um sistema de alerta antecipado, eficaz no estudo de toxicidade de ambientes aquáticos (Dailianis et al., 2003).

1.4 Bioindicadores e biomarcadores focos deste estudo

1.4.1 Mexilhão *Perna perna* e seus biomarcadores

Muitos organismos bioindicadores são usados para demonstrar a exposição e os efeitos de contaminantes ambientais, pois as concentrações de substâncias tóxicas no ambiente, principalmente na água do mar, são extremamente baixas e consideravelmente diversificadas no espaço e no tempo, tornando assim suas identificações e quantificações mais dispendiosas (Pereira et al., 2007). Com isso, biomarcadores de bioacumulação podem ser aplicados, principalmente nos bivalves, a fim de elucidar o comportamento aquático de contaminantes ambientais, uma vez que, elementos traço de água do mar e sedimento marinho podem ser acumulados por estes invertebrados, por meio de sua capacidade de absorção e consequentemente de bioacumulação de substâncias químicas, presentes em níveis indetectáveis nas análises convencionais de água e sedimento (Zuykov et al., 2013).

Os bivalves são considerados bons organismos para biomonitoramento em ambientes aquáticos e por isso são utilizados em programas nacionais e internacionais de biomonitoramento ambiental (Bellotto et al., 2005; Semmler, 2007). Esses organismos apresentam uma ampla distribuição nos ambientes costeiros, além de serem abundantes, de fácil coleta, sésseis, e devido ao seu hábito alimentar filtrador, podem acumular grande número de bactérias, parasitos e metais (Leal e Franco, 2008; Santana et al., 2001). Os mexilhões filtram de 19 a 50 L de água por hora, com pouca ou nenhuma capacidade seletiva (Galvão, 2004), auxiliando a indicação de poluição de uma determinada área (Coimbra, 2003; Phillips, 1991). Sendo assim, o mexilhão *Perna perna* (Figura 1) é um excelente organismo candidato para o estabelecimento de programas de biomonitoramento em áreas tropicais por apresentar todas as características desejáveis para um bioindicador (Semmler, 2007).



Figura 1. Mexilhão da espécie *Perna perna* durante a medição.

A contaminação química dos organismos pode resultar em quebras em seu DNA, desta forma testes de genotoxicidade têm amplo potencial de biomonitoramento ambiental (Akcha et al., 2004). Elevados níveis de metais no ambiente marinho tem sido relacionados com um aumento de lesões oxidativas ao DNA de organismos marinhos (Rodríguez-Ariza et al., 1999; Torres et al., 2002). Com isso, quebras nas fitas de DNA têm sido um dos possíveis biomarcadores, amplamente utilizado, a serem avaliados em bivalves, graças ao desenvolvimento do ensaio cometa, uma técnica simples, rápida, sensível e eficaz em termos de custos para a medição deste tipo de lesões oxidativas. O ensaio cometa oferece vantagens consideráveis sobre outros métodos de citogenética para o dano ao DNA, como a detecção de aberrações cromossômicas, a permuta de cromátides irmãs (SCE) e o teste de micronúcleo (MN), porque requer um pequeno número de células que não precisam estar mitoticamente ativas, desta forma, qualquer célula nucleada pode ser utilizada (Pavlica et al., 2001).

Mas além do ensaio cometa, a avaliação enzimática também pode trazer grandes respostas na indicação de exposição do organismo a algum estresse ambiental (Livingstone, 2001; Pereira et al., 2007). Muitos compostos orgânicos são conhecidos como indutores da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Livingstone, 2001). Por isso, sistemas antioxidantes que ajudam a proteger os organismos contra uma condição de estresse oxidativo têm sido utilizados como indicadores de exposição a tais substâncias. O sistema antioxidante pode ser

ativado ou inibido sob estresse químico. Esta resposta depende da intensidade e da duração da perturbação que é aplicada ao organismo e também da sensibilidade das espécies avaliadas (Cossu et al., 2000). Ao passo que a ativação desse sistema antioxidante pode ser considerada como uma adaptação ao estresse ambiental para evitar a toxicidade, a inibição do sistema sugere uma fase posterior de estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da sensibilidade à exposição ao contaminante (Kono e Fridovich, 1982).

A glutathiona-S-transferase (GST) é um bom exemplo de antioxidante enzimático utilizado como biomarcadores de estresse oxidativo, que catalisa a conjugação da glutathiona com substratos eletrófilos (Modesto e Martinez, 2010), e é um importante mecanismo de detoxificação intracelular que estão presentes em quase todos os organismos (Papadopoulos et al., 2004).

A quantificação de metais em tecidos de bivalves como já foi dito é uma importante avaliação, mas não pode ser observada isoladamente, pois estudos mostram que as suas concentrações apresentam enorme variabilidade entre metais em todos os gêneros de invertebrados e até mesmo em níveis específicos (Rainbow, 2002). Por isso, é impossível determinar os níveis de contaminação de um ecossistema aquático diretamente, utilizando apenas dados de bioacumulação de metais em bivalves, porque eles são influenciados por uma série de fatores bióticos e abióticos (Zuykov et al., 2013). Além disso, devido a um efeito de depuração, o tempo de residência do poluente no organismo do animal pode ser mais curto do que o intervalo de tempo que separa os dois períodos de amostragem (Freitas et al., 2012). Porém, se somado a outros biomarcadores pode-se conseguir excelentes resultados.

1.4.2 Ouriço do mar (*Echinometra lucunter*)

Os ouriços do mar, de um modo geral, atuam na ciclagem de nutrientes do ambiente marinho, pois são herbívoros pastadores, e por se deslocarem com pouca frequência, podem refletir mudanças fisiológicas em condições ambientais alteradas (Chiu, 1988; Fliedner e Klein, 1996). Seus ovos e larvas apresentam fase planctônica, o que pode levá-lo a ter contato direto com diferentes poluentes dissolvidos no ambiente aquático (Falk-Petersen, 1979).

O ouriço do mar (*Echinometra lucunter*) (Figura 2) também, assim como o mexilhão (*Perna perna*), apresenta ampla distribuição geográfica, é abundante, de fácil manipulação e coleta. Mas uma característica primordial o torna um excelente candidato para o estabelecimento de programas de biomonitoramento: a facilidade de obtenção de seus gametas e consequente facilidade de realizar fecundações *in vitro* (Bonfim, 2005). Com isso, a fase embrionária e larval de ouriços do mar têm sido utilizadas em testes de toxicidade para avaliar a qualidade do ambiente marinho (Mastroti, 2002), devido à sua sensibilidade (comparado à outra fase do ciclo de vida) a diferentes substâncias e à rapidez dos resultados de exposição obtidos (Cruz, 2001).



Figura 2. Ouriços do mar da espécie *Echinometra lucunter*, utilizados nos testes de ecotoxicidade.

A maioria dos protocolos de execução de testes de toxicidade de Órgãos de Controle Internacional (ASTM, 2012; ENVIRONMENT CANADÁ, 1999, 1995, 1990; USEPA, 1991) utilizam gametas e embriões de ouriço de espécies que não são originárias do Brasil, por isso, buscando uma adaptação para as espécies locais a (CETESB, 1992, 1990) foi a pioneira no desenvolvimento de um protocolo de testes de toxicidade com uma espécie encontrada no Brasil, a *Lytechinus variegatus*. E posteriormente, o Órgão Oficial de Normatização do Governo Brasileiro (ABNT), publicou uma Norma Técnica com *L. variegatus* e *E. lucunter*, visando a padronização oficial do procedimento de desenvolvimento dos testes de toxicidade

com este grupo (ABNT, 2006). Desta forma, o objetivo dos bioensaios ecotoxicológicos com ouriços do mar é detectar se ocorre uma inibição significativa no objeto biológico (fecundação ou desenvolvimento), que se supõe ser devida à presença de substâncias tóxicas antropogênicas (Saco-Álvarez et al., 2010).

1.4.2 Copéodo bentônico *Nitokra* sp.

O copéodo bentônico estuarino *Nitokra* sp. (Figura 3), apresenta um tamanho entre 0,5 e 0,7 mm, se adapta a uma ampla gama de salinidades e temperaturas e com isso tem uma ampla distribuição mundial. Além disso, vivem entre os grãos de sedimento areno-lodosos atingindo grandes densidades representando uma importante parte da cadeia alimentar marinha, como consumidores de microalgas, de bactérias e de detritos, interligando o elo de transferência de energia e contaminantes no meio ambiente marinho, disponibilizando os compostos associados ao sedimento para outros níveis tróficos (Hicks and Coull, 1983; Montagna, 1995). Todas essas características o torna um organismo extremamente atrativo para ser utilizado como organismo-teste na avaliação da toxicidade de amostras líquidas e de sedimento (Chandler et al., 2004).



Figura 3. Copéodo bentônico estuarino (*Nitokra* sp.), corados com rosa de bengala, em diversas fases de vida: estágio de náuplio, estágio de copepodito, adulto e fêmea ovada.

Os copéodos são conhecidos por serem especialmente sensíveis a diferentes xenobióticos, sendo assim, utilizados como grupo alvo de ensaios

ecotoxicológicos para proteção de ameaças ambientais (Hagopian-Schlekat et al., 2001; Kusk e Petersen, 1997; Raisuddin et al., 2007). Para Bejarano et al. (2006) estes organismos, na presença de pequenas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), demonstram grande sensibilidade, ocorrendo uma redução no sucesso de eclosão dos ovos, que inibe o recrutamento de náuplios, e consequentemente indivíduos adultos, resultando em danos para a comunidade zoobentônica. Vale ressaltar também que o ciclo de vida do *Nitokra* sp. é de 3-4 semanas, o que torna estes organismos altamente adequados para a realização de testes de ciclo de vida curto e que está listado para ser normatizado pela Comissão Especial de Análises Ecotoxicológicas da ABNT (ABNT/CEE-106).

2. REFERÊNCIAS

- Ablanedo, N., González, H., Ramirez, M., Torres, I., 1990. Evaluación del erizo de mar *Echinometra lucunter* como indicador de la contaminación por metales pesados. *Aquat. Living Resour.* 3, 113–120. doi:10.1051/alr
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2006. Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata - Echinoidea) - ABNT NBR 15350.
- ABNT NBR 15350 - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2012. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata; Echinoidea);
- ABNT NBR 15469 - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2015. Ecotoxicologia - Coleta, preservação e preparo de amostras.
- Ahtiainen, J., Nakari, T., Silvonen, J., 1996. Toxicity of TCF and ECF pulp bleaching effluents assessed by biological toxicity tests., in: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Florida, pp. 33–40.
- Akcha, F., Tanguy, a., Leday, G., Pelluhet, L., Budzinski, H., Chiffolleau, J.F., 2004. Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast. *Mar. Environ. Res.* 58, 753–756. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.090
- Ali, M., Sreekrishnan, T., 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Adv. Environ. Res.* 5, 175–196. doi:10.1016/S1093-0191(00)00055-1
- Allen, H., 1971. Effects of petroleum fractions on the early development of a sea urchin. *Mar. Pollut. Bull.* 2, 138–140. doi:10.1016/0025-326X(71)90034-8
- Almeida, E.A. de, 2003. Avaliação de variações bioquímicas em moluscos bivalves em resposta ao estresse ambiental.
- Aloupi, M., Angelidis, M., 2001. Geochemistry of natural and anthropogenic metals in the coastal sediments of the island of Lesbos, Aegean Sea. *Environ. Pollut.* 113, 211–219. doi:10.1016/S0269-7491(00)00173-1
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bairy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., Carrião Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Eliza Ronsein, G., Alexandre Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Maria Gracioso Martins, A., Helena Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146, 588–600. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.040
- Anderson, B., Hunt, J., Phillips, B., Thompson, B., Lowe, S., Taberski, K., Scott Carr, R., 2007. Patterns and trends in sediment toxicity in the San Francisco Estuary. *Environ. Res.* 105, 145–155. doi:10.1016/j.envres.2006.07.005
- Andrade, V.M., de Freitas, T.R.O., da Silva, J., 2004. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 560, 57–67. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.02.006

- Andral, B., Galgani, F., Tomasino, C., Bouchoucha, M., Blottiere, C., Scarpato, A., Benedicto, J., Deudero, S., Calvo, M., Cento, A., Benbrahim, S., Boulahdid, M., Sammari, C., 2011. Chemical Contamination Baseline in the Western Basin of the Mediterranean Sea Based on Transplanted Mussels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 261–271. doi:10.1007/s00244-010-9599-x
- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 704–712. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.05.008
- APHA - American Public Health Association, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. Washington.
- ASTM - American Society for Testing and Materials, 2012. *Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos*.
- Atli, G., Canli, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 145, 282–7. doi:10.1016/j.cbpc.2006.12.012
- Ausili, A., Mecozzi, M., Gabellini, M., Ciuffa, G., Mellara, F., 1998. Phisico-chemical characteristics and multivariate analysis of contaminated harbour sediments. *Water Sci. Technol.* 37, 131–139.
- Azqueta, A., Collins, A.R., 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* 87, 949–68. doi:10.1007/s00204-013-1070-0
- Baig, S., Liechti, P.A., 2001. Ozone treatment for biorefractory COD removal. *Water Sci. Technol.* 43, 197–204.
- Bainy, A.C.D., Almeida, E.A., Müller, I.C., Ventura, E.C., Medeiros, I.D., 2000. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar. Environ. Res.* 50, 411–416. doi:10.1016/S0141-1136(00)00039-8
- Barbosa, J.S., Cabral, T.M., Ferreira, D.N., Agnez-Lima, L.F., Batistuzzo de Medeiros, S.R., 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 320–325. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.10.008
- Barnes, R.D., 2006. *Zoologia dos invertebrados*. Roca.
- Barnes, R.S.K., Calow, P.P., Olive, P.J.W., Golding, D.W., Spicer, J.I., 2009. *The Invertebrates: A Synthesis*. Wiley-Blackwell.
- Barra, C.M., Santelli, R.E., Abrão, J.J., 2000. Especificação de Arsênio -Uma Revisão. *Quim. Nova* 23, 58–70.
- Baršienė, J., Lehtonen, K.K., Koehler, A., Broeg, K., Vuorinen, P.J., Lang, T., Pempkowiak, J., Šyvokienė, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Repečka, R., Vuontisjärvi, H., Kopecka, J., 2006. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipėda-Būtingė area (Baltic Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 53, 422–436. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.03.009
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.R.,

- Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., Widdows, J., 1985. The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals. Praeger, New York.
- Bejarano, A.C., Chandler, G.T., He, L., Coull, B.C., 2006. Individual to population level effects of South Louisiana crude oil water accommodated hydrocarbon fraction (WAF) on a marine meiobenthic copepod. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 332, 49–59. doi:10.1016/j.jembe.2005.11.006
- Belabed, B.-E., Laffray, X., Dhib, A., Fertouna-Belakhal, M., Turki, S., Aleya, L., 2013. Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria), *Marine Pollution Bulletin*. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.06.004
- Belivermis, M., Kiliç, O., Çotuk, Y., 2016. Assessment of metal concentrations in indigenous and caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*) on entire Turkish coastline. *Chemosphere* 144, 1980–1987. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.098
- Bellotto, V.R., De Brito, P.C., Manzoni, G., Wegner, E., 2005. Biomonitoramento ativo de metais traço e efeito biológico em mexilhões transplantados para área de influência de efluente de indústria de beneficiamento de aço - Fase I. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.* 9, 33. doi:10.14210/bjast.v9n2.p33-37
- Bend, J.R., James, M.O., 1978. No Title Xenobiotic metabolism in marine freshwater species, in: Malins, D.C., Sargent, J.. (Eds.), *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, London, England, pp. 125–188.
- Bianchi, J., Espindola, E.L.G., Marin-Morales, M.A., 2011. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 826–833. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.11.006
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.* 463, 33–51. doi:10.1016/S1383-5742(00)00004-1
- Blackmore, G., Wang, W.-X., 2003. Comparison of metal accumulation in mussels at different local and global scales. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 388–395. doi:10.1002/etc.5620220221
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913–21. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.049
- Bolam, S.G., 2014. Macrofaunal recovery following the intertidal recharge of dredged material: A comparison of structural and functional approaches. *Mar. Environ. Res.* 97, 15–29. doi:10.1016/j.marenvres.2014.01.008
- Bonfim, C.L.L., 2005. Efeitos do fenol e 4-clorofenol sobre o desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758): avaliação dessas substâncias como referência. Universidade Federal da Bahia.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. *Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture*. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brooks, R., Rumsby, M., 1967. Studies on the uptake of cadmium by the oyster, *Ostrea sinuata* (Lamarck). *Mar. Freshw. Res.* 18, 53. doi:10.1071/MF9670053
- Brooks, S.J., Harman, C., Grung, M., Farmen, E., Ruus, A., Vingen, S., Godal, B.F., Baršienė, J., Andreikėnaitė, L., Skarphéðinsdóttir, H., Liewenborg, B., Sundt, R.C., 2011. Water Column Monitoring of the Biological Effects of Produced Water from the Ekofisk Offshore Oil Installation from 2006 to 2009. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 74, 582–604. doi:10.1080/15287394.2011.550566
- Brown, K.R., McPherson, R.G., 1992. Concentrations of copper, zinc and lead in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) from the Georges River, New South Wales. *Sci. Total Environ.* 126, 27–33.
- Bubb, J.M., Lester, J.N., 1991. An Honour Volume For Eric I. Hamilton The impact of heavy metals on lowland rivers and the implications for man and the environment. *Sci. Total Environ.* 100, 207–233. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(91)90379-S
- Burgeot, T., Woll, S., Galgani, F., 1996. Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French coasts. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 39–46. doi:10.1016/0025-326X(96)89526-9
- Burton, E.D., Phillips, I.R., Hawker, D.W., 2005. Trace metal distribution and enrichment in benthic, estuarine sediments: Southport Broadwater, Australia. *Environ. Geochem. Health* 27, 369–83. doi:10.1007/s10653-004-7086-x
- Buruaem, L.M., Hortellani, M.A., Sarkis, J.E., Costa-Lotufo, L. V, Abessa, D.M.S., 2012. Contamination of port zone sediments by metals from Large Marine Ecosystems of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 479–88. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.017
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4
- Cajaraville, M.P., Olabarrieta, I., Marigomez, I., 1996. In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 253–60. doi:10.1006/eesa.1996.0108
- Canova, S., Degan, P., Peters, L., Livingstone, D., Voltan, R., Venier, P., 1998. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 399, 17–30. doi:10.1016/S0027-5107(97)00263-7
- Carletti, E., Sulpizio, M., Bucciarelli, T., Del Boccio, P., Federici, L., Di Ilio, C., 2008. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. *Aquat. Toxicol.* 90, 48–57. doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.015
- Castro, H., Aguilera, P.A., Martinez Vidal, J.L., Carrique, E.L., 1999. Differentiation of Clams from Fishing Areas as an Approximation to Coastal Quality Assessment.

Environ. Monit. Assess. 54, 229–237. doi:10.1023/A:1005960212211

- Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001
- Cesar, A., Choueri, R.B., Riba, I., Morales-Caselles, C., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Abessa, D.M.S., DelValls, T.A., 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. doi:10.1016/j.envint.2006.11.007
- Cesar, A., Lia, L.R.B., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cortez, F.S., Choueri, R.B., Orte, M.R. De, Rachid, B.R.F., 2014. Science of the Total Environment Environmental assessment of dredged sediment in the major Latin American seaport (Santos , São Paulo — Brazil): An integrated approach. *Sci. Total Environ.* 497–498, 679–687. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.037
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1999. Metodo de Ensaio: Agua do Mar-teste de Toxicidade Cronica de Curta Duracao com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). Cia. De Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de Sao Paulo, São Paulo.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1992. Água do Mar – teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea) Norma Técnica L5.250.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1990. Projeto: Desenvolvimento de implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos.
- Chaillou, G., Schäfer, J., Anschutz, P., Lavaux, G., Blanc, G., 2003. The behaviour of arsenic in muddy sediments of the Bay of Biscay (France). *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2993–3003. doi:10.1016/S0016-7037(03)00204-7
- Chan, H.M., 1989. Temporal and spatial fluctuations in trace metal concentrations in transplanted mussels in Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.* 20, 82–86. doi:10.1016/0025-326X(89)90231-2
- Chan, H.M., 1988. Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. *Mar. Ecol.* 48, 295–303.
- Chandler, T.G., Cary, T.L., Volz, D.C., Walse, S.S., Ferry, J.L., Klosterhaus, S.L., 2004. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 117. doi:10.1897/03-124
- Chapman, P.M., McDonald, B.G., Lawrence, G.S., 2002. Weight-of-Evidence Issues and Frameworks for Sediment Quality (And Other) Assessments. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 8, 1489–1515. doi:10.1080/20028091057457
- Chase, M.E., Jones, S.H., Hennigar, P., Sowles, J., Harding, G.C.H., Freeman, K., Wells, P.G., Krahforst, C., Coombs, K., Crawford, R., Pederson, J., Taylor, D., 2001. Gulfwatch: Monitoring spatial and temporal patterns of trace metal and organic contaminants in the Gulf of Maine (1991-1997) with the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 490–504. doi:10.1016/S0025-

326X(00)00193-4

- Cheng, T.C., 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266, 343–79.
- Cheung, C.C., Zheng, G., Lam, P.K., Richardson, B., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 181–191. doi:10.1016/S0025-326X(01)00301-0
- Cheung, C.C., Zheng, G., Li, A.M., Richardson, B., Lam, P.K., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 52, 189–203. doi:10.1016/S0166-445X(00)00145-4
- Chiu, S.T., 1988. *Anthocidaris crassispira* (Echinodermata: chinoidea) grazing epibenthic macroalgae in Hong Kong. *Asian Mar. Biol.* 5, 123–132.
- Choueri, R.B., Cesar, A., Abessa, D.M.S., Torres, R.J., Morais, R.D., Riba, I., Pereira, C.D.S., Nascimento, M.R.L., Mozeto, A.A., DelValls, T.A., 2009. Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South Atlantic littoral zones: Comparison against national and international sediment quality benchmarks. *J. Hazard. Mater.* 170, 320–331. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.093
- Coimbra, A.G., 2003. Distribuição de metais pesados em moluscos e sedimentos nos manguezais de Coroa Grande e da Enseada das Garças, Baía de Sepetiba, RJ. Universidade Federal Fluminense.
- Collins, A.R., Ai-guo, M., Duthie, S.J., 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res. Repair* 336, 69–77. doi:10.1016/0921-8777(94)00043-6
- CONAMA, C.N.D.M.A., 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispões sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências., Diário Oficial da União.
- Conners, D.E., Black, M.C., 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 362–71.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 106–21. doi:10.1006/eesa.1999.1842
- Cruz, A.C., 2001. Seleção de substâncias orgânicas como referência em testes de toxicidade com embriões de ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1928): Controle da qualidade analítica de testes ecotoxicológicos. Universidade Federal da Bahia.
- D'Silva, C., Kureishy, T.W., 1978. Experimental studies on the accumulation of copper and zinc in the green mussel. *Mar. Pollut. Bull.* 9, 187–190.

- Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. 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. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(03\)00005-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00005-9)
- DelValls, T.A., Forja, J.M., Gómez-Parra, A., 1998. The use of multivariate analysis to link sediment contamination and toxicity data to establish sediment quality guidelines: An example in the Gulf of Cádiz (SW, Spain). *Ciencias Mar.* 24, 127–154.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161–72. doi:[10.1007/BF00117081](https://doi.org/10.1007/BF00117081)
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 5–32. doi:[10.1007/s10565-008-9072-z](https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z)
- Díaz, A., Carro, S., Santiago, L., Estévez, J., Guevara, C., Blanco, M., Sánchez, L., Sánchez, L., López, N., Cruz, D., López, R., Cuetara, E.B., Fuentes, J.L., 2009. Estimates of DNA strand breakage in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) leukocytes measured with the Comet and DNA diffusion assays. *Genet. Mol. Biol.* 32, 367–72. doi:[10.1590/S1415-47572009005000030](https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000030)
- Diegues, A.C., 2001. *Ecologia humana e planejamento costeiro*, 2nd ed. Edusp, São Paulo.
- Dinnel, P.A., Link, J.M., Stober, Q.J., Letourneau, M.W., Roberts, W.E., 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 748–755. doi:[10.1007/BF01225012](https://doi.org/10.1007/BF01225012)
- Dinnel, P.A., Stober, Q.J., 1987. Application of the sea urchin sperm bioassay to sewage treatment efficiency and toxicity in marine waters. *Mar. Environ. Res.* 21, 121–133. doi:[10.1016/0141-1136\(87\)90046-8](https://doi.org/10.1016/0141-1136(87)90046-8)
- Doney, S.C., 2010. The Growing Human Footprint on Coastal and Open-Ocean Biogeochemistry. *Science* (80-.). 328, 1512 LP-1516.
- Environment Canada, 1997. *Biological Test Method: Fertilization Assay using Echinoids (sea urchins and sand dollars)*. Method Development and Applications. Environmental Technology Center, Ottawa.
- ENVIRONMENT CANADÁ, 1999. *Guidance document on application and interpretation of single-species testes in environmental toxicology*.
- ENVIRONMENT CANADÁ, 1995. *Guidance document on measurements of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant*.
- ENVIRONMENT CANADÁ, 1990. *Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants*.
- Falk-Petersen, I.-B., 1979. Toxic effects of aqueous extracts of ekofisk crude oil, crude oil fractions, and commercial oil products on the development of sea urchin eggs. *Sarsia* 64, 161–169. doi:[10.1080/00364827.1979.10411377](https://doi.org/10.1080/00364827.1979.10411377)
- Fang, J.K.H., Wu, R.S.S., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Shin, P.K.S., 2008. Induction, adaptation and recovery of lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna*

viridis. Mar. Pollut. Bull. 57, 467–472.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.03.038>

- Fichet, D., Radenac, G., Miramand, P., 1998. Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity, Marine Pollution Bulletin. Pergamon. doi:[10.1016/S0025-326X\(97\)00190-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(97)00190-2)
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51, 115–38.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317, 207–233. doi:[10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4)
- Fliedner, A., Klein, W., 1996. Effects of Lindane on the Planktonic Community in Freshwater Microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 228–235. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1996.0029>
- Folk, R., 1974. *Petrology of Sedimentary Rocks*. Hemphills Bookstore, Austin.
- Fossi, M.C., Marsili, L., Neri, G., Casini, S., Bearzi, G., Politi, E., Zanardelli, M., Panigada, S., 2000. Skin biopsy of Mediterranean cetaceans for the investigation of interspecies susceptibility to xenobiotic contaminants. *Mar. Environ. Res.* 50, 517–521. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00127-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00127-6)
- Freitas, R., Ramos Pinto, L., Sampaio, M., Costa, A., Silva, M., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Figueira, E., 2012. Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 110, 43–53. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2012.01.011>
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 681, 80–92. doi:[10.1016/j.mrrev.2008.03.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001)
- Fuentes-Rios, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gavilán, J.F., Barra, R., 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): Biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere* 61, 192–199. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.062>
- Fung, C.N., Lam, J.C.W., Zheng, G.J., Connell, D.W., Monirith, I., Tanabe, S., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2004. Mussel-based monitoring of trace metal and organic contaminants along the east coast of China using *Perna viridis* and *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* 127, 203–216. doi:[10.1016/j.envpol.2003.08.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2003.08.007)
- Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquat. Toxicol.* 49, 27–37. doi:[10.1016/S0166-445X\(99\)00073-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00073-9)
- Galvão, J.A., 2004. Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP. Universidade de São Paulo.

- Giesy, J.P., Hook, R.A., 1989. Freshwater sediment quality criteria: Toxicity bioassessment., in: Baudo, R., Giesy, J.P., Muntau, H. (Eds.), *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp. 265–348.
- Gillikin, D.P., Dehairs, F., Baeyens, W., Navez, J., Lorrain, A., Andr??, L., 2005. Inter- and intra-annual variations of Pb/Ca ratios in clam shells (*Mercenaria mercenaria*): A record of anthropogenic lead pollution? *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1530–1540. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.06.020
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 2009. The Mussel Watch. *Environ. Conserv.* 5, 101–125. doi:10.1017/S0376892900005555
- Goldburg, R., Elliot, M., Naylor, R.L., 2001. *Marine Aquaculture in the United States: Environmental impacts and policy options*. Pew Oceans Commission, Arlington, Virginia.
- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. Vitr.* 17, 539–546. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6
- Gowland, B.T.G., McIntosh, A.D., Davies, I.M., Moffat, C.F., Webster, L., 2002. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Mar. Environ. Res.* 54, 231–235. doi:10.1016/S0141-1136(02)00129-0
- Gray, J.S., 1992. Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection. *Mar. Pollut. Bull.* 25, 48–50. doi:10.1016/0025-326X(92)90184-8
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77, 218–31.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- HABTEC - Engenharia Sanitária e Ambiental Ltda, 1997. *Diagnóstico do Plano Diretor das Bacias dos rios Santa Maria da Vitória e Jucu., Relatório Diagnóstico*.
- Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G.T., Shaw, T.J., 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar. Environ. Res.* 51, 247–64.
- Hardiman, S., Pearson, B., 1995. Heavy metals, TBT and DDT in the Sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) sampled from the Hawkesbury River estuary, NSW, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 563–567.
- Hayase, D., Horai, S., Isobe, T., Miller, T.W., Takahashi, S., Omori, K., Tanabe, S., 2009. Monitoring Trace Elements in Coastal Waters Using Sardine as a Bioindicator 167–175.
- Heslinga, G.A., 1976. Effects of copper on the coral-reef echinoid *Echinometra mathaei*. *Mar. Biol.* 35, 155–160. doi:10.1007/BF00390937
- Heuser, V.D., de Andrade, V.M., Peres, A., Gomes de Macedo Braga, L.M., Bogo

- Chies, J.A., 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol. Int.* 32, 1223–1229. doi:10.1016/j.cellbi.2008.07.005
- Hewitt, L.M., Marvin, C.H., 2005. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 589, 208–232. doi:10.1016/j.mrrev.2005.02.001
- Hicks, G.R.F., Coull, B.C., 1983. The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 67–175. doi:10.1234/2013/999990.
- Huber, P.C., Almeida, W.P., 2008. GLUTATIONA E ENZIMAS RELACIONADAS: PAPEL BIOLÓGICO E IMPORTÂNCIA EM PROCESSOS PATOLÓGICOS. *Quim. Nov.* 31, 1170–1179.
- Hugget, R.J., Unger, M.A., Seligman, P.F., Valkirs, A.O., 1992. The marine biocide Tributyltin: Assessing and managing the environmental risks. *Environ. Sci. Technol.* 26, 232–237.
- Ihnat, M., Gamble, D.S., Gilchrist, G.F.R., 1993. Determination of Trace Element Levels in Natural Fresh Water by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 53, 63–78. doi:10.1080/03067319308045983
- Islam, M.S., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 624–649. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.12.004
- Jeffries, K.M., Jackson, L.J., Ikonou, M.G., Habibi, H.R., 2010. Presence of natural and anthropogenic organic contaminants and potential fish health impacts along two river gradients in Alberta, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2379–2387. doi:10.1002/etc.265
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–221. doi:10.1093/mutage/gen014
- Joyeux, J.-C., Campanha Filho, E.A., Jesus, H.C. de, 2004. Trace metal contamination in estuarine fishes from Vitória Bay, ES, Brazil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 47, 765–774. doi:10.1590/S1516-89132004000500012
- Kádár, E., Salánki, J., Jugdaohsingh, R., Powell, J.J., McCrohan, C.R., White, K.N., 2001. Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquat. Toxicol.* 55, 137–148. doi:10.1016/S0166-445X(01)00183-7
- Kammann, U., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M., Wosniok, W., 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environ. Pollut.* 132, 279–287. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.021
- Kammann, U., Bunke, M., Steinhart, H., Theobald, N., 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 498, 67–77. doi:10.1016/S1383-5718(01)00268-6
- Kennish, M.J., 1991. *Ecology of estuaries : anthropogenic effects*. CRC Press.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The role of glutathione in detoxication.

- Environ. Health Perspect. 49, 59–69.
- Kim, I.-Y., Hyun, C.-K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 288–297. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.05.019
- Kitzmann, D., Asmus, M., 2006. Gestão ambiental portuária: desafios e possibilidades*. *RAP Rio Janeiro* 40, 1041–60.
- Kobayashi, N., 2005. Marine Pollution Bioassay using Sea Urchins. *Environ. Sci.* 18, 155–167. doi:10.11353/sesj1988.18.155
- Kobayashi, N., 1977. Preliminary experiments with sea urchin pluteus and metamorphosis in marine pollution bioassay. *Natl. Mar. Biol. Libr.* 24, 9–21.
- Kobayashi, N., Naidenko, I.K., Vaschenko, M.A., 1994. Standardization of the biotest based on using of sea urchin embryos 20, 457–464.
- Kobayashi, N., Okamura, H., 2004. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere* 55, 1403–1412. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.11.052
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751–4.
- Kralik, M., Haslinger, E., Picer, M., Picer, N., Ottner, F., 2007. PCB-anomalies in the sediments of the harbour basin of Zadar (Croatia) as consequence of war action and / or industrial contamination. *CHINESE J. GEOCHEMISTRY* 25.
- Kristensen, E., Andersen, F.Ø., 1987. Determination of organic carbon in marine sediments: a comparison of two CHN-analyzer methods. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 109, 15–23. doi:10.1016/0022-0981(87)90182-1
- Krull, M., Abessa, D.M.S., Hatje, V., Barros, F., 2014. Integrated assessment of metal contamination in sediments from two tropical estuaries. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 195–203. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.038
- Kulicova, I., Seisuma, Z., Legzdina, M., 1985. Heavy metals in marine organisms, in: *Heavy Metals in Water Organisms*. Akadtmiai Kiado, Budapest, pp. 141–154.
- Kumari, M. V, Hiramatsu, M., Ebadi, M., 1998. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radic. Res.* 29, 93–101.
- Kusk, K.O., Petersen, S., 1997. Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1629–1633. doi:10.1002/etc.5620160810
- Kusk, K.O., Wollenberger, L., 2007. Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. *Ecotoxicology* 16, 183–95. doi:10.1007/s10646-006-0112-2
- Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Bao, V.W.W., Lee, J.-S., 2008. Copper toxicity in the marine copepod *Tigropus japonicus*: Low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 632–636. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.03.026
- Lakshmanan, P.T., Nambisan, P.N.K., 1989. Bioaccumulation and depuration of some trace metals in the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 131–138. doi:10.1007/BF01702249

- Lau, P., Wong, H., 2003. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1563–1572. doi:10.1016/S0025-326X(03)00321-7
- Leal, D.A.G., Franco, R.M.B., 2008. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. *Rev Panam Infectol* 10, 48–57.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 544, 43–64. doi:10.1016/S1383-5742(03)00017-6
- Lehtonen, K.K., Turja, R., Budzinski, H., Devier, M.-H., 2016. An integrated chemical-biological study using caged mussels (*Mytilus trossulus*) along a pollution gradient in the Archipelago Sea (SW Finland, Baltic Sea). *Mar. Environ. Res.* 119, 207–221. doi:10.1016/j.marenvres.2016.06.003
- Lekube, X., Izagirre, U., Soto, M., Marigómez, I., 2014. Lysosomal and tissue-level biomarkers in mussels cross-transplanted among four estuaries with different pollution levels. *Sci. Total Environ.* 472, 36–48. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.075
- Lemos, P., 2003. Respostas bioquímicas e moleculares em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) expostos ao óleo diesel.
- Lercari, D., Defeo, O., Celentano, E., 2002. Consequences of a freshwater canal discharge on the benthic community and its habitat on an exposed sandy beach. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 1397–1404. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00304-1
- Li, X., Wai, O.W.H., Li, Y.S., Coles, B.J., Ramsey, M.H., Thornton, I., 2000. Heavy metal distribution in sediment profiles of the Pearl River estuary, South China. *Appl. Geochemistry* 15, 567–581. doi:10.1016/S0883-2927(99)00072-4
- Lions, J., Guérin, V., Bataillard, P., van der Lee, J., Laboudigue, A., 2010. Metal availability in a highly contaminated, dredged-sediment disposal site: Field measurements and geochemical modeling. *Environ. Pollut.* 158, 2857–2864. doi:10.1016/j.envpol.2010.06.011
- Liu, C.W., Lin, K.H., Kuo, Y.M., 2003. Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a blackfoot disease area in Taiwan. *Sci. Total Environ.* 313, 77–89. doi:10.1016/S0048-9697(02)00683-6
- Liu, J.H., Kueh, C.S.W., 2005. Biomonitoring of heavy metals and trace organics using the intertidal mussel *Perna viridis* in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 857–875. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.04.014
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–66.
- Lorenzo, J., Nieto, O., Beiras, R., 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat. Toxicol.* 58, 27–41. doi:10.1016/S0166-445X(01)00219-3
- Losso, C., Arizzi Novelli, A., Picone, M., Volpi Ghirardini, A., Ghetti, P.F., Rudello, D., Ugo, P., 2004. Sulfide as a confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: comparisons with chemical analysis data. *Environ.*

- Toxicol. Chem. 23, 396–401.
- Loureiro, D.D., Araujo, C.L., Lacerda, L.D., 2008. Efeitos da dragagem na distribuição espacial de mercúrio no sedimento superficial da Lagoa Rodrigo de Freitas. I Congr. Ibero-Americano Oceanogr. – I CIAO Fortaleza.
- Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H., 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study 129, 189–196.
- MacFarlane, G., Burchett, M., 2000. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Aquat. Bot. 68, 45–59. doi:10.1016/S0304-3770(00)00105-4
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. Aquat. Toxicol. 70, 83–93. doi:10.1016/j.aquatox.2004.07.003
- Marigómez, I., Zorita, I., Izagirre, U., Ortiz-Zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., Orbea, A., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2013. Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. Aquat. Toxicol. 136, 32–48. doi:10.1016/j.aquatox.2013.03.008
- Marques, D.C., Matta, S.L.P., Oliveira, J.A., Dergam, J.A., 2009. Alterações histológicas em brânquias de *Astyanax bimaculatus* causadas pela exposição aguda ao zinco. Rev. Bras. Toxicol. 22–26.
- Mastroti, R.R., 2002. Testes de toxicidade com gamentas de ouriço- do-mar (fertilização)., in: NASCIMENTO, I.A., SOUSA, E.C.P.M., NIPPER, M. (Eds.), Métodos Em Ecotoxicologia: Aplicações No Brasil. Artes Gráficas e Indústria LTDA, São Paulo, p. 262.
- Mendiguchía, C., Moreno, C., García-Vargas, M., 2007. Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients. Chemosphere 69, 1509–1517. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.082
- Mersch, J., Beauvais, M.-N., Nagel, P., 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. Mutat. Res. Toxicol. 371, 47–55. doi:10.1016/S0165-1218(96)90093-2
- Micó, C., Recatalá, L., Peris, M., Sánchez, J., 2006. Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. Chemosphere 65, 863–872. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.016
- Mirlean, N., Andrus, V.E., Baisch, P., Griep, G., Casartelli, M.R., 2003. Arsenic pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. Mar. Pollut. Bull. 46, 1480–1484. doi:10.1016/S0025-326X(03)00257-1
- Mirlean, N., Baisch, P., Travassos, M.P., Nassar, C., 2011. Calcareous algae bioclast contribution to sediment enrichment by arsenic on the Brazilian subtropical coast. Geo-Marine Lett. 31, 65–73. doi:10.1007/s00367-010-0215-x
- Mirlean, N., Medeanic, S., Garcia, F. a., Travassos, M.P., Baisch, P., 2012. Arsenic

- enrichment in shelf and coastal sediment of the Brazilian subtropics. *Cont. Shelf Res.* 35, 129–136. doi:10.1016/j.csr.2012.01.006
- Mitchelmore, C.L., Birmelin, C., Livingstone, D.R., Chipman, J.K., 1998. Detection of DNA Strand Breaks in Isolated Mussel (*Mytilus edulis*L.) Digestive Gland Cells Using the “Comet” Assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 51–58. doi:10.1006/eesa.1998.1666
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Lund Amado, L., Martinez Gaspar Martins, C., Lopes Leães Pinho, G., Soares Chaves, I., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 146, 221–234. doi:10.1016/j.cbpc.2006.08.012
- Montagna, P.A., 1995. Rates of metazoan meiofaunal microbivory: A review. *Vie Milieu* 45, 1–9.
- Montserrat, J.M., Geracitano, L.A., Assis, H.C.S., Colares, E.P., Bianchini, A., 2006. Biomarcadores Bioquímicos., in: Lana, P.C., Bianchini, A., Ribeiro, C.A.O., Niencheski, L.F.H., Fillmann, G., Santos, C.S.G. (Eds.), *Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros-Diretrizes Metodológicas*. Museu Nacional/UFRJ, Rio de Janeiro, pp. 124–131.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31–36. doi:10.1016/S0003-2670(00)88444-5
- Nadmitov, B., Hong, S., In Kang, S., Chu, J.M., Gomboev, B., Janchivdorj, L., Lee, C.-H., Khim, J.S., 2015. Large-scale monitoring and assessment of metal contamination in surface water of the Selenga River Basin (2007-2009). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 2856–67. doi:10.1007/s11356-014-3564-6
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubèze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.F., Moukrim, A., 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 901–8.
- Narchi, W., Galvão-Bueno, M.S., 1997. ANATOMIA FUNCIONAL DE PERNA PERNA (L1NNÉ) (BIVALVIA, MYTILIDAE). *Rev. Bras. Zool.* 14, 135–168.
- Niencheski, L.F., Milani, M.R., Milani, I.B., 2008. Metais Traço: Água., in: *Poluição Marinha*. Interciência, Rio de Janeiro, p. 412.
- Nilin, J., Moreira, L.B., Aguiar, J.E., Marins, R., Moledo de Souza Abessa, D., Monteiro da Cruz Lotufo, T., Costa-Lotufo, L.V., 2013. Sediment quality assessment in a tropical estuary: The case of Ceará River, Northeastern Brazil. *Mar. Environ. Res.* 91, 89–96. doi:10.1016/j.marenvres.2013.02.009
- Nogueira, L., Garcia, D., Trevisan, R., Sanches, A.L.M., da Silva Acosta, D., Dafre, A.L., Oliveira, T.Y.K., de Almeida, E.A., 2015. Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5. *Chemosphere* 134, 210–216. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.034

- Nuss, P., Eckelman, M.J., 2014. Life Cycle Assessment of Metals: A Scientific Synthesis. *PLoS One* 9, e101298. doi:10.1371/journal.pone.0101298
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 567, 109–149. doi:10.1016/j.mrrev.2004.08.003
- Owens, J.E., Niemeyer, E.D., 2006. Analysis of chemical contamination within a canal in a Mexican border colonia. *Environ. Pollut.* 140, 506–515. doi:10.1016/j.envpol.2005.07.019
- Ozretić, B., Krajnović-Ozretić, M., 1985. Morphological and biochemical evidence of the toxic effect of pentachlorophenol on the developing embryos of the sea urchin. *Aquat. Toxicol.* 7, 255–263. doi:10.1016/0166-445X(85)90043-8
- Papadopoulos, A.I., Polemitou, I., Laifi, P., Yiangou, A., Tananaki, C., 2004. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica*: Kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 139, 93–97. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2004.09.010
- Pavlica, M., Klobučar, G.I. V, Mojaš, N., Erben, R., Papeš, D., 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 490, 209–214. doi:10.1016/S1383-5718(00)00162-5
- Payne, P.I., 1987. Genetics of Wheat Storage Proteins and the Effect of Allelic Variation on Bread-Making Quality. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 141–153. doi:10.1146/annurev.pp.38.060187.001041
- Pereira, C.D.S., Abessa, D.M.D.S., Bairy, A.C.D., Zaroni, L.P., Gasparro, M.R., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Furley, T.H., De Sousa, E.C.P.M., 2007. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 462–9.
- Phillips, B.M., Anderson, B.S., Hunt, J.W., 1998. Spatial and temporal variation in results of purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) toxicity tests with zinc. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 453–459. doi:10.1002/etc.5620170316
- Phillips, D.J.H., 1995. The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 193–200. doi:10.1016/0025-326X(95)00194-R
- Phillips, D.J.H. (Acer E.L. (United K., 1991. Selected trace elements and the use of biomonitors in subtropical and tropical marine ecosystems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*
- Pierce, M.L., Moore, C.B., 1982. Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. *Water Res.* 16, 1247–1253. doi:10.1016/0043-1354(82)90143-9
- Poli, P., Buschini, A., Maria, F., 1999. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis* 14, 547–555.
- Prá, D., Lau, A.H., Knakievicz, T., Carneiro, F.R., Erdtmann, B., 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 585, 79–85. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.04.002

- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 120, 497–507. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00238-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00238-5)
- Raisuddin, S., Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Schlenk, D., Lee, J.-S., 2007. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat. Toxicol.* 83, 161–173. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.04.005>
- Rank, J., 2009. Intersex in *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1271–1277. doi:[10.1016/j.ecoenv.2008.12.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.12.008)
- Rank, J., Jensen, K., Jespersen, P.H., 2005. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 585, 33–42. doi:[10.1016/j.mrgentox.2005.04.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.04.008)
- Reimann, C., Matschullat, J., Birke, M., Salminen, R., 2009. Arsenic distribution in the environment: The effects of scale. *Appl. Geochemistry* 24, 1147–1167. doi:[10.1016/j.apgeochem.2009.03.013](http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2009.03.013)
- Renzi, M., Perra, G., Guerranti, C., Franchi, E., Focardi, S., 2009. Abatement efficiency of municipal wastewater treatment plants using different technologies (Orbetello Lagoon, Italy). *Int. J. Environ. Heal.* 3, 58–70.
- Riba, I., Casado-Martínez, C., Forja, J.M., DelValls, A., 2004. Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 271–282. doi:[Doi 10.1897/03-146](http://dx.doi.org/10.1897/03-146)
- Riba, I., Forja, J.M., Gómez-Parra, A., DelValls, T.Á., 2004. Sediment quality in littoral regions of the Gulf of Cádiz: A triad approach to address the influence of mining activities. *Environ. Pollut.* 132, 341–353. doi:[10.1016/j.envpol.2004.03.021](http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2004.03.021)
- Rodríguez-Ariza, A., Alhama, J., Díaz-Méndez, F.M., López-Barea, J., 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat. Res.* 438, 97–107.
- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., Elder, J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671–679. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00333-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00333-2)
- Rubio, B., Nombela, M., Vilas, F., 2000. Geochemistry of Major and Trace Elements in Sediments of the Ria de Vigo (NW Spain): an Assessment of Metal Pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 968–980. doi:[10.1016/S0025-326X\(00\)00039-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00039-4)
- Ruschi, A., 2007. PARQUE NACIONAL MARINHO DE SANTA CRUZ – ES. [WWW Document]. URL http://ruschicolibri.com.br/parque_nacional.php (accessed 9.18.16).
- Sá, F., Machado, E.C., Angulo, R.J., Veiga, F.A., Brandini, N., 2006. Arsenic and Heavy metals in Sediments near Paranaguá Port, Southern Brazil. *J. Coast. Res.* 39, 1066–1068.
- Saco-Álvarez, L., Durán, I., Ignacio Lorenzo, J., Beiras, R., 2010. Methodological

- basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 491–499. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.01.018
- Sáenz, L.A., Seibert, E.L., Zanette, J., Fiedler, H.D., Curtius, A.J., Ferreira, J.F., Alves de Almeida, E., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2010. Biochemical biomarkers and metals in Perna perna mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 796–804. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.02.015
- Salazar, M.H., Salazar, S.M., 1991. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Mar. Environ. Res.* 32, 131–150. doi:10.1016/0141-1136(91)90038-A
- Sanders, M.J., Du Preez, H.H., Van Vuren, J.H.J., 1998. The Freshwater River Crab, *Potamonautes warreni*, as a Bioaccumulative Indicator of Iron and Manganese Pollution in Two Aquatic Systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 203–214. doi:10.1006/eesa.1998.1699
- Santana, L.I. De, Eduardo, C., Carvalho, V. De, Gomes, M.P., Metais, D. De, Perna, M., Santana, I. De, 2001. Distribuição de Metais Pesados em Mexilhões SUMMARY.
- Scanes, P., Roach, A., 1999. Determining natural 'background' concentrations of trace metals in oysters from New South Wales, Australia. *Environ. Pollut.* 105, 437–446. doi:10.1016/S0269-7491(99)00030-5
- Scanes, P.R., 1997. Uptake and depuration of organochlorine compounds in Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). *Mar. Freshw. Res.* 48, 1–6.
- Semmler, M.G.M.C., 2007. Biomonitoração de Hg, Cd, Pb e outros elementos em áreas costeiras do Estado de São Paulo por meio do mexilhão transplantado - Perna perna (Linnaeus, 1758). Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/T.85.2007.tde-27112007-140442
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 193–199. doi:10.1016/S0742-8413(99)00033-X
- Shulkin, V.M., Presley, B.J., Kavun, V.I., 2003. Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environ. Int.* 29, 493–502. doi:10.1016/S0160-4120(03)00004-7
- Sim, W.-J., Lee, J.-W., Lee, E.-S., Shin, S.-K., Hwang, S.-R., Oh, J.-E., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere* 82, 179–186. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.026
- Sloman, K.A., 2007. Effects of trace metals on salmonid fish: The role of social hierarchies. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 326–345. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.003
- Souza, R.C.C.L., Fernandes, F.C., Silva, E.P., 2003. A study on the occurrence of the brown mussel *Perna perna* on the sambaquis of the Brazilian coast. *Rev. do*

Mus. Arqueol. e Etnol. 13, 3–24.

- Souza, I.S. de, Araujo, G.S. de, Cruz, A.C.F., Fonseca, T.G., Camargo, J.B.D.A. de, Medeiros, G.F., Abessa, D.M. de S., 2016. Using and integrated approach to assess the sediment quality of an estuary from the semi-arid coast of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushi, K., Simazaki, D., 2003. Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 541, 31–44. doi:10.1016/S1383-5718(03)00177-3
- Stankovic, S., Jovic, M., 2012. Health risks of heavy metals in the mediterranean mussels as seafood. *Environ. Chem. Lett.* 10, 119–130. doi:10.1007/s10311-011-0343-1
- Stark, J.S., 1998. Effects of Copper on Macrobenthic Assemblages in Soft Sediments: A Laboratory Experimental Study. *Ecotoxicology* 7, 161–173. doi:10.1023/A:1014356327595
- Sternbeck, J., Östlund, P., 2001. Metals in Sediments from the Stockholm Region: Geographical Pollution Patterns and Time Trends. *Water, Air Soil Pollut. Focus* 1, 151–165. doi:10.1023/A:1017508322097
- Stronkhorst, J., Ariese, F., van Hattum, B., Postma, J.F., de Kluijver, M., Den Besten, P.J., Bergman, M.J.N., Daan, R., Murk, A.J., Vethaak, A.D., 2003. Environmental impact and recovery at two dumping sites for dredged material in the North Sea. *Environ. Pollut.* 124, 17–31. doi:10.1016/S0269-7491(02)00430-X
- Tanabe, S., Prudente, M.S., Kan-atireklap, S., Subramanian, A., 2000. Mussel watch: marine pollution monitoring of butyltins and organochlorines in coastal waters of Thailand, Philippines and India. *Ocean Coast. Manag.* 43, 819–839. doi:10.1016/S0964-5691(00)00060-0
- Theodorakis, C.W., 2001. Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology* 10, 245–56.
- Thompson, E.L., Taylor, D. a, Nair, S. V, Birch, G., Haynes, P. a, Raftos, D. a, 2012. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquat. Toxicol.* 109, 202–12. doi:10.1016/j.aquatox.2011.09.018
- Thompson, G., Swain, J., Kay, M., Forster, C., 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresour. Technol.* 77, 275–286. doi:10.1016/S0960-8524(00)00060-2
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–21.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, a., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J

- Torres, M.A., Pires Testa, C., Gáspari, C., Beatriz Masutti, M., Maria Neves Panitz, C., Curi-Pedrosa, R., Alves de Almeida, E., Di Mascio, P., Wilhelm Filho, D., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 923–932. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00142-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00142-X)
- Torres, R.J., Abessa, D.M.S., Santos, F.C., Maranhão, L.A., Davanzo, M.B., do Nascimento, M.R.L., Mozeto, A.A., 2009. Effects of dredging operations on sediment quality: contaminant mobilization in dredged sediments from the Port of Santos, SP, Brazil. *J. Soils Sediments* 9, 420–432. doi:10.1007/s11368-009-0121-x
- Tran, D., Moody, A.J., Fisher, A.S., Foulkes, M.E., Jha, A.N., 2007. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquat. Toxicol.* 84, 11–18. doi:10.1016/j.aquatox.2007.05.009
- Trefry, J.H., Naito, K.L., Trocine, R.P., Metz, S., 1995. Distribution and bioaccumulation of heavy metals from produced water discharges to the gulf of Mexico. *Water Sci. Technol.* 32, 31–36. doi:10.1016/0273-1223(95)00566-6
- Tsangaris, C., Vergolyas, M., Fountoulaki, E., Nizheradze, K., 2011. Oxidative Stress and Genotoxicity Biomarker Responses in Grey Mullet (*Mugil cephalus*) From a Polluted Environment in Saronikos Gulf, Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 482–490. doi:10.1007/s00244-010-9629-8
- Turja, R., 2015. Biological Effects of Contaminants in Mussels (*Mytilus trossulus*) Transplanted in Northern Baltic Sea Coastal Areas. Department of Environmental Sciences. Division of Aquatic Sciences.
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Uluturhan, E., Kucuksezgin, F., 2007. Heavy metal contaminants in Red Pandora (*Pagellus erythrinus*) tissues from the Eastern Aegean Sea, Turkey. *Water Res.* 41, 1185–1192. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.044>
- USEPA (United States Environmental Protection Agency/Department of The Army U.S. Army Corps of Engineers), 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal — testing manual, EPA-503-8-91/001.
- Usero, J., González-Regalado, E., Gracia, I., 1997. Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic Coast of Southern Spain. *Environ. Int.* 23, 291–298. doi:10.1016/S0160-4120(97)00030-5
- Usero, J., Morillo, J., Gracia, I., 2005. Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere* 59, 1175–1181. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.089
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6

- Venier, P., Maron, S., Canova, S., 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 390, 33–44. doi:10.1016/S0165-1218(96)00162-0
- Villela, I.V., de Oliveira, I.M., da Silva, J., Henriques, J.A.P., 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 605, 78–86. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.02.006
- Vosloo, D., Sara, J., Vosloo, A., 2012. Acute responses of brown mussel (*Perna perna*) exposed to sub-lethal copper levels: Integration of physiological and cellular responses. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 1–8. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.001
- Warnau, M., Ledent, G., Temara, A., Bouquegneau, J.-M., Jangoux, M., Dubois, P., 1995. Heavy metals in *Posidonia oceanica* and *Paracentrotus lividus* from seagrass beds of the north-western Mediterranean. *Sci. Total Environ.* 171, 95–99. doi:10.1016/0048-9697(95)04721-8
- Waterman, A., 1937. Effect of Salts of Heavy Metals on Development of the Sea Urchin, *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* 73, 401–420.
- Wells, P.G., Depledge, M.H., Butler, J.N., Manock, J., Knap, A.H., 2001. Rapid Toxicity Assessment and Biomonitoring of Marine Contaminants — Exploiting the Potential of Rapid Biomarker Assays and Microscale Toxicity Tests. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 799–804. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00054-6
- Widerlund, A., Ingri, J., 1995. Early diagenesis of arsenic in sediments of the Kalix River estuary, northern Sweden. *Chem. Geol.* 125, 185–196. doi:10.1016/0009-2541(95)00073-U
- Yabe, M.J.S., Oliveira, E. de, 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Quim. Nova* 21, 551–556. doi:10.1590/S0100-40421998000500003
- Yeung, J.W.Y., Zhou, G.-J., Leung, K.M.Y., 2016. Sub-lethal effects of cadmium and copper on RNA/DNA ratio and energy reserves in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 59–67. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.05.023
- Zagatto, P.A. Bertolotti, E., 2006. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos.
- Zhadan, P.M., Vashchenko, V. V., Malakhov, L.A., Medvedeva, V., G.R., 1992. The effect of environmental pollution, hydrocarbons and heavy metals on reproduction of sea urchins and bivalves, in: Ilyichev, V.I., Anikiev, V. V. (Eds.), *Oceanic and Anthropogenic Controls of Life in the Pacific Ocean*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp. 267–286.
- Zhang, W., Guo, Z., Zhou, Y., Liu, H., Zhang, L., 2015. Biotransformation and detoxification of inorganic arsenic in Bombay oyster *Saccostrea cucullata*. *Aquat. Toxicol.* 158, 33–40. doi:10.1016/j.aquatox.2014.10.021
- Zimmerman, L.E., Jutte, P.C., Van Dolah, R.F., 2003. An environmental assessment of the Charleston Ocean Dredged Material Disposal Site and surrounding areas after partial completion of the Charleston Harbor Deepening Project. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1408–1419. doi:10.1016/S0025-326X(03)00289-3

Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201–208. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001>

CAPÍTULO 2

Using ecotoxicological tests to assess the sediment quality of a tropical coastline: The case of Aracruz's coast, north of Espírito Santo, Brazil

ABSTRACT

The Aracruz, Espírito Santo (ES), Brazil, coastal region is subjected to different anthropogenic pressures that introduce contaminants that are adsorbed to the marine sediment. Given these influences, the present study aimed to determine the environmental quality of the Aracruz-ES coastline through toxicity tests of two invertebrate species (*Nitokra* sp. and *Echinometra lucunter*) exposed to marine sediment and elutriate, combined with principal component analysis, to identify the physicochemical variables (total organic matter - TOM, total organic carbon - TOC, total phosphorus - TP, Fe, Cd, Pb, Cr, Mn, Ni and As) that best explain the variations of the data found. Five sediment collections, during one year, were performed along the Aracruz coastline at ten sample points. The results of the sedimentary characterization for the sampling stations indicate Fe as the most abundant metallic element present in the sediment and As as the only parameter above the limit imposed by Brazilian law. Nevertheless, most of the sediment samples were considered toxic for the sediment test with copepods (*Nitokra* sp., reproduction), and all of the sediment samples caused toxic responses in gametes and embryos of sea urchin (fertilization and development) according to the elutriate test. The toxicity results showed no significant correlation with the analyzed elements, emphasizing the influence of other factors not analyzed in this study and that can be related to the pollution sources in the region.

Keywords: Biomarkers, Metal, Toxicity tests, *Nitokra* sp. and *Echinometra lucunter*

1. INTRODUCTION

Better technologies based on fast and secure detections have been applied in biomonitoring programs to reduce the risks to environmental health caused by human activities in aquatic ecosystems. In accordance with this perspective, ecotoxicological analyses have been widely employed (Barbosa et al., 2010; Cesar et al., 2014; Krull et al., 2014; Nilin et al., 2013; Souza et al., 2016) because bioassays are able to characterize the effects of environmental contaminants caused by chronic and/or acute exposure, without prior knowledge of the chemical components present in the sample (Ohe et al., 2004). The use of these ecotoxicological tests in assessing the quality of water, wastewater and sediments was officially regulated in Brazil, at the federal level, through Resolution No 357 of March 17, 2005 and Resolution No 454 of November 1, 2012 of the National Environment Council (Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, 2005; CONAMA, 2012).

Biomonitoring studies have been required in the municipality of Aracruz, located 60 km from Vitoria (capital of the state of Espírito Santo (ES) - Southeast Brazil). This coastal city has 12 beaches of great touristic interest and has several areas of environmental protection; however, it has an environmental situation of particular concern because its 47-km long coastline hosts several industrial and naval enterprises. In 2012, the installation of a new harbor close to a shipyard began for the purpose of creating oil exploration platforms (Loureiro et al., 2008), which required seabed dredging that extended approximately 2 km. This same region also receives the industrial effluent from a pulp mill installed more than 30 years ago. In addition to these, there are other industrial enterprises in the area and the region is also under Doce River influence that brings urban and industrial effluents, and more recently is bringing the waste plume of an iron mining dam incident that happened November 2015.

Among the possible contaminants in the region, one can cite the metals that often accumulate in sediments that are a repository for a large part of the total load of metals in coastal ecosystems (Fichet et al., 1998). They can later be bioavailable for conservative pollutants that are minimally degraded by bacterial attack. These contaminants can continue to pass through an entire ecosystem's ecological cycle for a long time (Nuss and Eckelman, 2014).

The complex nature of the sedimentary matrix and complex mixtures of several potential toxic substances makes it difficult to identify the components that cause undesirable biological effects (Riba et al., 2004). Chemical analyses identify and quantify substances present in the sediment but do not provide an accurate assessment of the potential effects of contaminating metals on the biota that inhabit coastal waterways nor on the possible impacts on their ecosystems (Gray, 1992). Thus, for a better evaluation of the pollution process in the coastal marine environment, several authors have proposed environmental quality evaluations based on chemical measurements, coupled with laboratory toxicity tests using organisms as biological indicators (DeIValis et al., 1998). The ecotoxicological techniques commonly used evaluate mortality or morbidity among key indicator species and thus provide information about the potential biological effects of metal contamination (Sanders et al., 1998; Stark, 1998).

For a suitable evaluation of marine ecotoxicology, it is important to find appropriate organisms for the development of these toxicity tests (Kwok et al., 2008) and use a series of bioassays that covers different exposure routes (whole sediment and elutriate), ensuring that the null effect level in a test will also discriminate at various trophic levels (Giesy and Hook, 1989). The ideal bioindicator organisms for these tests are those that are easily maintained in laboratory conditions, have a large distribution and are especially sensitive to small concentrations of toxic compounds in the environment, providing an early indicative warning of environmental hazards (Payne, 1987). Invertebrates are the aquatic organisms that have been preferably used in environmental assessments because they constitute 95 % of all animal species (Barnes, 2006) and their population is generally large; thus, invertebrate samples can be collected for analysis without causing significant changes in population dynamics (Depledge and Fossi, 1994; Fossi et al., 2000). Good examples are copepods, such as *Nitokra* sp., and echinoids, such as sea urchin (*Echinometra lucunter*). The *Nitokra* sp. presents many advantages such as its resistance to salinity variations, ecological relevance, representativeness of the organism, short-term (3–4 weeks) and full life cycles in sediment and habits that favor interaction with sediment (they live among sediment grains and feed on microorganisms and debris), sensitivity to various contaminants, ease of growing in the laboratory and the organism's small size, which facilitates tests (Kusk and Wollenberger, 2007). Sea

urchins, however, are well suited for acute marine pollution bioassays (Kobayashi, 2005, 1977; Kobayashi et al., 1994) because different abnormalities identified during fertilization and the egg and embryo development stages, which can be induced by polluted water, can act as indicators in these bioassays (Kobayashi and Okamura, 2004). Thus, these efficient biomarkers are frequently applied in the assessment of contamination by metals and can be used to determine spatial and temporal trends in the abundance of metals and their bioavailability (Ablanedo et al., 1990; Warnau et al., 1995).

Accordingly, the objective of this study was to determine the environmental quality of the Aracruz-ES coastline using toxicity tests that employed a species of benthic copepods (*Nitokra* sp.) and sea urchin (*Echinometra lucunter*) gametes and embryos exposed to the whole marine sediment and elutriate of this region. A principal component analysis was used to show whether the physical and chemical parameters measured including metals and a major metalloid that is abundant in the region, interfered with the biological results. This type of analysis aims to identify the variables that best explain the variations found in the data.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Study site

The coastline of the municipality of Aracruz, located in the north of Espírito Santo, is considered a tourist and industrial center. This region is characterized by the confluence of an important river, the Piraquê-Açu and Doce River, which carries a massive load of untreated urban, agricultural and industrial effluents. In addition, Aracruz's coastline was chosen for the development of several large projects including a shipyard, a metalworking facility and a waterway terminal located near a pulp mill.

The study area also includes areas of environmental protection, such as the Santa Cruz Wildlife Refuge (REVIS), the Seaweed Coast Environmental Protection Area (APA), the Ruschi Marine Biology Station, the Piraquê-Açu and Piraquê-Mirim Ecological Mangrove Reserves and the Comboios Biological Reserve. All these areas are of ecological importance, as they are home to many animal and plant species. They are also of great importance to local communities, whose survival is

dependent on natural resources, such as fisheries, shellfish collection and the manufacture of handicrafts.

Five sampling surveys were conducted (campaign **A** in May, campaign **B** in August and campaign **C** in December of 2014; campaign **D** in March and campaign **E** in May of 2015) along the Aracruz coastline (Espírito Santo, Brazil) at ten sampling stations with quarterly periodicity (Fig. 1).

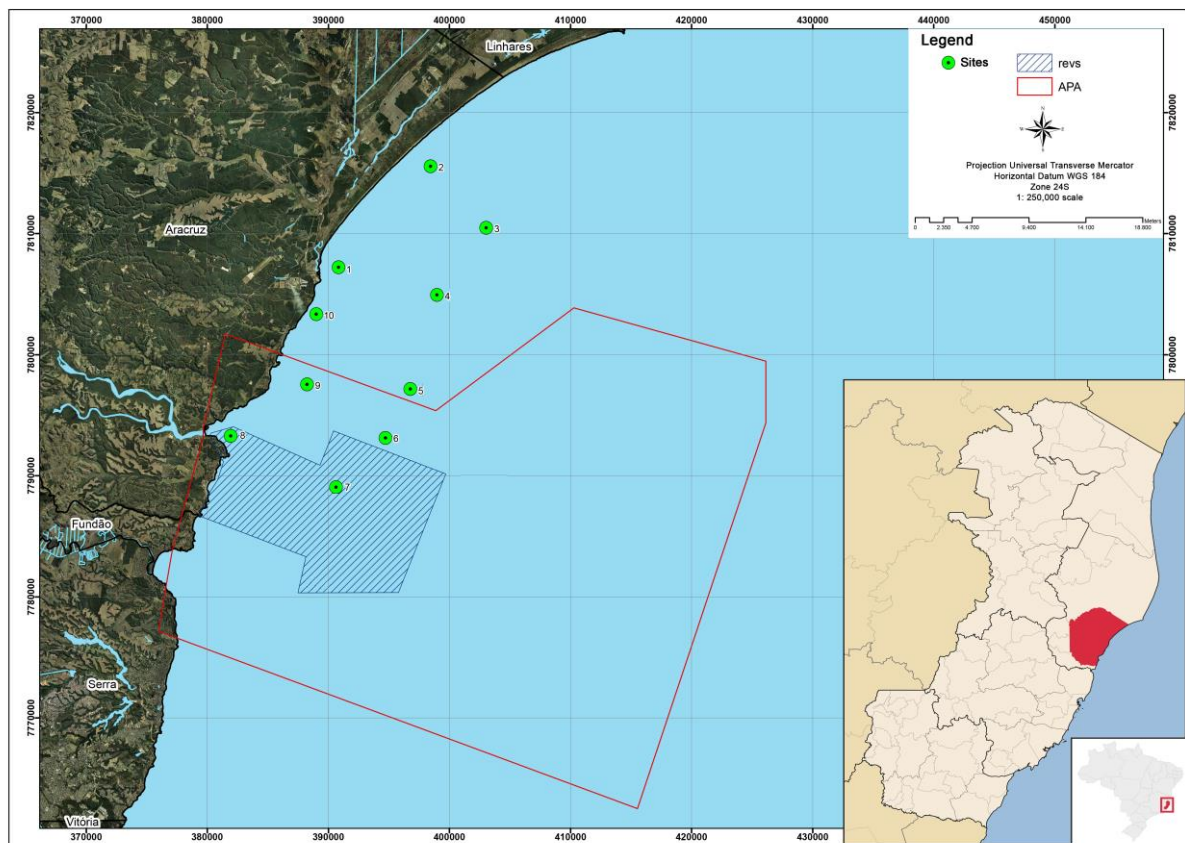


Figure 1. Map of the study area showing the Santa Cruz Wildlife Refuge (REVIS), the Seaweed Coast Environmental Protection Area (APA) and the sampling sites (1–10).

2.2. Sediment sampling

The surface sediments (0–10 cm) were sampled using stainless-steel "Petersen" grabs from a motorboat. The samples were homogenized in plastic trays and divided into labeled clean plastic bags according to the type of analysis to be performed. All samples were sent to the Applied Ichthyology Laboratory (FISHLAB, University Vila Velha - UVV) where they remain stored at 4 °C until the time of analysis and bioassays.

2.3. Physicochemical analysis of the sediments

The sediment samples were subjected to the following analyses: (a) granulometric distributions, determined by wet sieving sand and gravel and using a pipette technique for silt and clay fractions, were classified according to the Folk/Wentworth scale (Folk, 1974); (b) total organic matter (TOM) was determined according to (Kristensen and Andersen, 1987); (c) total organic carbon (TOC) was determined according to Boyd and Tucker (1992); (d) total phosphorus (TP) was determined by the ascorbic acid method according to the method of Murphy and Riley (1962); and (e) metals (Iron - Fe, Cadmium - Cd, lead - Pb, chrome - Cr, manganese - Mn and nickel - Ni) and arsenic - As were determined through electrothermal ionization in a graphite furnace attached to an atomic absorption spectrophotometer (AAS) and by flame atomic absorption spectrometry (FAAS; ICE 3000 Series, Thermo Scientific), with respective metal solution standards (SpecSol[®]). The standard sediment for estuarine sites BCR[®] – 667IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) was used to validate the procedure analyses.

2.4. Sediment toxicity

2.4.1. Solid-phase bioassays with *Nitokra* sp. (reproduction)

In the present study, the benthic copepod *Nitokra* sp. were acquired from the culture maintained at the Aquatic Ecotoxicology Laboratory of Aplysia Technology for the Environment, Vitória-ES, where cultivation began with the donation of copies of *Nitokra* sp. grown in the Ecotoxicology Laboratory of the Oceanographic Institute (LECOTOX) of the University of São Paulo (USP IO).

Toxicity tests were performed according to Lotufo and Abessa (2002). The test chambers (4 replicates/sample) were prepared with approximately 0.5 cm of homogenized sediment and 15 mL of artificial seawater (salinity 25). Ten ovigerous females were added to each test chamber, and the supplementary feeding consisted of a yeast solution given at the beginning of the tests. The chambers were incubated without aeration and under a constant temperature (25 °C) with a 12/12 h dark/light photoperiod for 10 days. After exposure, 10 % formalin and Bengal rose stain were added to each test chamber to preserve and identify the animals. After at least 2 days, the entire contents (water and sediment) were sieved through a 45-mm mesh. The adults and offspring (copepodites and nauplii) were then counted to evaluate the

reproduction rate expressed as the average number of copepodites and nauplii. Physical chemical analyses were conducted at the beginning and end of the tests to guarantee the minimum requirements to test acceptability (D.O. > 3.0 mg.L⁻¹; salinity = 25; pH > 7.0 and temperature = 25 °C; ammonia concentrations > 2 mg.L⁻¹).

2.4.2. Elutriates bioassays with *Echinometra lucunter*

Elutriates were prepared on all sediment samples in accordance with ABNT NBR 15469 (2015). The homogenized sediments were mixed with 1:4 (v:v) filtered seawater and placed in a mechanical shaker for 30 min with sufficient speed to resuspend the material. Thereafter, the samples were allowed to rest for 1 hour. The water was centrifuged (1,800 g for 2 h) and the supernatant liquid was removed carefully and used in toxicity testing.

2.4.2.1. Organisms collection, obtaining gametes and sample preparation

Adult sea urchins of the species *Echinometra lucunter* were collected in a clean intertidal zone on the Praia da Costa, Vila Velha - ES. In the laboratory, animals were transferred to aquariums that were continuously supplied with clean aerated seawater, for acclimation until the time of release of induction gametes.

Gametes were obtained by injecting 1 mL of KCl (0.5 M) through the perioral membrane of the sea urchins. Eggs from the three females were pooled and maintained in suspension with artificial seawater (Lorenzo et al., 2002), and sperm from the three males were pooled and maintained in a Petri dish in dry, cold conditions until fertilization. Prior to fertilization, gametes were examined under the microscope to check their maturity, i.e., that eggs were spherical and that sperm were highly mobile.

Solutions of zinc sulphate (ZnSO₄), with nominal concentrations of 0.01, 0.06, 0.13, 0.19, 0.25 and 0.5 mg L⁻¹ were used as reference substances in the test, in accordance with published guidelines (CETESB, 1999; Environment Canada, 1997). The control from lab estimates state that the EC₅₀ should be between 0.08 and 0.11 mg.L⁻¹ of zinc for the test to be considered valid.

Toxicity test vials (15 mL) were filled with 10 mL of the elutriates and the reference substance solutions in quadruplicate.

2.4.2.2. Acute toxicity test with gametes of *Echinometra lucunter* (fertilization)

The sea urchin sperm were exposed to elutriate samples and the reference substance solutions for a period of 20 minutes. After this exposure, the sea urchin eggs were added to the samples to initiate fertilization, and after 20 minutes the content of the assay tubes was fixed with 4 % formaldehyde and then analyzed. The fertilization rate was observed under a microscope, differentiating the eggs (fertilized) from ovules (unfertilized).

2.4.2.3. Chronic toxicity test with embryos of *Echinometra lucunter* (development)

The assays followed the protocol described by ABNT NBR 15350 (2012). The eggs were transferred to a beaker containing artificial seawater and a few microliters of dry pooled sperm were added. The mixture was carefully stirred to allow fertilization to take place. The density of fertilized eggs from control samples (artificial seawater) was counted under a microscope; fertilization success was >80 %.

Approximately 300 fertilized eggs were placed in each vial. The vials were incubated for 36 h at 25 ± 2 °C under a 12/12 h dark/light photoperiod. Water quality parameters including temperature (20 ± 0.8 °C), salinity (34 ± 1), DO (> 3.0 mg.L⁻¹), ammonia concentrations (> 0.1 mg.L⁻¹) and pH (7.6 ± 0.3) were measured at the beginning and at the end of the bioassay, to ensure the acceptability of the tests. Tests that showed no significant difference between these parameters in the control were considered valid. After the incubation period, the content of the assay tubes was fixed with 4 % formaldehyde, and the larvae were then observed with a microscope (Nikon model eclipse E200LED MV R). One hundred larvae were randomly selected and analyzed with a light microscope (400X) for anomalous development, resulting in a relative frequency (%) of normal (or reduction in normal) development.

2.5. Data analysis

The mean offspring per copepod female, the mean egg fertilization rate and the normal embryo-larval development of sea urchin in elutriate samples in the five campaigns were compared to the control by employing Student's parametric t-test or Mann-Whitney's non-parametric test, depending on the distribution of the data. The decision to use parametric or non-parametric tests was based on analyses of

normality and homogeneity of variance. Values were considered significant when $p < 0.05$.

The size of the sediment is expressed by eight highly correlated granulometric fractions (pebbles, gravel, very coarse sand, coarse sand, medium sand, fine sand, very fine sand and mud). To avoid problems of data circularity, we followed Doucet and Montgomerie (2003), who suggested the use of principal components analysis (PCA) to summarize correlated variables. Thus, possible relationships between the influence of grain size on the chemical and ecotoxicological aspects were sought and evaluated utilizing the grain-size score calculated from a PCA constructed with the granulometric fractions of the collected sediment. The first principal component (PC1) explained 35.1 % of the variation in grain size. The highest values of PC1 were associated with the coarsest granulometric fractions, indicating that the highest values of this axis were associated with the coarsest sediments.

To search for possible relationships between sediment properties and chemical and ecotoxicological aspects, a data matrix (clustered from all campaigns) was constructed and a second principal component analysis (PCA) was performed using the PAST Statistical Software. Before this analysis all the data were standardized. Standardization tends to increase the influence of variables whose variance is small, and reduce the influence of variables whose variance is large. Furthermore, the standardization procedure eliminates the influence of different units of measurement and makes the data dimensionless.

In addition to composing the evaluation, correlated analyses were developed for combined data of all sample locations for physical-chemical variables and mortality, which were calculated using the Pearson correlation coefficient.

3. RESULTS

The results of the sedimentary characterization for the sampling stations in the five campaigns are shown in Table 1. Values in bold represent concentrations above Level 2 (threshold above which there is a greater likelihood of adverse effects to biota) as established in the general guidelines of the Resolution CONAMA No 454/2012 for the management of material to be dredged. Only the concentration of As was above the limit defined by that legislation. For stations 1 and 4 this parameter

was in disagreement with the legislation for all campaigns, whereas stations 8 and 10 did not show values of As above 70 mg.Kg^{-1} in any campaign.

In general, Fe was the most abundant metallic element present in the sediment of all Aracruz coastline sampling stations for all of the campaigns ($6,217\text{--}151,011 \text{ mg.Kg}^{-1}$). In contrast, Cd was the least abundant metallic element in this study ($1.7\text{--}160.9 \text{ }\mu\text{g.Kg}^{-1}$).

Unfortunately, environmental conditions made it impossible to collect sediment samples in stations 6 and 7 during the course of campaign A and, due to the study area characteristics, the collection of sediment in station 10 could not be performed during campaigns B, D and E.

The results of the ecotoxicological tests for the complete sediment (reproduction rate of copepods *Nitokra* sp.) and elutriate (fertilization rate and normal larvae development of the sea urchin *Echinometra lucunter*) of the sampling stations are shown in Table 2. The quality control tests were within the expected parameters, validating the tests conducted. In the tests of sea urchin the percentage of fertilized eggs in the control was 87 %, which was higher than the minimum acceptable (80%). The EC50 of zinc was 0.10 mg L⁻¹, which was within the acceptable range presented in the lab control letter. All tests conducted with the sea urchin were toxic compared to the control (artificial seawater). In turn, the tests with benthic copepods exhibited toxicity in most of the tested samples, but station 8 exhibited no toxic response in any of the campaigns, whereas station 1 exhibited toxicity only in campaigns B and C, when compared to the control group. In general, the sediments of station 4 were the most toxic to copepods, whereas sea urchins exhibited a greater variation of toxicity throughout the stations and sampling campaigns; however, station 1 was the least toxic for these organisms in the development test.

Table 2. Copepods reproduction (offspring) after 10 days of exposure to sediments and the effects of samples on the fertilization and development of sea urchin pluteus. All results are expressed as the mean values \pm standard deviation. Toxicity of whole sediment (copepod *Nitokra* sp. reproduction) and elutriates (sea urchin *Echinometra lucunter* fertilization and embryo-larvae development) from stations of the Aracruz's coast in the five campaigns compared to sediment control. NT indicates nontoxic and T indicates toxic.

Campaign/site	Copepod (reproduction)		Sea urchin (fertilization)		Sea urchin (development)	
Campaign A						
1	12.22 \pm 2.80	NT	17.5 \pm 2.38	T	63 \pm 5.94	T
2	4.98 \pm 1.00	T	17.375 \pm 5.63	T	31.375 \pm 1.65	T
3	6.33 \pm 0.87	T	29.875 \pm 2.69	T	25.375 \pm 3.73	T
4	8.00 \pm 1.09	T	16 \pm 1.08	T	34.125 \pm 2.63	T
5	5.51 \pm 0.81	T	12.75 \pm 2.33	T	35.875 \pm 1.03	T
8	19.18 \pm 4.95	NT	13.125 \pm 3.64	T	26.25 \pm 1.5	T
9	4.16 \pm 0.66	T	26.75 \pm 4.80	T	16.5 \pm 2.89	T
10	11.76 \pm 1.51	T	3.625 \pm 1.25	T	27.75 \pm 2.4	T
Campaign B						
1	16.68 \pm 0.61	T	27.75 \pm 15.31	T	60.25 \pm 6.18	T
2	10.86 \pm 0.44	T	24.75 \pm 7.89	T	16.5 \pm 1.58	T
3	4.26 \pm 0.19	T	20.5 \pm 19.84	T	17.75 \pm 5.36	T
4	3.92 \pm 0.46	T	33 \pm 3.92	T	23.625 \pm 3.04	T
5	5.37 \pm 0.35	T	23.75 \pm 5.32	T	14.875 \pm 2.39	T
6	4.80 \pm 0.38	T	20.25 \pm 6.29	T	12.25 \pm 1.04	T
7	10.23 \pm 1.85	T	33 \pm 10.23	T	12.25 \pm 1.19	T
8	20.40 \pm 2.79	NT	43.75 \pm 13.57	T	10.5 \pm 1.73	T
9	8.58 \pm 1.53	T	57.5 \pm 5.20	T	19.375 \pm 1.80	T
Campaign C						
1	18.88 \pm 0.57	T	26.25 \pm 7.63	T	58 \pm 8.16	T
2	9.00 \pm 2.04	T	21.25 \pm 5.50	T	27.25 \pm 3.59	T
3	6.45 \pm 1.24	T	35.5 \pm 5.80	T	22.75 \pm 3.50	T
4	5.71 \pm 0.53	T	28.25 \pm 2.87	T	20.5 \pm 6.45	T
5	6.88 \pm 0.71	T	17.75 \pm 5.38	T	25.25 \pm 5.19	T
6	14.46 \pm 8.48	NT	26.75 \pm 5.12	T	18.25 \pm 3.30	T
7	10.40 \pm 1.23	T	26 \pm 3.74	T	13.5 \pm 3.00	T
8	14.38 \pm 1.15	NT	30 \pm 5.16	T	11.25 \pm 2.50	T
9	10.54 \pm 0.68	T	36.25 \pm 5.32	T	18.5 \pm 3.42	T
10	11.38 \pm 3.12	T	17.75 \pm 2.99	T	26.5 \pm 4.65	T
Campaign D						
1	18.70 \pm 1.05	NT	17.125 \pm 3.64	T	60.75 \pm 2.06	T
2	8.73 \pm 1.36	T	30.75 \pm 4.80	T	23.5 \pm 1.91	T
3	4.39 \pm 1.37	T	7.625 \pm 1.25	T	22 \pm 4.24	T
4	4.34 \pm 1.12	T	21.5 \pm 2.38	T	22.5 \pm 3.70	T
5	4.42 \pm 0.67	T	21.375 \pm 5.63	T	21.75 \pm 3.59	T
6	4.10 \pm 1.27	T	33.875 \pm 2.69	T	17 \pm 1.63	T
7	10.39 \pm 0.86	T	20 \pm 1.08	T	14.75 \pm 1.71	T
8	14.72 \pm 1.49	NT	16.75 \pm 2.33	T	15.75 \pm 5.74	T
9	9.10 \pm 1.11	T	29 \pm 3.14	T	22 \pm 3.65	T
Campaign E						
1	15.14 \pm 2.95	NT	21.75 \pm 1.71	T	54.5 \pm 2.52	T
2	8.03 \pm 1.68	T	26.25 \pm 3.10	T	17 \pm 1.83	T
3	6.21 \pm 0.63	T	10.5 \pm 1.73	T	15.25 \pm 4.19	T
4	5.08 \pm 0.29	T	23.25 \pm 0.96	T	17.25 \pm 3.59	T
5	7.81 \pm 3.14	T	29.875 \pm 2.69	T	15.25 \pm 3.50	T
6	5.67 \pm 2.39	T	19 \pm 2.71	T	10.25 \pm 1.26	T
7	8.33 \pm 1.09	T	23.5 \pm 3.00	T	7.75 \pm 1.71	T
8	10.24 \pm 0.88	T	24 \pm 2.16	T	6.25 \pm 0.96	T
9	8.69 \pm 0.43	T	19.5 \pm 1.29	T	14 \pm 2.16	T

The results of the PCA analysis are shown in Table 3. Combined, the first three axes explain 67.09 % of the total variance for all campaigns. The first axis represents 35.98 % of the total variance, with a portion of the positive load attributed to the metals Pb, Cr, Fe and Ni, whereas the larger negative loads are attributed to

the granulometric fraction of the sediment (Sediment PC1) and the reproduction rate of copepods (Reproduction).

Table 3. Eigenvectors and correlation coefficient from principal component analysis (PCA) based on environmental variables and sediment toxicity from all sampling sites in campaign A, B, C, D and E.

Correlation coefficient			
Variables	Axis 1	Axis 2	Axis 3
% OM	0.20241	-0.018695	0.54342
Phosphorus	0.11211	0.33968	0.19817
TOC	-0.036408	-0.19109	-0.58809
Cd	-0.12105	0.41121	0.22608
Pb	0.38009	0.1766	-0.039075
Cr	0.38632	-0.10212	0.047994
Fe	0.42044	0.083704	-0.067761
Mn	0.040632	0.50863	-0.13092
Ni	0.41967	0.0069054	-0.017552
As	0.1824	0.37381	-0.29205
Reproduction	-0.31146	0.12603	0.13052
Fertilization	0.028805	0.075313	0.23813
Development	-0.10946	0.42674	-0.27611
Sediment PC1	-0.37301	0.16702	0.085588
Eigenvalue	5.03646	2.59588	1.75991
% variance	35.975	18.542	12.571
Total variance	35.975	54.517	67.088

Figure 2 was generated to reveal the trend of variables regarding samplings and exhibits a discrete relationship between the granulometric fraction and the reproduction rate of copepods (Reproduction). These data demonstrate a tendency for sampling station 1 in the last three campaigns. A discrete relationship is also observable between the concentration of cadmium and the normal development rate of sea urchin larvae (Development), with a tendency for sampling station 1 in the first two campaigns. However, the sea urchin fertilization rate (Fertilization) did not exhibit a strong trend with any evaluated factor, which emphasizes the influence of other chemical or physical agents in its results.

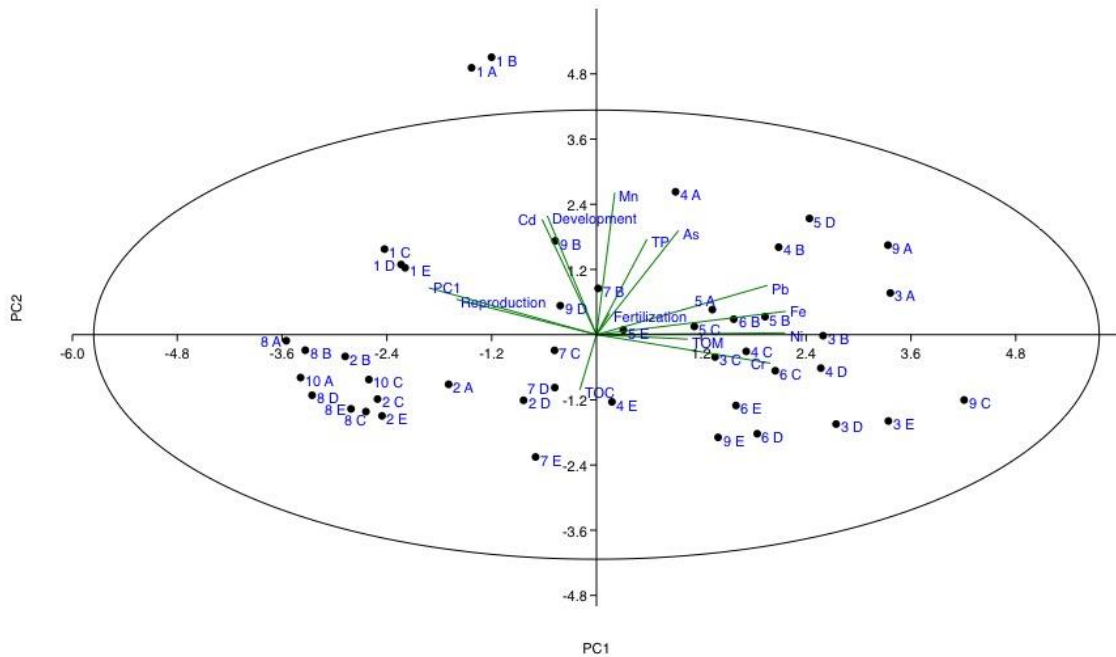


Figure 2. Ordination results of the principal component analysis (PCA) based on environmental variables and sediment toxicity from ten stations of the Aracruz's coast in the five campaigns. Reproduction results refer to the copepod test (*Nitokra* sp.), fertilization results refer to the test with gametes of sea urchin (*Echinometra lucunter*) and development results refer to the chronic toxicity test with embryos of sea urchin.

The correlation coefficients of the fourteen distinct variables analyzed are shown in Table 4, containing some relevant relationships. There were negative correlations between the sediment granulometric fraction (Sediment PC1) and the vast majority of the analyzed chemical parameters. The reproduction rate of copepods (*Nitokra* sp.) was the biological parameter with the highest correlation coefficients. This variable was positively associated with the sediment granulometric fraction (Sediment PC1) and negatively associated with Pb, Cr, Fe and Ni.

Table 4. Correlations of environmental variables and sediment toxicity from stations of the Aracruz's coast (all stations and campaigns combined). Reproduction results refer to the copepod test (*Nitokra* sp.), fertilization results refer to the test with gametes of sea urchin (*Echinometra lucunter*) and development results refer to the chronic toxicity test with embryos of sea urchin.

	TOM	TP	TOC	Cd	Pb	Cr	Fe	Mn	Ni	As	Reproduction	Fertilization	Development	Sediment PCI
TOM	1.00													
TP	0.11601	1.00												
TOC	-0.47266	-0.45351	1.00											
Cd	0.0067851	0.21018	-0.34102	1.00										
Pb	0.3571	0.19038	-0.089625	0.066585	1.00									
Cr	0.46393	0.047602	0.011788	-0.30309	0.73764	1.00								
Fe	0.37645	0.33132	-0.052662	-0.25536	0.79176	0.77286	1.00							
Mn	-0.0047842	0.22799	-0.017599	0.47985	0.31677	-0.034043	0.15255	1.00						
Ni	0.4323	0.13489	-0.01286	-0.17704	0.89109	0.89263	0.86177	0.11456	1.00					
As	-0.14447	0.48636	0.032567	0.026042	0.40177	0.13825	0.58589	0.48767	0.26648	1.00				
Reproduction	-0.019036	-0.14433	0.010461	0.2941	-0.46161	-0.47976	-0.60484	0.042102	-0.56217	-0.27177	1.00			
Fertilization	0.19965	0.084075	-0.054043	0.038728	-0.0050585	0.094447	0.06993	0.19544	0.007295	0.10908	0.06027	1.00		
Development	-0.27077	0.083324	0.028537	0.32381	0.079612	-0.27971	-0.10873	0.55971	-0.13184	0.30084	0.41697	-0.20639	1.00	
Sediment PC1	-0.31673	-0.4749	-0.055029	0.40463	-0.62361	-0.63646	-0.73587	0.11491	-0.75266	-0.20461	0.69299	0.079678	0.31924	1.00

4. DISCUSSION

Previous studies evaluating the sedimentary composition of the Aracruz coast had already revealed high levels of As (i.e., above the legal threshold of 70 mg.Kg^{-1}) (Mirlean et al., 2012, 2011). According to Mirlean et al. (2012), the high As enrichment of the sediment collected on the coast of Aracruz possibly originates from two main sources, ferruginous sands of the Barreiras Formation (“Barreiras Group” (BG) formation) and the development of established reefs of biogenic carbonate bodies, because Fe (III) oxides possess an efficient capacity to uptake As in aquatic environments (Pierce and Moore, 1982) as well as limestone bioclasts (Mirlean et al., 2012). Other studies have also reported the distribution of As in sediments of the Brazilian continental shelf, such as the study by Sá et al. (2006) who detected high loads of As in the Paranaguá Bay (southern Brazil) but could not identify the source. In another study, (Mirlean et al., 2003) described the distribution of As in the sediments of the estuary of Patos Lagoon (southern Brazil). The strong contamination was attributed to the production of fertilizers because As and its compounds are widely used in the production of pesticides, fungicides, herbicides and insecticides and as a wood preservative, which contributes to the increase of this compound in the marine environment (Reimann et al., 2009). However, there are also reports of large concentrations of As in marine sediments that are not contaminated (up to 170 mg.Kg^{-1}) (Reimann et al., 2009; Widerlund and Ingri, 1995), as result of elemental redistribution in the sediment column during early diagenesis (Chaillou et al., 2003).

Nonetheless, the great abundance of Fe in the samples may be because this element is strongly associated with the sediment particles because it is a major constituent of clay minerals (Aloupi and Angelidis, 2001; Burton et al., 2005; Rubio et al., 2000). The other metallic elements measured in this study may come from several influential anthropogenic sources in the region, such as metal-based antifouling paints used by boats (Hugget et al., 1992); the work by (Turner, 2010) demonstrated that antifouling paint can be a source of Cu, Cd, Pb and Zn in marine sediments.

However, the presence of an element itself is not enough as its toxicity also depends on its bioavailability, which can be strongly influenced by factors such as the size of the sediment grains, salinity, pH and organic matter content (Choueri et al., 2009). Negative correlations of the sediment’s granulometric fraction for the majority

of the analyzed chemical parameters demonstrates a significant ability of the finest sediment to accumulate compounds, primarily metal. Lower granulometric fractions are associated with higher percentages of organic matter, which may contribute to the adsorption of chromium, Ni, Fe and Pb in the analyzed samples.

During this study, the monitored area underwent a significant dredging operation with the installation of a new harbor close to a shipyard, and smaller dredging operations are routinely conducted in the region to excavate access channels and berthing areas for the purpose of maintenance or increasing water depth. This procedure remobilizes the bottom sediment, which can produce physical (an increase of turbidity of the water column) and chemical changes (an increase in organic matter, nutrients and contaminant loads), causing the compounds that were adsorbed in sediments to again be bioavailable in the water column, resulting in greater contamination of organisms in both the dredged area and adjacent areas (Bolam, 2014; Lions et al., 2010; Stronkhorst et al., 2003; Torres et al., 2009; Zimmerman et al., 2003).

Bioassays are applied throughout the world for the evaluation of bioavailability and consequent toxicity, providing information on how living systems respond to the influence of contaminants (Anderson et al., 2007; Cesar et al., 2007; Losso et al., 2004). In the present study, the sediment toxicity tests demonstrated positive results in all analyzed endpoints (reproduction, fertilization and development) in the organisms used as bioindicators (copepods and sea urchins). Copepod reproduction exhibited the least sensitive response by presenting negative results (non-toxic – NT) in some samples, indicating station 8 was the least affected and had the lowest levels of metals. This sampling station is located within the Seaweed Coast APA and Santa Cruz REVIS – ES, in front of the mouth of the Piraquê-Açu River, whose flowrate force possibly contributes to the non-accumulation of fine sediments, thereby decreasing the adsorption of toxic compounds. Sampling station 1 presents non-toxic results in two of the campaigns, possibly reflecting the effect of the dredging processes of the navigation channel maintenance conducted on site that removes fine sediments. However, sampling station 4 had the lowest reproductive rate recorded among the evaluated stations and also recorded the highest concentrations of metals, which may have contributed to the reproduction rate, at least partially. This station is located near regions used to deposit excess dredging materials, which can

contribute to the deposition of finer sediments with a greater capacity for compound accumulation.

As all tests performed with *E. lucunter* proved positive (toxic), the sensitivity of this organism to local contamination is evident. The fertilization test has a much more rapid response, but several studies indicate the embryo development test to be more sensitive to various agents, such as hydrocarbons, metals, ammonia, sulfide, organic tin compounds and environmental samples (Allen, 1971; Dinnel et al., 1989; Kobayashi et al., 1994; Losso et al., 2004; Ozretić and Krajnović-Ozretić, 1985), in addition to indicating a more robust response (Phillips et al., 1998). The process of gastrulation and the formation of pluteus larva appears to be the weakest link in the early stages of sea urchin development (Saco-Álvarez et al., 2010). Formations of the larval skeleton and metamorphosis were identified as the most sensitive phases in this process (Heslinga, 1976; Kobayashi, 1977). Detailed morphological studies with bivalve embryos exposed to metals concluded that gastrulation and shell formation were the most sensitive processes in the initial development of invertebrates (Zhadan et al., 1992). Waterman (1937) said that gastrulation, i.e., the formation of endoderm and skeleton differentiation is more susceptible to environmental disturbances than the fertilization phase in the sea urchin *Arbacia punctulata*. However, the evaluation of some samples can provide different results as in the case of sewage tested by Dinnel and Stober (1987), which proved to be more toxic to the sperm of sea urchins of the species *Strongylocentrotus droebachiensis* than to their embryos. In our study, sampling station 1, by presenting less toxic results in the development test, reinforces the idea that the constant dredging processes conducted in the region to remove accumulated fine sediment contains the most contaminated sediment.

The level of toxicity revealed by the tests, including in the environmental protection areas, was surprising with regards to the physicochemical results because, with the exception of As, all other parameters evaluated were below the limit established by CONAMA Resolution 454/12, which contradicts the biological findings. Nilin et al. (2013) suggested that for sediments of tropical environments, toxic conditions can occur even when the metal levels are less than the threshold effect level (TEL). Buruaem et al. (2012), using geochemical criteria, showed that for toxic sediments of the Mucuripe Harbor (State of Ceará), moderate concentrations of metals can cause environmental impacts. These results emphasize the importance of

toxicity tests for the protection of sensitive environments, such as tropical regions and protected areas because it could detect effects that were not detected by geochemical analysis (Nilin et al., 2013).

However, the correlation coefficients found in our PCA analysis were “weak”, which does not adequately explain the variance in the original data set. Liu et al., (2003) rated the load factors found in the PCA analysis as “strong”, “moderate” and “low” corresponding to the absolute load values of > 0.75 , $0.75-0.50$ and $0.50-0.3$, respectively. This fact indicates the possibility that the toxicity observed in the marine sediment of Aracruz has been caused by other metals or other chemicals and physical agents, or stress factors not measured in this study, which alone or synergistically influence the assessed elements. The synergistic effects produced by metals and organic pollutants have been frequently documented (Doney, 2010) and cannot be excluded from the toxic impact observed in the present study. According to Cesar et al. (2007), most anthropogenic chemicals and waste materials, including organic and inorganic toxic chemicals, contribute to the degradation of aquatic environments that are constantly affected by multiple sources of contamination around the world.

In the study of Cesar et al., (2007), the effect of the first factor resulting from the principal component analysis was representative (48.8 %), explaining the environmental degradation caused by metals related to the high mortality rate in the amphipods toxicity test. The second factor (20.46 %) showed a strong environmental change due to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and Ni. (Inmaculada Riba et al., 2004) also found hydrocarbon contamination in the sediments of Ría de Huelva (a Spanish estuary). These examples may indicate what source is responsible for the results of this study, but unfortunately they were not measured.

In addition to the PAHs, it is important to note that the region has a pulp mill, whose effluent can potentially include a large amount of non-biodegradable organochlorine compounds, many of which are considered highly toxic (Ahtiainen et al., 1996; Baig and Liechti, 2001). The paper and cellulose industry is one of the world’s largest polluters, releasing a variety of gases, liquid effluents and solid waste into the environment (Ali and Sreerishnan, 2001). The cellulose industry generates a range of 25 to 80 m³ of effluent per ton of produced pulp (Thompson et al., 2001). However, in recent years, guidelines have been created, leading to changes in the processes of production, treatment and discharge of effluents, resulting in a

significant reduction in the acute environmental effects (Hewitt and Marvin, 2005), but still can have chronic toxicity (Milestone et al., 2012).

Nevertheless, our results indicate a high level of contamination in the study area during the analyzed period (December 2014 to May 2015), which was certainly aggravated with the arrival, in November 2015, of the waste iron mining dam incident. The data found in this study represent past information that can serve as a basis for studies that include biomonitoring, impact measurement and environmental mitigation.

5. CONCLUSION

The marine sediment of the Aracruz coastline was found to be toxic, in particular for the evaluated organisms (*Nitokra* sp. and *E. lucunter*), in the analyzed fraction (whole sediment and elutriate) and for the observed biological effects (reproduction, fertilization and development) endpoints. Nevertheless, these results strongly suggest the contribution of grain size influence on *Nitokra* sp. reproduction and other factors that were not measured in this study, principally related to the various pollution sources of and to the region, and serve as a precautionary warning, especially considering the recent impacts the area has faced.

Also the set of statistical techniques used in this study was useful to quantify the contribution of measured physicochemical variables that best explain the ecotoxicological responses found.

6. REFERENCES

- Ablanedo, N., González, H., Ramirez, M., Torres, I., 1990. Evaluación del erizo de mar *Echinometra lucunter* como indicador de la contaminación por metales pesados. *Aquat. Living Resour.* 3, 113–120. doi:10.1051/alr
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2006. Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (*Echinodermata* - *Echinoidea*) - ABNT NBR 15350.
- ABNT NBR 15350 - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2012. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (*Echinodermata*; *Echinoidea*);
- ABNT NBR 15469 - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2015. Ecotoxicologia - Coleta, preservação e preparo de amostras.
- Ahtainen, J., Nakari, T., Silvonen, J., 1996. Toxicity of TCF and ECF pulp bleaching effluents assessed by biological toxicity tests., in: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Florida, pp. 33–40.
- Akcha, F., Tanguy, a., Leday, G., Pelluhet, L., Budzinski, H., Chiffolleau, J.F., 2004. Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast. *Mar. Environ. Res.* 58, 753–756. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.090
- Ali, M., Sreekrishnan, T., 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Adv. Environ. Res.* 5, 175–196. doi:10.1016/S1093-0191(00)00055-1
- Allen, H., 1971. Effects of petroleum fractions on the early development of a sea urchin. *Mar. Pollut. Bull.* 2, 138–140. doi:10.1016/0025-326X(71)90034-8
- Almeida, E.A. de, 2003. Avaliação de variações bioquímicas em moluscos bivalves em resposta ao estresse ambiental.
- Aloupi, M., Angelidis, M., 2001. Geochemistry of natural and anthropogenic metals in the coastal sediments of the island of Lesbos, Aegean Sea. *Environ. Pollut.* 113, 211–219. doi:10.1016/S0269-7491(00)00173-1
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., Carrião Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Eliza Ronsein, G., Alexandre Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Maria Gracioso Martins, A., Helena Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146, 588–600. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.040
- Anderson, B., Hunt, J., Phillips, B., Thompson, B., Lowe, S., Taberski, K., Scott Carr, R., 2007. Patterns and trends in sediment toxicity in the San Francisco Estuary. *Environ. Res.* 105, 145–155. doi:10.1016/j.envres.2006.07.005
- Andrade, V.M., de Freitas, T.R.O., da Silva, J., 2004. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 560, 57–67. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.02.006
- Andral, B., Galgani, F., Tomasino, C., Bouchoucha, M., Blottiere, C., Scarpato, A.,

- Benedicto, J., Deudero, S., Calvo, M., Cento, A., Benbrahim, S., Boulahdid, M., Sammari, C., 2011. Chemical Contamination Baseline in the Western Basin of the Mediterranean Sea Based on Transplanted Mussels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 261–271. doi:10.1007/s00244-010-9599-x
- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 704–712. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.05.008
- APHA - American Public Health Association, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. Washington.
- ASTM - American Society for Testing and Materials, 2012. *Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos*.
- Atli, G., Canli, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 145, 282–7. doi:10.1016/j.cbpc.2006.12.012
- Ausili, A., Mecozzi, M., Gabellini, M., Ciuffa, G., Mellara, F., 1998. Physico-chemical characteristics and multivariate analysis of contaminated harbour sediments. *Water Sci. Technol.* 37, 131–139.
- Azqueta, A., Collins, A.R., 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* 87, 949–68. doi:10.1007/s00204-013-1070-0
- Baig, S., Liechti, P.A., 2001. Ozone treatment for biorefractory COD removal. *Water Sci. Technol.* 43, 197–204.
- Bainy, A.C.D., Almeida, E.A., Müller, I.C., Ventura, E.C., Medeiros, I.D., 2000. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar. Environ. Res.* 50, 411–416. doi:10.1016/S0141-1136(00)00039-8
- Barbosa, J.S., Cabral, T.M., Ferreira, D.N., Agnez-Lima, L.F., Batistuzzo de Medeiros, S.R., 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 320–325. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.10.008
- Barnes, R.D., 2006. *Zoologia dos invertebrados*. Roca.
- Barnes, R.S.K., Calow, P.P., Olive, P.J.W., Golding, D.W., Spicer, J.I., 2009. *The Invertebrates: A Synthesis*. Wiley-Blackwell.
- Barra, C.M., Santelli, R.E., Abrão, J.J., 2000. Especificação de Arsênio -Uma Revisão. *Quim. Nova* 23, 58–70.
- Baršienė, J., Lehtonen, K.K., Koehler, A., Broeg, K., Vuorinen, P.J., Lang, T., Pempkowiak, J., Šyvokienė, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Repečka, R., Vuontisjärvi, H., Kopecka, J., 2006. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipėda-Būtingė area (Baltic Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 53, 422–436. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.03.009
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., Widdows, J., 1985. *The Effects of*

Stress and Pollution on Marine Animals. Praeger, New York.

- Bejarano, A.C., Chandler, G.T., He, L., Coull, B.C., 2006. Individual to population level effects of South Louisiana crude oil water accommodated hydrocarbon fraction (WAF) on a marine meiobenthic copepod. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 332, 49–59. doi:10.1016/j.jembe.2005.11.006
- Belabed, B.-E., Laffray, X., Dhib, A., Fertouna-Belakhal, M., Turki, S., Aleya, L., 2013. Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria), *Marine Pollution Bulletin*. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.06.004
- Belivermis, M., Kiliç, O., Çotuk, Y., 2016. Assessment of metal concentrations in indigenous and caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*) on entire Turkish coastline. *Chemosphere* 144, 1980–1987. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.098
- Bellotto, V.R., De Brito, P.C., Manzoni, G., Wegner, E., 2005. Biomonitoramento ativo de metais traço e efeito biológico em mexilhões transplantados para área de influência de efluente de indústria de beneficiamento de aço - Fase I. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.* 9, 33. doi:10.14210/bjast.v9n2.p33-37
- Bend, J.R., James, M.O., 1978. No Title Xenobiotic metabolism in marine freshwater species, in: Malins, D.C., Sargent, J. (Eds.), *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, London, England, pp. 125–188.
- Bianchi, J., Espindola, E.L.G., Marin-Morales, M.A., 2011. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 826–833. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.11.006
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.* 463, 33–51. doi:10.1016/S1383-5742(00)00004-1
- Blackmore, G., Wang, W.-X., 2003. Comparison of metal accumulation in mussels at different local and global scales. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 388–395. doi:10.1002/etc.5620220221
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913–21. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.049
- Bolam, S.G., 2014. Macrofaunal recovery following the intertidal recharge of dredged material: A comparison of structural and functional approaches. *Mar. Environ. Res.* 97, 15–29. doi:10.1016/j.marenvres.2014.01.008
- Bonfim, C.L.L., 2005. Efeitos do fenol e 4-clorofenol sobre o desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758): avaliação dessas substâncias como referência. Universidade Federal da Bahia.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. *Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture*. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brooks, R., Rumsby, M., 1967. Studies on the uptake of cadmium by the oyster, *Ostrea sinuata* (Lamarck). *Mar. Freshw. Res.* 18, 53. doi:10.1071/MF9670053
- Brooks, S.J., Harman, C., Grung, M., Farmen, E., Ruus, A., Vingen, S., Godal, B.F., Baršienė, J., Andreikėnaitė, L., Skarphéðinsdóttir, H., Liewenborg, B., Sundt, R.C., 2011. Water Column Monitoring of the Biological Effects of Produced Water from the Ekofisk Offshore Oil Installation from 2006 to 2009. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 74, 582–604. doi:10.1080/15287394.2011.550566
- Brown, K.R., McPherson, R.G., 1992. Concentrations of copper, zinc and lead in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) from the Georges River, New South Wales. *Sci. Total Environ.* 126, 27–33.
- Bubb, J.M., Lester, J.N., 1991. An Honour Volume For Eric I. Hamilton The impact of heavy metals on lowland rivers and the implications for man and the environment. *Sci. Total Environ.* 100, 207–233. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(91)90379-S
- Burgeot, T., Woll, S., Galgani, F., 1996. Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French coasts. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 39–46. doi:10.1016/0025-326X(96)89526-9
- Burton, E.D., Phillips, I.R., Hawker, D.W., 2005. Trace metal distribution and enrichment in benthic, estuarine sediments: Southport Broadwater, Australia. *Environ. Geochem. Health* 27, 369–83. doi:10.1007/s10653-004-7086-x
- Buruaem, L.M., Hortellani, M.A., Sarkis, J.E., Costa-Lotufo, L. V, Abessa, D.M.S., 2012. Contamination of port zone sediments by metals from Large Marine Ecosystems of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 479–88. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.017
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4
- Cajaraville, M.P., Olabarrieta, I., Marigomez, I., 1996. In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 253–60. doi:10.1006/eesa.1996.0108
- Canova, S., Degan, P., Peters, L., Livingstone, D., Voltan, R., Venier, P., 1998. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 399, 17–30. doi:10.1016/S0027-5107(97)00263-7
- Carletti, E., Sulpizio, M., Bucciarelli, T., Del Boccio, P., Federici, L., Di Ilio, C., 2008. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. *Aquat. Toxicol.* 90, 48–57. doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.015
- Castro, H., Aguilera, P.A., Martinez Vidal, J.L., Carrique, E.L., 1999. Differentiation of Clams from Fishing Areas as an Approximation to Coastal Quality Assessment. *Environ. Monit. Assess.* 54, 229–237. doi:10.1023/A:1005960212211

- Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001
- Cesar, A., Choueri, R.B., Riba, I., Morales-Caselles, C., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Abessa, D.M.S., DelValls, T.A., 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. doi:10.1016/j.envint.2006.11.007
- Cesar, A., Lia, L.R.B., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cortez, F.S., Choueri, R.B., Orte, M.R. De, Rachid, B.R.F., 2014. Science of the Total Environment Environmental assessment of dredged sediment in the major Latin American seaport (Santos , São Paulo — Brazil): An integrated approach. *Sci. Total Environ.* 497–498, 679–687. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.037
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1999. Metodo de Ensaio: Agua do Mar-teste de Toxicidade Cronica de Curta Duracao com *Lytechinus variegatus*, Lamark, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). Cia. De Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de Sao Paulo, São Paulo.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1992. Água do Mar – teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea) Norma Técnica L5.250.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1990. Projeto: Desenvolvimento de implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos.
- Chaillou, G., Schäfer, J., Anschutz, P., Lavaux, G., Blanc, G., 2003. The behaviour of arsenic in muddy sediments of the Bay of Biscay (France). *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2993–3003. doi:10.1016/S0016-7037(03)00204-7
- Chan, H.M., 1989. Temporal and spatial fluctuations in trace metal concentrations in transplanted mussels in Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.* 20, 82–86. doi:10.1016/0025-326X(89)90231-2
- Chan, H.M., 1988. Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. *Mar. Ecol.* 48, 295–303.
- Chandler, T.G., Cary, T.L., Volz, D.C., Walse, S.S., Ferry, J.L., Klosterhaus, S.L., 2004. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 117. doi:10.1897/03-124
- Chapman, P.M., McDonald, B.G., Lawrence, G.S., 2002. Weight-of-Evidence Issues and Frameworks for Sediment Quality (And Other) Assessments. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 8, 1489–1515. doi:10.1080/20028091057457
- Chase, M.E., Jones, S.H., Hennigar, P., Sowles, J., Harding, G.C.H., Freeman, K., Wells, P.G., Krahforst, C., Coombs, K., Crawford, R., Pederson, J., Taylor, D., 2001. Gulfwatch: Monitoring spatial and temporal patterns of trace metal and organic contaminants in the Gulf of Maine (1991-1997) with the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 490–504. doi:10.1016/S0025-326X(00)00193-4

- Cheng, T.C., 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266, 343–79.
- Cheung, C.C., Zheng, G., Lam, P.K., Richardson, B., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 181–191. doi:10.1016/S0025-326X(01)00301-0
- Cheung, C.C., Zheng, G., Li, A.M., Richardson, B., Lam, P.K., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 52, 189–203. doi:10.1016/S0166-445X(00)00145-4
- Chiu, S.T., 1988. *Anthocidaris crassisipina* (Echinodermata: chinoidea) grazing epibenthic macroalgae in Hong Kong. *Asian Mar. Biol.* 5, 123–132.
- Choueri, R.B., Cesar, A., Abessa, D.M.S., Torres, R.J., Morais, R.D., Riba, I., Pereira, C.D.S., Nascimento, M.R.L., Mozeto, A.A., DelValls, T.A., 2009. Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South Atlantic littoral zones: Comparison against national and international sediment quality benchmarks. *J. Hazard. Mater.* 170, 320–331. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.093
- Coimbra, A.G., 2003. Distribuição de metais pesados em moluscos e sedimentos nos manguezais de Coroa Grande e da Enseada das Garças, Baía de Sepetiba, RJ. Universidade Federal Fluminense.
- Collins, A.R., Ai-guo, M., Duthie, S.J., 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res. Repair* 336, 69–77. doi:10.1016/0921-8777(94)00043-6
- CONAMA, C.N.D.M.A., 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispões sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências., Diário Oficial da União.
- Conners, D.E., Black, M.C., 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 362–71.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 106–21. doi:10.1006/eesa.1999.1842
- Cruz, A.C., 2001. Seleção de substâncias orgânicas como referência em testes de toxicidade com embriões de ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1928): Controle da qualidade analítica de testes ecotoxicológicos. Universidade Federal da Bahia.
- D'Silva, C., Kureishy, T.W., 1978. Experimental studies on the accumulation of copper and zinc in the green mussel. *Mar. Pollut. Bull.* 9, 187–190.
- Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. 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. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(03\)00005-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00005-9)
- DelValls, T.A., Forja, J.M., Gómez-Parra, A., 1998. The use of multivariate analysis to link sediment contamination and toxicity data to establish sediment quality guidelines: An example in the Gulf of Cádiz (SW, Spain). *Ciencias Mar.* 24, 127–154.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161–72. doi:10.1007/BF00117081
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 5–32. doi:10.1007/s10565-008-9072-z
- Díaz, A., Carro, S., Santiago, L., Estévez, J., Guevara, C., Blanco, M., Sánchez, L., Sánchez, L., López, N., Cruz, D., López, R., Cuetara, E.B., Fuentes, J.L., 2009. Estimates of DNA strand breakage in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) leukocytes measured with the Comet and DNA diffusion assays. *Genet. Mol. Biol.* 32, 367–72. doi:10.1590/S1415-47572009005000030
- Diegues, A.C., 2001. *Ecologia humana e planejamento costeiro*, 2nd ed. Edusp, São Paulo.
- Dinnel, P.A., Link, J.M., Stober, Q.J., Letourneau, M.W., Roberts, W.E., 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 748–755. doi:10.1007/BF01225012
- Dinnel, P.A., Stober, Q.J., 1987. Application of the sea urchin sperm bioassay to sewage treatment efficiency and toxicity in marine waters. *Mar. Environ. Res.* 21, 121–133. doi:10.1016/0141-1136(87)90046-8
- Doney, S.C., 2010. The Growing Human Footprint on Coastal and Open-Ocean Biogeochemistry. *Science* (80-.). 328, 1512 LP-1516.
- Environment Canada, 1997. *Biological Test Method: Fertilization Assay using Echinoids (sea urchins and sand dollars)*. Method Development and Applications. Environmental Technology Center, Ottawa.
- Environment Canada, 1999. *Guidance document on application and interpretation of single-species testes in environmental toxicology*.
- Environment Canada, 1995. *Guidance document on measurements of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant*.
- Environment Canada, 1990. *Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants*.
- Falk-Petersen, I.-B., 1979. Toxic effects of aqueous extracts of ekofisk crude oil, crude oil fractions, and commercial oil products on the development of sea urchin eggs. *Sarsia* 64, 161–169. doi:10.1080/00364827.1979.10411377
- Fang, J.K.H., Wu, R.S.S., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Shin, P.K.S., 2008. Induction, adaptation and recovery of lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 467–472. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.03.038>

- Fichet, D., Radenac, G., Miramand, P., 1998. Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity, *Marine Pollution Bulletin*. Pergamon. doi:10.1016/S0025-326X(97)00190-2
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51, 115–38.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317, 207–233. doi:10.1016/S0048-9697(03)00141-4
- Fliedner, A., Klein, W., 1996. Effects of Lindane on the Planktonic Community in Freshwater Microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 228–235. doi:http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1996.0029
- Folk, R., 1974. *Petrology of Sedimentary Rocks*. Hemphills Bookstore, Austin.
- Fossi, M.C., Marsili, L., Neri, G., Casini, S., Bearzi, G., Politi, E., Zanardelli, M., Panigada, S., 2000. Skin biopsy of Mediterranean cetaceans for the investigation of interspecies susceptibility to xenobiotic contaminants. *Mar. Environ. Res.* 50, 517–521. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00127-6
- Freitas, R., Ramos Pinto, L., Sampaio, M., Costa, A., Silva, M., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Figueira, E., 2012. Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 110, 43–53. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2012.01.011
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 681, 80–92. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001
- Fuentes-Rios, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gavilán, J.F., Barra, R., 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): Biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere* 61, 192–199. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.062
- Fung, C.N., Lam, J.C.W., Zheng, G.J., Connell, D.W., Monirith, I., Tanabe, S., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2004. Mussel-based monitoring of trace metal and organic contaminants along the east coast of China using *Perna viridis* and *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* 127, 203–216. doi:10.1016/j.envpol.2003.08.007
- Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquat. Toxicol.* 49, 27–37. doi:10.1016/S0166-445X(99)00073-9
- Galvão, J.A., 2004. Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP. Universidade de São Paulo.
- Giesy, J.P., Hook, R.A., 1989. Freshwater sediment quality criteria: Toxicity bioassessment., in: Baudo, R., Giesy, J.P., Muntau, H. (Eds.), *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp.

265–348.

- Gillikin, D.P., Dehairs, F., Baeyens, W., Navez, J., Lorrain, A., Andr??, L., 2005. Inter- and intra-annual variations of Pb/Ca ratios in clam shells (*Mercenaria mercenaria*): A record of anthropogenic lead pollution? *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1530–1540. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.06.020
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 2009. The Mussel Watch. *Environ. Conserv.* 5, 101–125. doi:10.1017/S0376892900005555
- Goldburg, R., Elliot, M., Naylor, R.L., 2001. *Marine Aquaculture in the United States: Environmental impacts and policy options*. Pew Oceans Commission, Arlington, Virginia.
- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. Vit.* 17, 539–546. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6
- Gowland, B.T.G., McIntosh, A.D., Davies, I.M., Moffat, C.F., Webster, L., 2002. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Mar. Environ. Res.* 54, 231–235. doi:10.1016/S0141-1136(02)00129-0
- Gray, J.S., 1992. Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection. *Mar. Pollut. Bull.* 25, 48–50. doi:10.1016/0025-326X(92)90184-8
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77, 218–31.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- HABTEC - Engenharia Sanitária e Ambiental Ltda, 1997. *Diagnóstico do Plano Diretor das Bacias dos rios Santa Maria da Vitória e Jucu., Relatório Diagnóstico*.
- Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G.T., Shaw, T.J., 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar. Environ. Res.* 51, 247–64.
- Hardiman, S., Pearson, B., 1995. Heavy metals, TBT and DDT in the Sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) sampled from the Hawkesbury River estuary, NSW, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 563–567.
- Hayase, D., Horai, S., Isobe, T., Miller, T.W., Takahashi, S., Omori, K., Tanabe, S., 2009. Monitoring Trace Elements in Coastal Waters Using Sardine as a Bioindicator 167–175.
- Heslinga, G.A., 1976. Effects of copper on the coral-reef echinoid *Echinometra mathaei*. *Mar. Biol.* 35, 155–160. doi:10.1007/BF00390937
- Heuser, V.D., de Andrade, V.M., Peres, A., Gomes de Macedo Braga, L.M., Bogo Chies, J.A., 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol. Int.* 32, 1223–1229. doi:10.1016/j.cellbi.2008.07.005

- Hewitt, L.M., Marvin, C.H., 2005. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 589, 208–232. doi:10.1016/j.mrrev.2005.02.001
- Hicks, G.R.F., Coull, B.C., 1983. The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 67–175. doi:10.1234/2013/999990.
- Huber, P.C., Almeida, W.P., 2008. GLUTATIONA E ENZIMAS RELACIONADAS: PAPEL BIOLÓGICO E IMPORTÂNCIA EM PROCESSOS PATOLÓGICOS. *Quim. Nov.* 31, 1170–1179.
- Hugget, R.J., Unger, M.A., Seligman, P.F., Valkirs, A.O., 1992. The marine biocide Tributyltin: Assessing and managing the environmental risks. *Environ. Sci. Technol.* 26, 232–237.
- Ihnat, M., Gamble, D.S., Gilchrist, G.F.R., 1993. Determination of Trace Element Levels in Natural Fresh Water by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 53, 63–78. doi:10.1080/03067319308045983
- Islam, M.S., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 624–649. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.12.004
- Jeffries, K.M., Jackson, L.J., Ikonomou, M.G., Habibi, H.R., 2010. Presence of natural and anthropogenic organic contaminants and potential fish health impacts along two river gradients in Alberta, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2379–2387. doi:10.1002/etc.265
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–221. doi:10.1093/mutage/gen014
- Joyeux, J.-C., Campanha Filho, E.A., Jesus, H.C. de, 2004. Trace metal contamination in estuarine fishes from Vitória Bay, ES, Brazil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 47, 765–774. doi:10.1590/S1516-89132004000500012
- Kádár, E., Salánki, J., Jugdaohsingh, R., Powell, J.J., McCrohan, C.R., White, K.N., 2001. Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquat. Toxicol.* 55, 137–148. doi:10.1016/S0166-445X(01)00183-7
- Kammann, U., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M., Wosniok, W., 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environ. Pollut.* 132, 279–287. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.021
- Kammann, U., Bunke, M., Steinhart, H., Theobald, N., 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 498, 67–77. doi:10.1016/S1383-5718(01)00268-6
- Kennish, M.J., 1991. *Ecology of estuaries : anthropogenic effects*. CRC Press.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The role of glutathione in detoxication. *Environ. Health Perspect.* 49, 59–69.
- Kim, I.-Y., Hyun, C.-K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms.

- Ecotoxicol. Environ. Saf. 64, 288–297. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.05.019
- Kitzmann, D., Asmus, M., 2006. Gestão ambiental portuária: desafios e possibilidades*. RAP Rio Janeiro 40, 1041–60.
- Kobayashi, N., 2005. Marine Pollution Bioassay using Sea Urchins. Environ. Sci. 18, 155–167. doi:10.11353/sesj1988.18.155
- Kobayashi, N., 1977. Preliminary experiments with sea urchin pluteus and metamorphosis in marine pollution bioassay. Natl. Mar. Biol. Libr. 24, 9–21.
- Kobayashi, N., Naidenko, I.K., Vaschenko, M.A., 1994. Standardization of the biotest based on using of sea urchin embryos 20, 457–464.
- Kobayashi, N., Okamura, H., 2004. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. Chemosphere 55, 1403–1412. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.11.052
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. J. Biol. Chem. 257, 5751–4.
- Kralik, M., Haslinger, E., Picer, M., Picer, N., Ottner, F., 2007. PCB-anomalies in the sediments of the harbour basin of Zadar (Croatia) as consequence of war action and / or industrial contamination. CHINESE J. GEOCHEMISTRY 25.
- Kristensen, E., Andersen, F.Ø., 1987. Determination of organic carbon in marine sediments: a comparison of two CHN-analyzer methods. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 109, 15–23. doi:10.1016/0022-0981(87)90182-1
- Krull, M., Abessa, D.M.S., Hatje, V., Barros, F., 2014. Integrated assessment of metal contamination in sediments from two tropical estuaries. Ecotoxicol. Environ. Saf. 106, 195–203. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.038
- Kulicova, I., Seisuma, Z., Legzdina, M., 1985. Heavy metals in marine organisms, in: Heavy Metals in Water Organisms. Akadtmiai Kiado, Budapest, pp. 141–154.
- Kumari, M. V, Hiramatsu, M., Ebadi, M., 1998. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. Free Radic. Res. 29, 93–101.
- Kusk, K.O., Petersen, S., 1997. Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1629–1633. doi:10.1002/etc.5620160810
- Kusk, K.O., Wollenberger, L., 2007. Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. Ecotoxicology 16, 183–95. doi:10.1007/s10646-006-0112-2
- Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Bao, V.W.W., Lee, J.-S., 2008. Copper toxicity in the marine copepod *Tigropus japonicus*: Low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. Mar. Pollut. Bull. 57, 632–636. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.03.026
- Lakshmanan, P.T., Nambisan, P.N.K., 1989. Bioaccumulation and depuration of some trace metals in the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 43, 131–138. doi:10.1007/BF01702249
- Lau, P., Wong, H., 2003. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. Mar. Pollut. Bull. 46, 1563–1572. doi:10.1016/S0025-326X(03)00321-7

- Leal, D.A.G., Franco, R.M.B., 2008. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. *Rev Panam Infectol* 10, 48–57.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 544, 43–64. doi:10.1016/S1383-5742(03)00017-6
- Lehtonen, K.K., Turja, R., Budzinski, H., Devier, M.-H., 2016. An integrated chemical-biological study using caged mussels (*Mytilus trossulus*) along a pollution gradient in the Archipelago Sea (SW Finland, Baltic Sea). *Mar. Environ. Res.* 119, 207–221. doi:10.1016/j.marenvres.2016.06.003
- Lekube, X., Izagirre, U., Soto, M., Marigómez, I., 2014. Lysosomal and tissue-level biomarkers in mussels cross-transplanted among four estuaries with different pollution levels. *Sci. Total Environ.* 472, 36–48. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.075
- Lemos, P., 2003. Respostas bioquímicas e moleculares em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) expostos ao óleo diesel.
- Lercari, D., Defeo, O., Celentano, E., 2002. Consequences of a freshwater canal discharge on the benthic community and its habitat on an exposed sandy beach. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 1397–1404. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00304-1
- Li, X., Wai, O.W.H., Li, Y.S., Coles, B.J., Ramsey, M.H., Thornton, I., 2000. Heavy metal distribution in sediment profiles of the Pearl River estuary, South China. *Appl. Geochemistry* 15, 567–581. doi:10.1016/S0883-2927(99)00072-4
- Lions, J., Guérin, V., Bataillard, P., van der Lee, J., Laboudigue, A., 2010. Metal availability in a highly contaminated, dredged-sediment disposal site: Field measurements and geochemical modeling. *Environ. Pollut.* 158, 2857–2864. doi:10.1016/j.envpol.2010.06.011
- Liu, C.W., Lin, K.H., Kuo, Y.M., 2003. Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a blackfoot disease area in Taiwan. *Sci. Total Environ.* 313, 77–89. doi:10.1016/S0048-9697(02)00683-6
- Liu, J.H., Kueh, C.S.W., 2005. Biomonitoring of heavy metals and trace organics using the intertidal mussel *Perna viridis* in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 857–875. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.04.014
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–66.
- Lorenzo, J., Nieto, O., Beiras, R., 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat. Toxicol.* 58, 27–41. doi:10.1016/S0166-445X(01)00219-3
- Losso, C., Arizzi Novelli, A., Picone, M., Volpi Ghirardini, A., Ghetti, P.F., Rudello, D., Ugo, P., 2004. Sulfide as a confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: comparisons with chemical analysis data. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 396–401.
- Loureiro, D.D., Araujo, C.L., Lacerda, L.D., 2008. Efeitos da dragagem na distribuição espacial de mercúrio no sedimento superficial da Lagoa Rodrigo de Freitas. I Congr. Ibero-Americano Oceanogr. – I CIAO Fortaleza.

- Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H., 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study 129, 189–196.
- MacFarlane, G., Burchett, M., 2000. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Aquat. Bot. 68, 45–59. doi:10.1016/S0304-3770(00)00105-4
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. Aquat. Toxicol. 70, 83–93. doi:10.1016/j.aquatox.2004.07.003
- Marigómez, I., Zorita, I., Izagirre, U., Ortiz-Zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., Orbea, A., Soto, M., Cajarville, M.P., 2013. Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. Aquat. Toxicol. 136, 32–48. doi:10.1016/j.aquatox.2013.03.008
- Marques, D.C., Matta, S.L.P., Oliveira, J.A., Dergam, J.A., 2009. Alterações histológicas em brânquias de *Astyanax bimaculatus* causadas pela exposição aguda ao zinco. Rev. Bras. Toxicol. 22–26.
- Mastroti, R.R., 2002. Testes de toxicidade com gamentas de ouriço-do-mar (fertilização)., in: NASCIMENTO, I.A., SOUSA, E.C.P.M., NIPPER, M. (Eds.), Métodos Em Ecotoxicologia: Aplicações No Brasil. Artes Gráficas e Indústria LTDA, São Paulo, p. 262.
- Mendiguchía, C., Moreno, C., García-Vargas, M., 2007. Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients. Chemosphere 69, 1509–1517. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.082
- Mersch, J., Beauvais, M.-N., Nagel, P., 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. Mutat. Res. Toxicol. 371, 47–55. doi:10.1016/S0165-1218(96)90093-2
- Micó, C., Recatalá, L., Peris, M., Sánchez, J., 2006. Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. Chemosphere 65, 863–872. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.016
- Mirlean, N., Andrus, V.E., Baisch, P., Griep, G., Casartelli, M.R., 2003. Arsenic pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. Mar. Pollut. Bull. 46, 1480–1484. doi:10.1016/S0025-326X(03)00257-1
- Mirlean, N., Baisch, P., Travassos, M.P., Nassar, C., 2011. Calcareous algae bioclast contribution to sediment enrichment by arsenic on the Brazilian subtropical coast. Geo-Marine Lett. 31, 65–73. doi:10.1007/s00367-010-0215-x
- Mirlean, N., Medeanic, S., Garcia, F. a., Travassos, M.P., Baisch, P., 2012. Arsenic enrichment in shelf and coastal sediment of the Brazilian subtropics. Cont. Shelf Res. 35, 129–136. doi:10.1016/j.csr.2012.01.006
- Mitchelmore, C.L., Birmelin, C., Livingstone, D.R., Chipman, J.K., 1998. Detection of DNA Strand Breaks in Isolated Mussel (*Mytilus edulis*L.) Digestive Gland Cells Using the “Comet” Assay. Ecotoxicol. Environ. Saf. 41, 51–58.

doi:10.1006/eesa.1998.1666

- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Lund Amado, L., Martinez Gaspar Martins, C., Lopes Leães Pinho, G., Soares Chaves, I., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 146, 221–234. doi:10.1016/j.cbpc.2006.08.012
- Montagna, P.A., 1995. Rates of metazoan meiofaunal microbivory: A review. *Vie Milieu* 45, 1–9.
- Montserrat, J.M., Geracitano, L.A., Assis, H.C.S., Colares, E.P., Bianchini, A., 2006. Biomarcadores Bioquímicos., in: Lana, P.C., Bianchini, A., Ribeiro, C.A.O., Niencheski, L.F.H., Fillmann, G., Santos, C.S.G. (Eds.), *Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros-Diretrizes Metodológicas*. Museu Nacional/UFRJ, Rio de Janeiro, pp. 124–131.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31–36. doi:10.1016/S0003-2670(00)88444-5
- Nadmitov, B., Hong, S., In Kang, S., Chu, J.M., Gomboev, B., Janchivdorj, L., Lee, C.-H., Khim, J.S., 2015. Large-scale monitoring and assessment of metal contamination in surface water of the Selenga River Basin (2007-2009). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 2856–67. doi:10.1007/s11356-014-3564-6
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubèze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.F., Moukrim, A., 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 901–8.
- Narchi, W., Galvão-Bueno, M.S., 1997. ANATOMIA FUNCIONAL DE PERNA PERNA (L1NNÉ) (BIVALVIA, MYTILIDAE). *Rev. Bras. Zool.* 14, 135–168.
- Niencheski, L.F., Milani, M.R., Milani, I.B., 2008. Metais Traço: Água., in: *Poluição Marinha*. Interciência, Rio de Janeiro, p. 412.
- Nilin, J., Moreira, L.B., Aguiar, J.E., Marins, R., Moledo de Souza Abessa, D., Monteiro da Cruz Lotufo, T., Costa-Lotufo, L.V., 2013. Sediment quality assessment in a tropical estuary: The case of Ceará River, Northeastern Brazil. *Mar. Environ. Res.* 91, 89–96. doi:10.1016/j.marenvres.2013.02.009
- Nogueira, L., Garcia, D., Trevisan, R., Sanches, A.L.M., da Silva Acosta, D., Dafre, A.L., Oliveira, T.Y.K., de Almeida, E.A., 2015. Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5. *Chemosphere* 134, 210–216. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.034
- Nuss, P., Eckelman, M.J., 2014. Life Cycle Assessment of Metals: A Scientific Synthesis. *PLoS One* 9, e101298. doi:10.1371/journal.pone.0101298
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 567, 109–149. doi:10.1016/j.mrrev.2004.08.003

- Owens, J.E., Niemeyer, E.D., 2006. Analysis of chemical contamination within a canal in a Mexican border colonia. *Environ. Pollut.* 140, 506–515. doi:10.1016/j.envpol.2005.07.019
- Ozretić, B., Krajnović-Ozretić, M., 1985. Morphological and biochemical evidence of the toxic effect of pentachlorophenol on the developing embryos of the sea urchin. *Aquat. Toxicol.* 7, 255–263. doi:10.1016/0166-445X(85)90043-8
- Papadopoulos, A.I., Polemitou, I., Laifi, P., Yiangou, A., Tananaki, C., 2004. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica*: Kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 139, 93–97. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2004.09.010
- Pavlica, M., Klobučar, G.I. V, Mojaš, N., Erben, R., Papeš, D., 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 490, 209–214. doi:10.1016/S1383-5718(00)00162-5
- Payne, P.I., 1987. Genetics of Wheat Storage Proteins and the Effect of Allelic Variation on Bread-Making Quality. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 141–153. doi:10.1146/annurev.pp.38.060187.001041
- Pereira, C.D.S., Abessa, D.M.D.S., Bairy, A.C.D., Zaroni, L.P., Gasparro, M.R., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Furley, T.H., De Sousa, E.C.P.M., 2007. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 462–9.
- Phillips, B.M., Anderson, B.S., Hunt, J.W., 1998. Spatial and temporal variation in results of purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) toxicity tests with zinc. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 453–459. doi:10.1002/etc.5620170316
- Phillips, D.J.H., 1995. The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 193–200. doi:10.1016/0025-326X(95)00194-R
- Phillips, D.J.H. (Acer E.L. (United K., 1991. Selected trace elements and the use of biomonitors in subtropical and tropical marine ecosystems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*
- Pierce, M.L., Moore, C.B., 1982. Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. *Water Res.* 16, 1247–1253. doi:10.1016/0043-1354(82)90143-9
- Poli, P., Buschini, A., Maria, F., 1999. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis* 14, 547–555.
- Prá, D., Lau, A.H., Knakiewicz, T., Carneiro, F.R., Erdtmann, B., 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 585, 79–85. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.04.002
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 120, 497–507. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00238-5
- Raisuddin, S., Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Schlenk, D., Lee, J.-S., 2007. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and

- environmental genomics. *Aquat. Toxicol.* 83, 161–173. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.04.005>
- Rank, J., 2009. Intersex in *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1271–1277. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.12.008
- Rank, J., Jensen, K., Jespersen, P.H., 2005. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 585, 33–42. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.04.008
- Reimann, C., Matschullat, J., Birke, M., Salminen, R., 2009. Arsenic distribution in the environment: The effects of scale. *Appl. Geochemistry* 24, 1147–1167. doi:10.1016/j.apgeochem.2009.03.013
- Renzi, M., Perra, G., Guerranti, C., Franchi, E., Focardi, S., 2009. Abatement efficiency of municipal wastewater treatment plants using different technologies (Orbetello Lagoon, Italy). *Int. J. Environ. Heal.* 3, 58–70.
- Riba, I., Casado-Martínez, C., Forja, J.M., DelValls, A., 2004. Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 271–282. doi:10.1897/03-146
- Riba, I., Forja, J.M., Gómez-Parra, A., DelValls, T.Á., 2004. Sediment quality in littoral regions of the Gulf of Cádiz: A triad approach to address the influence of mining activities. *Environ. Pollut.* 132, 341–353. doi:10.1016/j.envpol.2004.03.021
- Rodríguez-Ariza, A., Alhama, J., Díaz-Méndez, F.M., López-Barea, J., 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat. Res.* 438, 97–107.
- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., Elder, J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671–679. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00333-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00333-2)
- Rubio, B., Nombela, M., Vilas, F., 2000. Geochemistry of Major and Trace Elements in Sediments of the Ria de Vigo (NW Spain): an Assessment of Metal Pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 968–980. doi:10.1016/S0025-326X(00)00039-4
- Ruschi, A., 2007. PARQUE NACIONAL MARINHO DE SANTA CRUZ – ES. [WWW Document]. URL http://ruschicolibri.com.br/parque_nacional.php (accessed 9.18.16).
- Sá, F., Machado, E.C., Angulo, R.J., Veiga, F.A., Brandini, N., 2006. Arsenic and Heavy metals in Sediments near Paranaguá Port, Southern Brazil. *J. Coast. Res.* 39, 1066–1068.
- Saco-Álvarez, L., Durán, I., Ignacio Lorenzo, J., Beiras, R., 2010. Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 491–499. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.01.018
- Sáenz, L.A., Seibert, E.L., Zanette, J., Fiedler, H.D., Curtius, A.J., Ferreira, J.F., Alves de Almeida, E., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2010. Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa

- Catarina, Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 796–804. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.02.015
- Salazar, M.H., Salazar, S.M., 1991. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Mar. Environ. Res.* 32, 131–150. doi:10.1016/0141-1136(91)90038-A
- Sanders, M.J., Du Preez, H.H., Van Vuren, J.H.J., 1998. The Freshwater River Crab, *Potamonautes warreni*, as a Bioaccumulative Indicator of Iron and Manganese Pollution in Two Aquatic Systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 203–214. doi:10.1006/eesa.1998.1699
- Santana, L.I. De, Eduardo, C., Carvalho, V. De, Gomes, M.P., Metais, D. De, Perna, M., Santana, I. De, 2001. Distribuição de Metais Pesados em Mexilhões SUMMARY.
- Scanes, P., Roach, A., 1999. Determining natural 'background' concentrations of trace metals in oysters from New South Wales, Australia. *Environ. Pollut.* 105, 437–446. doi:10.1016/S0269-7491(99)00030-5
- Scanes, P.R., 1997. Uptake and depuration of organochlorine compounds in Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). *Mar. Freshw. Res.* 48, 1–6.
- Semmler, M.G.M.C., 2007. Biomonitoração de Hg, Cd, Pb e outros elementos em áreas costeiras do Estado de São Paulo por meio do mexilhão transplantado - Perna perna (Linnaeus, 1758). Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/T.85.2007.tde-27112007-140442
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 193–199. doi:10.1016/S0742-8413(99)00033-X
- Shulkin, V.M., Presley, B.J., Kavun, V.I., 2003. Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environ. Int.* 29, 493–502. doi:10.1016/S0160-4120(03)00004-7
- Sim, W.-J., Lee, J.-W., Lee, E.-S., Shin, S.-K., Hwang, S.-R., Oh, J.-E., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere* 82, 179–186. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.026
- Sloman, K.A., 2007. Effects of trace metals on salmonid fish: The role of social hierarchies. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 326–345. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.003
- Souza, R.C.C.L., Fernandes, F.C., Silva, E.P., 2003. A study on the occurrence of the brown mussel *Perna perna* on the sambaquis of the Brazilian coast. *Rev. do Mus. Arqueol. e Etnol.* 13, 3–24.
- Souza, I.S. de, Araujo, G.S. de, Cruz, A.C.F., Fonseca, T.G., Camargo, J.B.D.A. de, Medeiros, G.F., Abessa, D.M. de S., 2016. Using and integrated approach to assess the sediment quality of an estuary from the semi-arid coast of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushima, K., Simazaki, D., 2003. Comparison of

- DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 541, 31–44. doi:10.1016/S1383-5718(03)00177-3
- Stankovic, S., Jovic, M., 2012. Health risks of heavy metals in the mediterranean mussels as seafood. *Environ. Chem. Lett.* 10, 119–130. doi:10.1007/s10311-011-0343-1
- Stark, J.S., 1998. Effects of Copper on Macrobenthic Assemblages in Soft Sediments: A Laboratory Experimental Study. *Ecotoxicology* 7, 161–173. doi:10.1023/A:1014356327595
- Sternbeck, J., Östlund, P., 2001. Metals in Sediments from the Stockholm Region: Geographical Pollution Patterns and Time Trends. *Water, Air Soil Pollut. Focus* 1, 151–165. doi:10.1023/A:1017508322097
- Stronkhorst, J., Ariese, F., van Hattum, B., Postma, J.F., de Kluijver, M., Den Besten, P.J., Bergman, M.J.N., Daan, R., Murk, A.J., Vethaak, A.D., 2003. Environmental impact and recovery at two dumping sites for dredged material in the North Sea. *Environ. Pollut.* 124, 17–31. doi:10.1016/S0269-7491(02)00430-X
- Tanabe, S., Prudente, M.S., Kan-atireklap, S., Subramanian, A., 2000. Mussel watch: marine pollution monitoring of butyltins and organochlorines in coastal waters of Thailand, Philippines and India. *Ocean Coast. Manag.* 43, 819–839. doi:10.1016/S0964-5691(00)00060-0
- Theodorakis, C.W., 2001. Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology* 10, 245–56.
- Thompson, E.L., Taylor, D. a, Nair, S. V, Birch, G., Haynes, P. a, Raftos, D. a, 2012. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquat. Toxicol.* 109, 202–12. doi:10.1016/j.aquatox.2011.09.018
- Thompson, G., Swain, J., Kay, M., Forster, C., 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresour. Technol.* 77, 275–286. doi:10.1016/S0960-8524(00)00060-2
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–21.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, a., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J
- Torres, M.A., Pires Testa, C., Gáspari, C., Beatriz Masutti, M., Maria Neves Panitz, C., Curi-Pedrosa, R., Alves de Almeida, E., Di Mascio, P., Wilhelm Filho, D., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 923–932. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00142-X
- Torres, R.J., Abessa, D.M.S., Santos, F.C., Maranhão, L.A., Davanso, M.B., do Nascimento, M.R.L., Mozeto, A.A., 2009. Effects of dredging operations on

- sediment quality: contaminant mobilization in dredged sediments from the Port of Santos, SP, Brazil. *J. Soils Sediments* 9, 420–432. doi:10.1007/s11368-009-0121-x
- Tran, D., Moody, A.J., Fisher, A.S., Foulkes, M.E., Jha, A.N., 2007. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquat. Toxicol.* 84, 11–18. doi:10.1016/j.aquatox.2007.05.009
- Trefry, J.H., Naito, K.L., Trocine, R.P., Metz, S., 1995. Distribution and bioaccumulation of heavy metals from produced water discharges to the gulf of Mexico. *Water Sci. Technol.* 32, 31–36. doi:10.1016/0273-1223(95)00566-6
- Tsangaris, C., Vergolyas, M., Fountoulaki, E., Nizheradze, K., 2011. Oxidative Stress and Genotoxicity Biomarker Responses in Grey Mullet (*Mugil cephalus*) From a Polluted Environment in Saronikos Gulf, Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 482–490. doi:10.1007/s00244-010-9629-8
- Turja, R., 2015. Biological Effects of Contaminants in Mussels (*Mytilus trossulus*) Transplanted in Northern Baltic Sea Coastal Areas. Department of Environmental Sciences. Division of Aquatic Sciences.
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Uluturhan, E., Kucuksezgin, F., 2007. Heavy metal contaminants in Red Pandora (*Pagellus erythrinus*) tissues from the Eastern Aegean Sea, Turkey. *Water Res.* 41, 1185–1192. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.044
- USEPA (United States Environmental Protection Agency/Department of The Army U.S. Army Corps of Engineers), 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal — testing manual, EPA-503-8-91/001.
- Usero, J., González-Regalado, E., Gracia, I., 1997. Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic Coast of Southern Spain. *Environ. Int.* 23, 291–298. doi:10.1016/S0160-4120(97)00030-5
- Usero, J., Morillo, J., Gracia, I., 2005. Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere* 59, 1175–1181. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.089
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Venier, P., Maron, S., Canova, S., 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 390, 33–44. doi:10.1016/S0165-1218(96)00162-0
- Villela, I.V., de Oliveira, I.M., da Silva, J., Henriques, J.A.P., 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 605, 78–86. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.02.006

- Vosloo, D., Sara, J., Vosloo, A., 2012. Acute responses of brown mussel (*Perna perna*) exposed to sub-lethal copper levels: Integration of physiological and cellular responses. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 1–8. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.001
- Warnau, M., Ledent, G., Temara, A., Bouquegneau, J.-M., Jangoux, M., Dubois, P., 1995. Heavy metals in *Posidonia oceanica* and *Paracentrotus lividus* from seagrass beds of the north-western Mediterranean. *Sci. Total Environ.* 171, 95–99. doi:10.1016/0048-9697(95)04721-8
- Waterman, A., 1937. Effect of Salts of Heavy Metals on Development of the Sea Urchin, *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* 73, 401–420.
- Wells, P.G., Depledge, M.H., Butler, J.N., Manock, J., Knap, A.H., 2001. Rapid Toxicity Assessment and Biomonitoring of Marine Contaminants — Exploiting the Potential of Rapid Biomarker Assays and Microscale Toxicity Tests. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 799–804. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00054-6
- Widerlund, A., Ingri, J., 1995. Early diagenesis of arsenic in sediments of the Kalix River estuary, northern Sweden. *Chem. Geol.* 125, 185–196. doi:10.1016/0009-2541(95)00073-U
- Yabe, M.J.S., Oliveira, E. de, 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Quim. Nova* 21, 551–556. doi:10.1590/S0100-40421998000500003
- Yeung, J.W.Y., Zhou, G.-J., Leung, K.M.Y., 2016. Sub-lethal effects of cadmium and copper on RNA/DNA ratio and energy reserves in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 59–67. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.05.023
- Zagatto, P.A. Bertoletti, E., 2006. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos.
- Zhadan, P.M., Vashchenko, V. V., Malakhov, L.A., Medvedeva, V., G.R., 1992. The effect of environmental pollution, hydrocarbons and heavy metals on reproduction of sea urchins and bivalves, in: Ilyichev, V.I., Anikiev, V. V. (Eds.), *Oceanic and Anthropogenic Controls of Life in the Pacific Ocean*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp. 267–286.
- Zhang, W., Guo, Z., Zhou, Y., Liu, H., Zhang, L., 2015. Biotransformation and detoxification of inorganic arsenic in Bombay oyster *Saccostrea cucullata*. *Aquat. Toxicol.* 158, 33–40. doi:10.1016/j.aquatox.2014.10.021
- Zimmerman, L.E., Jutte, P.C., Van Dolah, R.F., 2003. An environmental assessment of the Charleston Ocean Dredged Material Disposal Site and surrounding areas after partial completion of the Charleston Harbor Deepening Project. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1408–1419. doi:10.1016/S0025-326X(03)00289-3
- Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201–208. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001

CAPITULO 3

**Biomarcadores genotóxicos e bioquímicos em mexilhão (*Perna perna*),
expostos à água coletada no litoral.**

RESUMO

Por muito tempo os ambientes costeiros e marinhos foram utilizados para descarte de resíduos produzidos pela sociedade humana, e desta forma é crescente o impacto antropogênico gerado por enorme aporte de materiais. Dentre a composição de muitos destes resíduos os metais tornaram-se um problema global nas últimas décadas, por seus potenciais efeitos tóxicos e sua capacidade de bioacumulação nos ecossistemas aquáticos. Para análises da contaminação ambiental por metais, mexilhões e outros moluscos bivalves, são frequentemente utilizados como um modelo biológico em programas nacionais e internacionais de biomonitoramento ambiental, avaliando-se suas respostas biológicas associadas à bioacumulação temporal. Com este intuito então, a qualidade ambiental do litoral de Aracruz-ES foi avaliada por um ano, usando mexilhões *Perna perna* como indicadores biológicos. Para tal, estes organismos foram expostos por 10 dias à água coletada em 10 pontos de monitoramento dessa região, durante quatro campanhas trimestrais. Análises de quantificação de metais (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Pb) e de um semimetal (As) foram realizadas nos tecidos dos mexilhões, assim como a mensuração de danos ao DNA, por meio do Ensaio Cometa, e da atividade da enzima glutathione S-transferase (GST), em brânquias e glândulas digestivas. Todos os pontos avaliados apresentaram aumento significativo nos biomarcadores analisados. Mas nenhuma forte tendência com nenhum fator avaliado foi encontrado, o que indica a influência de outros agentes químicos não mensurados neste trabalho sobre os resultados obtidos. Contudo, os ensaios demonstrados neste trabalho fornecem um conjunto de práticas recomendadas como ferramentas de biomonitoramento, altamente sensíveis para avaliação da qualidade ambiental.

Palavras-Chave: Bivalves, ambiente costeiro, danos ao DNA, GST, bioacumulação.

ABSTRACT

For a long time coastal and marine environments have been and are appropriate destinations for the waste produced by human society, and in this way the anthropogenic impact generated by a huge amount of materials is increasing. Among the composition of many of these wastes, metals have become a global problem in recent decades because of their potential toxic effects and their ability to bioaccumulate in aquatic ecosystems. For analysis of environmental contamination by metals, mussels and other bivalve molluscs, they are often used as a biological model in national and international environmental biomonitoring programs, evaluating their biological responses associated with temporal bioaccumulation. With this aim in mind, the environmental quality of the coast of Aracruz-ES was evaluated for one year, using *Perna perna* mussels as biological indicators. For this, these organisms were exposed for 10 days to the water collected in 10 monitoring points of this region during four quarterly campaigns. Quantification analysis of metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni and Pb) and a semimetal (As) were performed on the mussel tissues, as well as the measurement of DNA damage, through the Cometa Assay, and Of the activity of the glutathione S-transferase enzyme (GST) in gills and digestive glands. All the evaluated points showed a significant increase in the analyzed biomarkers. But no strong trend with no factor evaluated was found, which indicates the influence of other chemical agents not measured in this work on the obtained results. However, the trials demonstrated in this paper provide a set of best practices as highly sensitive biomonitoring tools for environmental quality assessment.

Keywords: Bivalves, coastal environment, DNA damage, GST, bioaccumulation.

1. INTRODUÇÃO

O litoral do município de Aracruz, localizado no norte do Espírito Santo, é considerado um polo turístico e industrial. Esta região caracteriza-se pela desembocadura de importantes rios, o Piraquê-Açu e o Rio Riacho, que banham parte do Estado, trazendo uma enorme carga de efluentes de origem doméstica e agrícola sem prévio tratamento até a costa, e que abrigam comunidades tradicionais que sobrevivem da pesca nessa região (Ruschi, 2007). Além disso, o litoral de Aracruz foi o local escolhido para a instalação de um estaleiro e também de um terminal aquaviário localizado nas proximidades de uma indústria de celulose (Loureiro et al., 2008). Também é importante ressaltar que além de todos estes empreendimentos locais, toda a costa do Espírito Santo e sul da Bahia sofreu e continua sofrendo com o recebimento da pluma de rejeitos de mineração oriunda do rompimento da barragem de Fundão (Mariana – MG), que está sendo carregada pelo Rio Doce até o oceano, desde novembro de 2015. Este foi o maior acidente mundial envolvendo barragens de rejeitos de mineração, liberando cerca de 35 milhões de metros cúbicos de rejeitos.

Entre os poluentes ambientais aquáticos, os metais tornaram-se um problema global nas últimas décadas, por seus potenciais efeitos tóxicos e sua capacidade de bioacumulação nos ecossistemas aquáticos (MacFarlane e Burchett, 2000). Uma vez na coluna de água, os metais se tornam biodisponíveis para a absorção pela biota aquática, em especial pelos organismos filtradores (Phillips, 1995), pois o hábito alimentar os torna suscetíveis à incorporação de contaminantes presentes na fração solúvel da água (Rainbow, 2002), ao buscarem a absorção de matéria orgânica contida na mesma (Narchi e Galvão-Bueno, 1997). Esta estratégia de captação de alimento constitui uma via de exposição direta às substâncias tóxicas que pode levar à acumulação de compostos em seus tecidos acima do encontrado na fonte de contaminação, sem que apresente efeitos tóxicos (Narchi e Galvão-Bueno, 1997).

Desta forma, mexilhões e outros moluscos bivalves, são frequentemente utilizados como modelos biológicos em programas nacionais e internacionais de biomonitoramento ambiental (Bellotto et al., 2005), por meio da quantificação de contaminantes em seus tecidos, com o objetivo de avaliar a dinâmica de agentes tóxicos no ambiente e o risco da exposição humana a estas substâncias (Brooks e Rumsby, 1967). Os elementos metálicos, além de bioacumularem nos diferentes

tecidos, são ainda capazes de inibir a atividade celular ou alterar o material genético podendo comprometer a fisiologia e sobrevivência de organismos aquáticos, transmitindo esta contaminação aos níveis tróficos superiores, incluindo o ser humano (Bianchi et al., 2011).

Avaliações nos níveis fisiológicos, bioquímicos e genotóxicos detectam mais rapidamente e especificamente a presença de vários compostos tóxicos, permitindo a identificação de mudanças iniciais, antes que efeitos deletérios atinjam níveis mais elevados de organização (Montserrat et al., 2006). Assim, a avaliação de danos no material genético de organismos expostos se tornou uma ferramenta valiosa na investigação de impactos ambientais, não só para analisar a ação genotóxica de compostos, mas também o processo de reparação do DNA (Azqueta e Collins, 2013). Tal avaliação pode ser feita por meio do Ensaio Cometa, que apresenta diversas vantagens e características quando comparado a outros testes genotóxicos, pois exige menor número de células para a análise, é sensível à detecção de danos no material genético mesmo em baixa quantidade, possui custo relativamente baixo e necessita de curto período de tempo para sua realização (Dhawan et al., 2009; Tice et al., 2000).

Outra ferramenta valiosa e frequentemente aplicada na investigação de impactos ambientais causados por elementos metálicos é a determinação do estresse oxidativo, definido como a perturbação entre a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a concentração de defesas antioxidantes, favorecendo o primeiro (Montserrat et al., 2007). A presença de EROs pode ser extremamente tóxica para a célula, a qual ativa diversos mecanismos de defesa (como os sistemas antioxidantes) com o objetivo de se prevenir de danos celulares (Kumari et al., 1998), assim como ativa o sistema de detoxificação. Esses importantes mecanismos de detoxificação intracelular estão presentes em quase todos os organismos (Papadopoulos et al., 2004) e a quantificação dos elementos constituintes deste processo servem como biomarcadores de contaminação. Um exemplo é a glutathione S-transferase (GST) que catalisa a conjugação da glutathione com substratos eletrofílicos (Modesto e Martinez, 2010), a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e excretados (Carletti et al., 2008; Huber e Almeida, 2008).

Contudo, em análises de contaminação ambiental por metais, respostas biológicas associadas à bioacumulação temporal com mexilhões da espécie *Perna*

perna são comumente avaliadas pelo método de transplante (Chan, 1989; Salazar e Salazar, 1991; Trefry et al., 1995), técnica já bastante difundida que consiste em promover a exposição dos animais em estruturas de cultivo no local a ser investigado. Porém, diversas dificuldades logísticas são encontradas durante o processo, tais como: perda e roubo de estruturas de cultivo, eventos climáticos que impossibilitam campanhas de campo, predação, entre outros. Na tentativa de driblar estas dificuldades operacionais, assim como controlar parâmetros físico químicos e ainda levantar dados sobre as respostas dos moluscos em condições adversas, fornecendo informações para ajudar a prever a qualidade do ambiente marinho, estes e outros trabalhos promoveram que tais exposições fossem realizadas em laboratório com os organismos testes (Alves de Almeida et al., 2007; Lemos, 2003; Nogueira et al., 2015; Thompson et al., 2012; Tran et al., 2007).

Logo, o objetivo deste trabalho foi determinar a qualidade ambiental do litoral de Aracruz-ES, por meio da avaliação de biomarcadores genotóxicos e bioquímicos em mexilhão, *Perna perna*, expostos à água da região avaliada, e correlacionar os resultados encontrados com os níveis de metal presentes na água e quantificados nos tecidos dos organismos expostos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Foram realizadas quatro coletas de água (Campanha **A** em agosto e campanha de **B** em dezembro de 2014; campanha **C** em março e campanha **D** em maio de 2015), trimestralmente, em 10 pontos do litoral do município de Aracruz-ES (Figura 1).

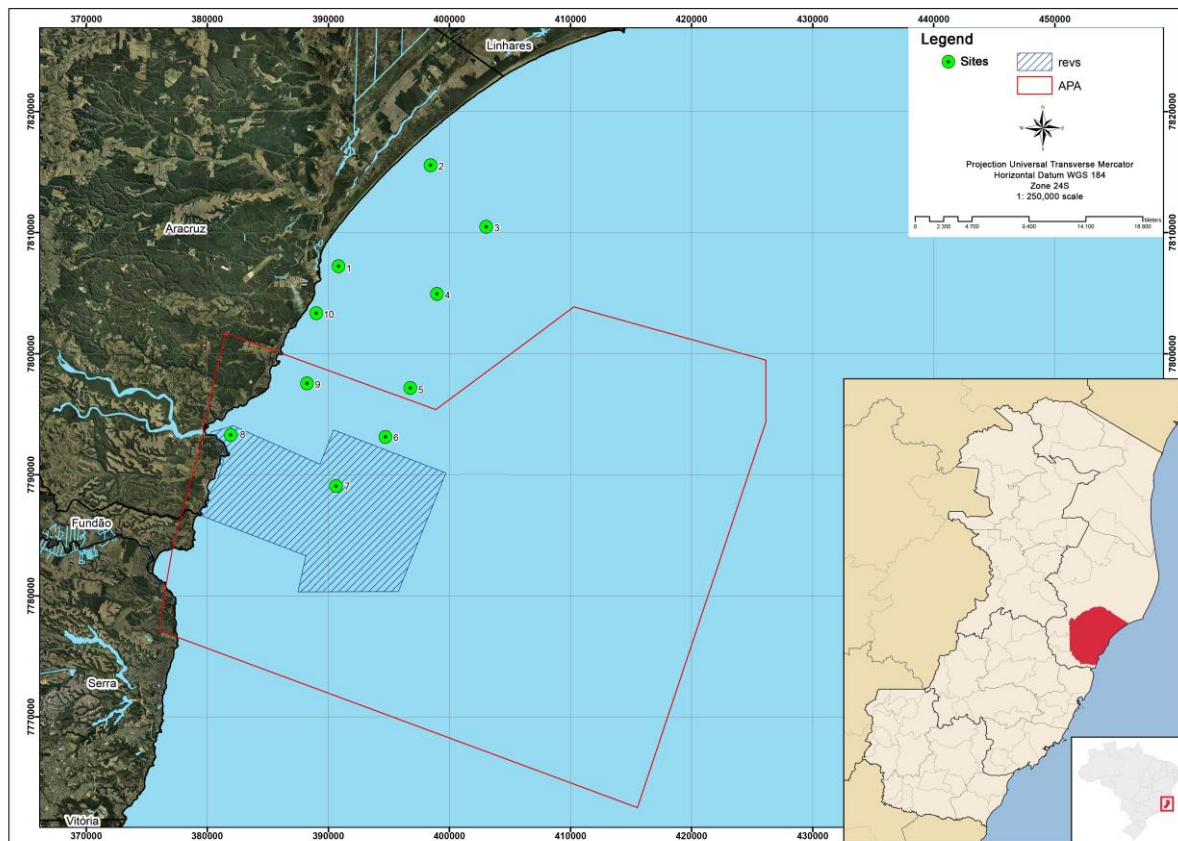


Figura 2. Mapa de localização e distribuição dos 10 pontos de amostragem do litoral de Aracruz (ES), mostrando o Refúgio de Vida Silvestre (Revis) Santa Cruz e a Área de Proteção Ambiental (APA) Costa das Algas.

2.2 Coleta e armazenamento das amostras de água

Com uma garrafa de Van Dorn foi coletada água para quantificação, em laboratório, de metais e de arsênio (As). E com bombonas de 60 L de polietileno (Figura 2), pré lavadas com solução de ácido nítrico a 10%, também foi coletada água para exposição das culturas de mexilhão no laboratório. A metodologia de preparo de vidrarias para a coleta e armazenamento da água seguiu rigorosamente os métodos descritos em APHA (1998).

Após coletadas, as amostras de água seguiram para o Laboratório de Ictiologia Aplicada - LABPEIXE – no complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV onde foram armazenadas em refrigerador (4 °C) até o momento das análises.



Figura 3. Bombonas de 60 L de polietileno utilizadas na coleta de água para exposição dos organismos teste, nos dez pontos do litoral de Aracruz, sendo descarregadas do barco após a coleta.

2.3 Quantificação de metais e de arsênio na água

No laboratório, foi realizada a quantificação de: Arsênio (As), Cádmiio (Cd), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Níquel (Ni) e Chumbo (Pb). Para tanto, as amostras foram acidificadas (ácido nítrico), filtradas utilizando filtro de seringa (poro 0,45 mm de poro) e armazenadas (13 ml) em tubos falcon (ppt). Posteriormente, os elementos investigados foram determinados por espectrometria de absorção atômica (FAAS; ICE 3000 Series, Thermo Scientific) em forno de grafite (GFAAS), com o uso de lâmpadas específicas, amostrador automático e soluções padrão (SpecSol®).

2.4 Ensaio com mexilhão *Perna perna*

2.4.1 Coleta e aclimação

Moluscos bivalves (*Bivalvia*, *Mytilidae*) da espécie *Perna perna* (5-7 cm), de ambos os sexos, foram coletados em um costão rochoso localizado na Praia de Itapuã, Vila Velha - ES, e transportados para o Laboratório de Ictiologia Aplicada (LABPEIXE) da Universidade Vila Velha.

Para se registrar as condições iniciais dos animais coletados, um grupo de 10 animais (por coleta) foi dessensibilizado em água gelada para extração de hemolinfa

e coleta de tecidos, no momento da chegada ao laboratório. Os demais foram devidamente aclimatados em aquários de vidro (60 L) com aeração constante até o momento da exposição. Nenhuma morte ocorreu durante o tempo de exposição aplicado.

2.4.2 Cultura de mexilhões com água teste dos pontos de coleta

Aquários de vidro contendo 20 litros de água dos pontos de coleta (três aquários por ponto em análise) receberam 10 animais cada, onde permaneceram por 10 dias, com aeração constante, temperatura em torno de 25 °C, salinidade 34 e potencial hidrogeniônico ~ 7.6. Os mexilhões não foram alimentados durante o período de exposição.

2.4.3 Coleta de material biológico

Após o período de 10 dias de exposição na água teste, os animais foram dessensibilizados em água gelada para posterior extração de hemolinfa e coleta de tecidos.

A extração da hemolinfa foi realizada segundo metodologia descrita por Lowe et al. (1995), onde três indivíduos de cada aquário (totalizando nove animais de cada tratamento) tiveram sua hemolinfa extraída do músculo adutor posterior com ajuda de uma seringa com agulha hipodérmica, para realização do Ensaio Cometa. Após a dessensibilização com água fria, cinco indivíduos de cada aquário teste (totalizando 15 animais de cada tratamento) tiveram sua concha aberta e seu tecido mole removido, para quantificação de metais e de arsênio. Três indivíduos de cada aquário (totalizando nove animais de cada tratamento) também tiveram suas conchas abertas e suas brânquias e glândulas digestivas dissecadas. Tais tecidos foram congelados em ultra freezer -80 °C para posterior quantificação proteica e atividade enzimática.

2.4.4 Bioacumulação de metais em *Perna perna*

O tecido mole removido dos animais, após dessensibilização, foi digerido utilizando ácido nítrico, seguidos de filtração, avolumação (10 ml) e transferência para tubos falcon (ppt) até o momento da leitura. A leitura dos elementos investigados (Cd, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb e As) foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (FAAS; ICE 3000 Series, Thermo Scientific) em forno de grafite

(GFAAS), com o uso de lâmpadas específicas, amostrador automático e soluções padrão (SpecSol®).

2.4.5 Ensaio Cometa

A análise de fragmentos de DNA foi realizada utilizando ensaio cometa alcalino e coloração com nitrato de prata modificado de Tice et al. (2000) e Andrade et al. (2004). O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para isso lâminas de microscopia, duas para cada exemplar, foram previamente cobertas com agarose 1,5 % (1,80 g de agarose e 120 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4). O primeiro passo foi centrifugar as amostras de hemolinfa coletadas (400 g por 2,5 min.) para promover a concentração de células no precipitado. Alíquotas destes precipitados foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente, 20 µl da hemolinfa diluída foram misturadas com 100 µl de agarose low melting (0,15 g de agarose em 20 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 40 °C. Em seguida foram colocadas sobre as lâminas com pré-cobertura e recobertas com lamínulas para que o gel se espalhe uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, os slides foram colocados na solução de lise (146,1 g NaCl (2,5 M), 37,2 g EDTA (100 mM), 1,2 g de Tris (10 mM), 1 litro de água destilada e o pH da solução foi ajustado para 13 com NaOH e no momento do uso foram adicionados 1 % de Triton X-100 e 10 % DMSO) por no mínimo 2 h, em geladeira e protegidos da luz. Depois da lise as lâminas foram colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300 mM NaOH e 1 mM EDTA em pH>13) por 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25 V e 300 mA por 15 min. Após esta etapa as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (48,5 g de Tris em 1 litro de água destilada) durante 5 min. por três vezes e sendo lavadas com água destilada por duas vezes. As lâminas foram secas por 2 h a 37 °C. Após esse período as lâminas foram fixadas em solução fixadora (15 % de ácido tricloroacético, 5 % de sulfato de zinco (heptahidratado), 5 % de glicerol e 1 litro de água destilada) por 10 min. Após esta etapa as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e secas por 2 h a 37 °C. Depois de secas as lâminas foram hidratadas por 5 min. com água destilada e coradas com solução de coloração com prata (66 ml da solução de carbonato de cálcio (12,5 g de carbonato de cálcio para 250 ml de água) e 34 ml da solução de nitrato de prata (50 mg de nitrato de prata, 50 mg de nitrato de amônio, 250 mg de ácido tungstosalicílico e 125 µl de formaldeído) por 15 min. a 37

°C. Depois de coradas as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e foram submersas por 5 min. em solução stop (ácido acético 1 %). Passados os 5 min. de reação foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente.

Os danos no DNA foram contabilizados após a avaliação de 100 nucleóides por lâmina, sendo duas para cada animal, selecionadas aleatoriamente e não sobrepostas, as quais foram classificadas de acordo com o dano que apresentaram, ou seja, o tamanho da cauda formado por arraste de DNA fragmentado, em 5 classes: 0 – 20 % (classe 0), 20 – 40 % (classe 1), 40 – 60 % (classe 2), 60 – 80 % (classe 3) e >80 % (classe 4) (Collins et al., 1995). O índice de danos (ID) analisado pelo ensaio cometa foi calculado com a somatória do número de nucleóides observados em cada classe de dano multiplicado pelo valor de sua respectiva classe de danos (0, 1, 2, 3 e 4). Estes valores demonstram os danos apresentados nos tratamentos de acordo com Heuser et al., (2008). Os resultados foram expressos como a média de dano, para cada período de exposição. Durante as análises, as células foram analisadas em teste cego e sempre pelo mesmo observador.

2.4.6 Atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST) e quantificação de proteína

As análises da atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) foram realizadas nas brânquias e na glândula digestiva dos bivalves. Tais tecidos após as coletas foram congelados para posteriormente serem pesados e homogeneizados individualmente com 3 vezes o volume de tampão de homogeneização (TrisHCl 20 mM, EDTA 1 mM, sacarose 0,5 M, DTT 1 mM, PMSF 0,1 M, pH 7.6). As amostras foram centrifugadas a 15000g durante 30 minutos a 4 °C, e o sobrenadante extraído.

A atividade da GST foi determinada utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM GSH e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância ($\lambda = 340 \text{ nm}$) por 1 min. em um leitor de placa (Molecular Device). A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDBN (Habig et al., 1974; Habig e Jakoby, 1981). A atividade da GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 U de produto por miligrama de proteína.

As concentrações de proteínas dos extratos dos tecidos analisados (brânquia e glândula digestiva) foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando albumina sérica bovina como padrão. Os ensaios foram feitos em duplicata.

2.5 Análise estatísticas

As comparações entre os resultados encontrados nos diferentes pontos de monitoramento e o controle foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $p > 0.05$.

Para procurar possíveis relações entre os contaminantes elementares investigados e os biomarcadores analisados, uma matriz de dados (agrupado de todas as campanhas) foi construída e uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada. Antes desta análise, todos os dados foram padronizados. A padronização tende a aumentar a influência das variáveis cuja variação é pequena, e reduzir a influência de variáveis cuja variância é grande. Além disso, o procedimento de padronização elimina a influência de diferentes unidades de medida. Posteriormente, uma análise de correlação foi desenvolvida, com o coeficiente de correlação de Pearson, ao combinar todas as variáveis analisadas na tentativa de explicar as mudanças observadas ao identificar tendências significativas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico PAST (Paleontological Statistics).

3. RESULTADOS

As médias dos resultados da quantificação de metais e de As nas amostras de água coletadas nos dez pontos amostrais, durante as quatro campanhas, estão apresentadas na Tabela 1. Valores em negrito representam concentrações acima dos padrões de qualidade para água salobra de classe I - Resolução CONAMA n. 357/05 (CONAMA, 2005). É possível observar nessa tabela que todos os pontos apresentaram o parâmetro As em desconformidade com a legislação, e o parâmetro Ni se apresentou em desconformidade na maioria das coletas em todos os pontos amostrais. Enquanto que, os parâmetros Cd, Cr, Fe, Mn e Pb não apresentaram valores em desconformidade em nenhum momento.

Tabela 1. Concentrações de metais e de arsênio (As) dissolvido na água dos dez pontos amostrais do litoral de Aracruz (ES), em quatro campanhas. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Dados marcados (negrito) excederam padrões de qualidade para água salobra de classe I - Resolução CONAMA n. 357/05.

Campanha/ponto	Cd ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Cr ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Mn ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	As ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Campanha A							
1	0,06±0,02	2,46±0,78	16,65±2,23	4,67±0,52	6,87±3,61	3,22±0,90	24,95±1,32
2	0,05±0,01	3,22±2,29	15,92±2,24	4,70±0,33	47,27±0,24	4,77±0,99	19,82±2,33
3	0,07±0,02	1,24±1,01	13,36±2,62	4,43±0,73	39,23±1,86	4,09±0,84	18,75±4,20
4	0,07±0,02	0,93±0,62	16,32±1,46	3,97±0,61	21,35±0,28	2,78±0,63	20,73±3,17
5	0,06±0,02	3,76±2,65	24,37±4,59	4,98±0,33	31,30±0,73	1,13±0,98	25,23±0,59
6	0,05±0,03	0,74±0,64	32,82±0,60	3,59±0,99	28,51±2,21	1,86±0,97	30,07±2,27
7	0,04±0,03	2,27±1,25	13,71±2,56	3,43±0,54	23,46±3,43	4,86±0,55	25,58±5,13
8	0,04±0,02	1,19±1,74	48,46±1,99	4,52±1,20	19,41±1,21	4,91±0,48	24,07±1,58
9	0,05±0,03	4,69±3,26	27,25±2,36	0,51±0,45	27,81±1,01	3,24±0,67	23,15±3,92
10	0,05±0,02	4,00±3,50	39,37±1,79	3,79±1,77	14,56±2,46	2,76±2,30	24,54±7,38
Campanha B							
1	0,05±0,01	1,82±1,88	32,48±1,25	6,22±0,91	43,74±0,96	2,78±0,67	23,25±3,22
2	0,04±0,02	4,29±3,65	19,67±2,41	0,97±1,34	22,50±1,49	3,40±0,92	26,74±4,74
3	0,07±0,02	3,09±1,22	12,71±0,81	0,29±0,03	45,58±0,61	2,31±0,73	20,13±3,38
4	0,07±0,01	2,89±1,45	17,84±1,90	0,34±0,01	25,65±2,36	4,18±0,67	29,82±3,26
5	0,06±0,03	1,36±0,68	48,94±1,93	0,33±0,01	61,84±0,46	2,39±0,88	25,17±4,37
6	0,06±0,02	0,66±0,33	3,77±0,53	0,29±0,02	46,21±2,98	3,54±2,75	24,91±2,12
7	0,46±0,46	4,68±1,53	7,61±0,66	0,32±0,04	31,36±1,91	0,31±0,25	53,18±12,96
8	0,31±0,14	2,72±0,96	28,93±1,52	0,26±0,09	13,69±2,16	2,33±1,36	42,99±11,23
9	0,46±0,49	2,80±2,02	17,03±1,61	0,30±0,02	20,55±0,60	2,25±0,34	42,69±35,85
10	1,53±1,93	2,61±1,74	34,79±4,23	0,28±0,00	35,49±4,40	1,09±1,09	38,78±30,39
Campanha C							
1	0,68±0,60	2,42±1,06	11,06±2,21	2,37±0,39	22,59±2,35	0,91±0,68	53,45±8,41
2	1,13±1,09	2,46±1,46	10,76±0,80	1,37±1,27	37,29±3,93	0,58±0,28	55,05±13,18
3	1,43±1,57	1,88±2,57	6,38±1,32	1,07±0,53	31,79±2,23	0,48±0,61	47,36±7,83
4	2,95±5,03	2,31±3,92	6,37±0,31	0,80±0,29	35,50±3,74	1,13±0,99	25,71±15,04
5	0,05±0,02	0,76±0,39	3,11±1,22	0,67±0,51	33,19±5,78	0,79±0,09	30,37±14,95
6	0,75±0,67	1,81±2,23	11,20±0,90	1,28±0,92	26,42±0,82	1,12±0,91	33,88±35,38
7	0,38±0,28	1,55±0,96	6,62±0,96	2,39±1,76	7,68±1,31	0,50±0,20	45,92±13,79
8	1,44±1,59	2,94±2,75	16,04±1,48	3,03±2,93	29,41±4,38	0,35±0,29	578,94±5,31
9	4,87±5,46	3,79±1,86	11,85±2,20	3,18±2,10	38,00±1,27	2,00±0,67	62,00±13,89
10	2,96±4,59	2,25±1,30	13,69±1,53	3,41±1,77	25,75±0,71	2,48±2,26	43,65±17,97
Campanha D							
1	0,04±0,01	2,21±2,99	4,09±0,75	4,07±1,26	33,68±3,68	0,73±0,50	34,09±15,07
2	0,50±0,50	3,00±2,39	11,97±1,01	3,98±0,60	24,27±2,23	0,89±0,45	39,30±10,82
3	3,13±3,49	5,02±1,36	12,30±1,44	3,11±1,54	32,78±1,32	0,90±0,08	43,68±8,81
4	0,86±0,99	2,51±1,22	4,21±0,24	3,32±2,38	4,03±0,57	1,10±0,60	30,16±24,74
5	1,33±1,41	2,82±2,17	5,56±1,54	5,05±0,69	32,62±2,72	1,14±0,76	32,93±15,63
6	0,06±0,01	1,51±0,63	1,93±1,07	4,29±1,51	33,83±3,60	2,60±3,16	24,08±12,59
7	0,23±0,10	1,88±1,13	12,80±0,56	2,60±1,60	13,53±3,67	12,12±2,82	28,79±10,06
8	0,23±0,21	0,85±0,03	25,89±1,88	1,91±1,40	22,73±4,52	13,92±3,60	35,34±2,85
9	0,35±0,09	0,70±0,04	15,38±1,57	5,37±0,67	6,21±1,98	9,76±1,05	20,36±13,17
10	0,24±0,12	0,80±0,15	4,49±0,50	3,92±0,39	49,38±9,31	8,08±2,47	22,60±8,28

Valores máximos em $\mu\text{g.L}^{-1}$ total^(*) ou dissolvido^(**) permitido pela legislação brasileira resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA): Cd* 5; Cr* 5; Fe** 300; Mn* 100; Ni 25; Pb* 10 e As* 10.

Já as concentrações da maioria dos metais no tecido dos bivalves variaram notavelmente, dependendo da localização do ponto de amostragem da água e da campanha de coleta (Tabela 2). A água da campanha B foi a que causou maior bioacumulação de Cd, Fe, Mn e As no tecido mole dos mexilhões. O Fe foi o único elemento que se apresentou superior nos organismos antes da exposição, todos os demais tiveram sua concentração aumentada após a exposição.

Tabela 2. Quantificação de metais e de arsênio no tecido mole de mexilhões (*Perna perna*), exposto por 10 dias à água coletada nos 10 pontos amostrais do litoral de Aracruz (ES), em quatro campanhas. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

Campanha/ponto	Cd ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	Cr (mg.Kg^{-1})	Fe (mg.Kg^{-1})	Mn (mg.Kg^{-1})	Ni (mg.Kg^{-1})	Pb (mg.Kg^{-1})	As (mg.Kg^{-1})
Controle	1,15 \pm 0,51	0,18 \pm 0,05	48,82 \pm 20,84	0,93 \pm 0,40	0,24 \pm 0,06	0,01 \pm 0,01	0,53 \pm 0,21
Campanha A							
1	23,03 \pm 5,99	3,02 \pm 0,51	6,78 \pm 1,19	0,23 \pm 0,15	0,43 \pm 0,13	5,49 \pm 4,33	4,60 \pm 1,32
2	23,75 \pm 10,12	2,30 \pm 0,79	8,76 \pm 3,11	0,67 \pm 0,95	0,56 \pm 0,24	2,09 \pm 0,49	7,20 \pm 2,12
3	6,84 \pm 0,96	3,76 \pm 1,45	7,00 \pm 2,80	0,18 \pm 0,29	0,40 \pm 0,15	1,66 \pm 0,54	5,33 \pm 0,73
4	10,19 \pm 3,81	3,52 \pm 3,72	9,47 \pm 7,96	0,62 \pm 0,83	0,41 \pm 0,17	2,07 \pm 0,20	5,67 \pm 2,94
5	17,35 \pm 4,03	21,57 \pm 11,34	13,23 \pm 9,78	0,35 \pm 0,65	0,25 \pm 0,07	1,82 \pm 0,43	3,95 \pm 0,79
6	19,64 \pm 5,52	9,67 \pm 1,60	8,43 \pm 8,50	0,36 \pm 0,55	0,35 \pm 0,16	4,38 \pm 0,94	5,94 \pm 1,76
7	16,43 \pm 4,56	9,58 \pm 1,28	9,79 \pm 10,80	0,09 \pm 0,04	0,44 \pm 0,13	5,76 \pm 9,39	6,63 \pm 1,58
8	26,88 \pm 16,15	12,74 \pm 4,33	4,46 \pm 2,43	0,24 \pm 0,46	0,25 \pm 0,10	19,60 \pm 18,99	3,63 \pm 0,69
9	17,86 \pm 4,92	12,64 \pm 4,07	12,60 \pm 5,26	0,29 \pm 0,22	0,33 \pm 0,08	2,50 \pm 0,91	3,89 \pm 1,17
10	47,33 \pm 38,18	11,32 \pm 11,27	15,13 \pm 8,40	3,00 \pm 3,45	0,24 \pm 0,04	9,80 \pm 11,59	7,81 \pm 2,53
Campanha B							
1	17,79 \pm 7,60	1,80 \pm 1,60	16,31 \pm 3,6	6,42 \pm 1,11	0,38 \pm 0,10	0,22 \pm 0,39	11,13 \pm 2,13
2	13,46 \pm 2,79	2,73 \pm 1,63	12,28 \pm 5,13	8,25 \pm 1,65	0,25 \pm 0,14	0,18 \pm 0,09	11,44 \pm 1,28
3	13,40 \pm 2,83	1,88 \pm 0,86	10,80 \pm 1,71	7,10 \pm 1,41	0,17 \pm 0,07	0,25 \pm 0,14	10,44 \pm 0,85
4	12,01 \pm 3,91	1,24 \pm 0,72	15,68 \pm 11,88	7,64 \pm 5,20	0,18 \pm 0,11	0,08 \pm 0,06	9,98 \pm 2,64
5	11,63 \pm 2,92	1,63 \pm 0,65	9,47 \pm 2,22	6,03 \pm 0,92	0,23 \pm 0,12	0,17 \pm 0,14	9,46 \pm 0,43
6	16,04 \pm 8,15	0,92 \pm 0,84	14,30 \pm 13,13	6,61 \pm 1,76	0,27 \pm 0,05	0,53 \pm 0,93	11,06 \pm 1,35
7	11,80 \pm 2,98	0,89 \pm 0,31	14,90 \pm 6,74	9,31 \pm 1,99	0,18 \pm 0,05	0,10 \pm 0,14	11,82 \pm 1,07
8	15,05 \pm 2,63	1,58 \pm 0,88	10,51 \pm 4,57	6,25 \pm 1,55	0,28 \pm 0,09	0,06 \pm 0,02	11,12 \pm 0,31
9	14,95 \pm 3,76	0,60 \pm 0,50	13,52 \pm 7,73	5,58 \pm 1,86	0,26 \pm 0,09	0,04 \pm 0,03	11,38 \pm 1,78
10	15,17 \pm 3,13	0,24 \pm 0,45	14,79 \pm 4,00	5,37 \pm 0,90	0,20 \pm 0,10	0,12 \pm 0,10	11,63 \pm 0,97
Campanha C							
1	15,18 \pm 5,28	0,58 \pm 0,87	16,25 \pm 2,57	5,00 \pm 0,75	0,46 \pm 0,20	0,07 \pm 0,07	13,54 \pm 0,47
2	11,95 \pm 7,62	0,41 \pm 0,55	20,65 \pm 6,14	3,10 \pm 2,06	0,59 \pm 0,28	2,53 \pm 5,03	8,28 \pm 6,68
3	5,85 \pm 3,80	0,58 \pm 0,23	20,07 \pm 3,07	0,51 \pm 0,60	0,62 \pm 0,23	2,15 \pm 3,51	0,86 \pm 0,09
4	4,79 \pm 4,49	0,26 \pm 0,23	14,28 \pm 5,35	0,53 \pm 0,55	0,45 \pm 0,16	2,14 \pm 2,41	0,74 \pm 0,16
5	3,40 \pm 2,48	0,27 \pm 0,25	13,39 \pm 3,77	0,48 \pm 0,80	0,44 \pm 0,24	2,23 \pm 3,19	0,72 \pm 0,20
6	2,38 \pm 0,63	0,47 \pm 0,58	13,04 \pm 7,83	1,04 \pm 1,39	0,35 \pm 0,14	5,85 \pm 8,83	0,69 \pm 0,09
7	3,77 \pm 0,96	0,25 \pm 0,21	14,18 \pm 5,29	0,53 \pm 0,47	0,62 \pm 0,20	1,84 \pm 2,33	0,98 \pm 0,39
8	4,35 \pm 1,88	0,21 \pm 0,17	32,91 \pm 22,92	0,33 \pm 0,55	0,64 \pm 0,18	0,68 \pm 1,12	0,76 \pm 0,25
9	2,94 \pm 1,04	0,47 \pm 0,65	10,9 \pm 2,46	0,38 \pm 0,45	0,34 \pm 0,26	1,75 \pm 2,59	0,70 \pm 0,09
10	6,62 \pm 5,47	0,30 \pm 0,35	11,56 \pm 3,77	0,31 \pm 0,42	0,57 \pm 0,17	1,55 \pm 2,20	0,83 \pm 0,25
Campanha D							
1	2,74 \pm 1,62	0,61 \pm 0,22	7,41 \pm 1,84	0,37 \pm 0,25	0,44 \pm 0,12	0,28 \pm 0,18	0,61 \pm 0,26
2	2,59 \pm 2,59	0,25 \pm 0,08	16,14 \pm 23,31	0,29 \pm 0,24	0,35 \pm 0,11	0,94 \pm 1,26	0,53 \pm 0,25
3	1,13 \pm 0,52	0,26 \pm 0,08	11,63 \pm 17,67	0,28 \pm 0,15	0,41 \pm 0,12	0,17 \pm 0,11	0,42 \pm 0,13
4	1,79 \pm 0,79	0,31 \pm 0,09	3,42 \pm 0,97	0,21 \pm 0,15	0,44 \pm 0,17	0,24 \pm 0,36	0,58 \pm 0,10
5	4,43 \pm 1,68	0,36 \pm 0,12	4,66 \pm 1,34	0,14 \pm 0,12	0,57 \pm 0,20	0,02 \pm 0,02	0,87 \pm 0,24
6	2,26 \pm 0,97	0,29 \pm 0,13	3,97 \pm 0,92	0,28 \pm 0,45	0,46 \pm 0,16	0,01 \pm 0,01	0,62 \pm 0,12
7	3,59 \pm 2,38	0,38 \pm 0,14	4,53 \pm 1,26	0,07 \pm 0,03	0,44 \pm 0,11	0,12 \pm 0,24	0,71 \pm 0,26
8	1,74 \pm 0,52	0,26 \pm 0,05	3,63 \pm 0,66	0,20 \pm 0,19	0,47 \pm 0,13	0,01 \pm 0,01	0,61 \pm 0,15
9	5,06 \pm 2,86	0,26 \pm 0,04	5,15 \pm 1,79	0,24 \pm 0,15	0,52 \pm 0,15	0,01 \pm 0,01	0,70 \pm 0,11
10	3,44 \pm 1,33	0,28 \pm 0,05	5,83 \pm 3,83	0,17 \pm 0,12	0,41 \pm 0,21	0,02 \pm 0,01	0,84 \pm 0,17

Os hemócitos de mexilhão *Perna perna* submetidos ao Ensaio Cometa, classificados em 5 classes de acordo com o tamanho da cauda formada pelo arraste de DNA fragmentado (Collins et al., 1995), se encontram na Figura 3.

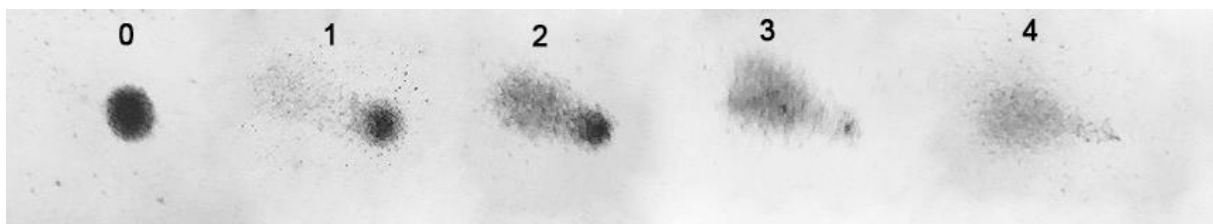


Figura 3. Danos no DNA observados em células da hemolinfa de mexilhões *Perna perna*, classificado em 5 classes (0, 1, 2, 3 e 4) de acordo com o tamanho da cauda formada pelo arraste de fragmentos de DNA após eletroforese.

A caracterização da genotoxicidade das águas nos pontos amostrais (1-10), nas quatro campanhas, realizada por meio do Índice de Danos no DNA (ID) encontra-se na Figura 4. Nela é possível observar que todos os pontos monitorados apresentaram significativas quebras no material genético de células da hemolinfa em bivalves expostos, em relação ao controle, em todas as campanhas.

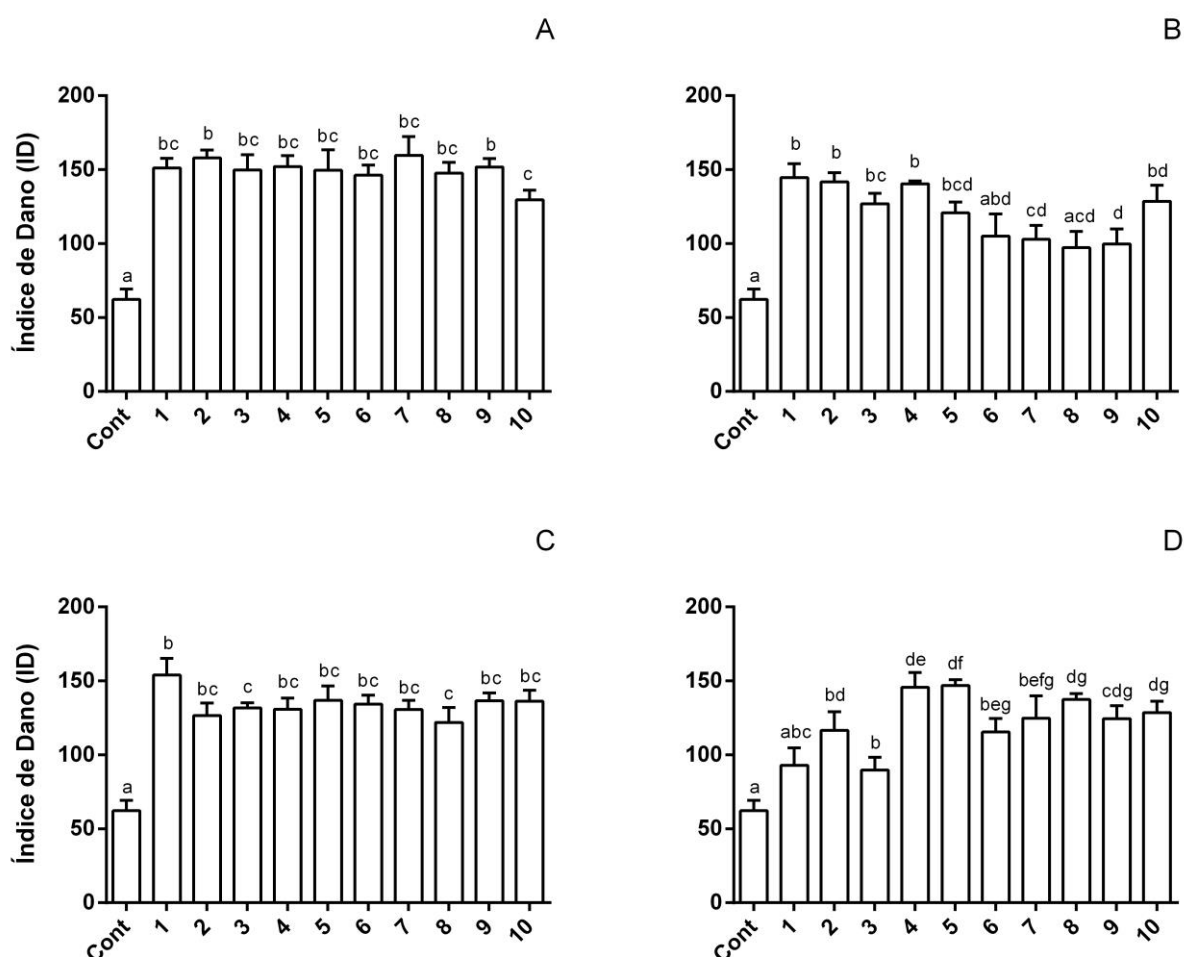


Figura 4. Índice de Danos no DNA em hemócitos de mexilhão *Perna perna*, do grupo controle (antes da exposição - Cont) e dos expostos por 10 dias à água coletada nos 10 pontos amostrais do litoral de Aracruz (ES), em quatro campanhas (A-D).

A avaliação da atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) revelou um aumento significativo nos dois tecidos avaliados (brânquias e glândula digestiva) em relação ao grupo controle em todos os 10 pontos amostrais nas quatro campanhas realizadas (Figura 5).

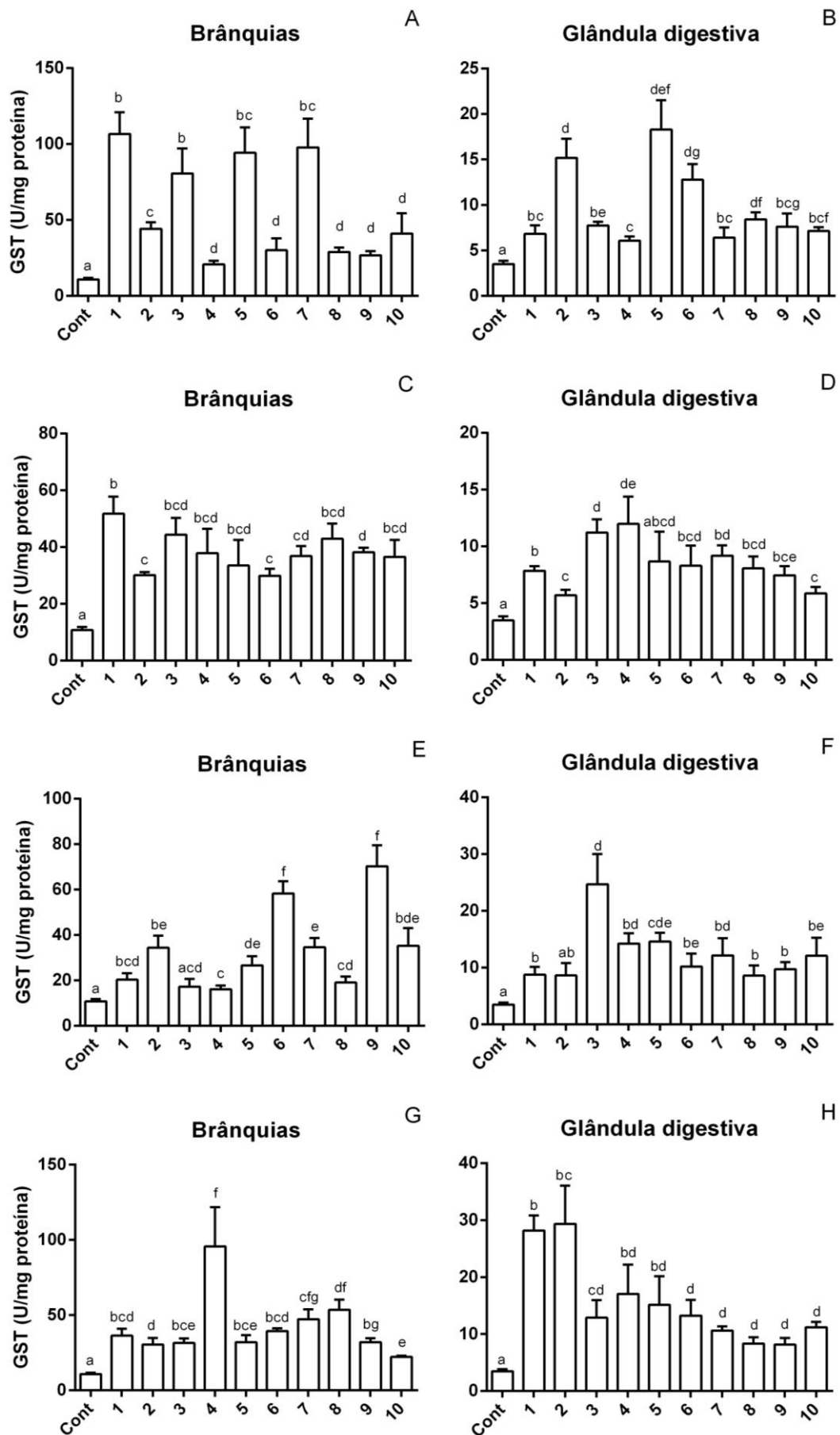


Figura 5. Variação da atividade da enzima glutatona S-transferase (GST) em brânquias e glândula digestiva de mexilhões *Perna perna*, do grupo controle (antes da exposição) e dos expostos por 10 dias à água coletada nos 10 pontos amostrais do litoral de Aracruz (ES), na campanha A (A e B), na campanha B (C e D), na campanha C (E e F) e na campanha D (G e H).

Os resultados da análise de PCA estão apresentados na Tabela 3. Os três primeiros eixos juntos explicam 72,87 % da variância global para todas as campanhas. O primeiro eixo representou 36,28 % da variância total, com uma maior porção da carga positiva atribuída aos parâmetros bioacumulação de Cr (B-Cr) e bioacumulação de Pb (B-Pb), enquanto que as cargas negativas apresentaram valores muito baixos.

Tabela 3. Cargas fatoriais (autovetores) das 18 variáveis originais ordenadas em três principais componentes (PC1, PC2 e PC3).

Variáveis	PC 1	PC 2	PC 3
As	-0,065521	-0,035586	0,12242
Cd	-0,29432	-0,51485	0,62464
Cr	0,0080874	0,01897	0,18203
Ni	-0,03681	0,042735	0,047997
Pb	0,039888	-0,0087154	-0,4513
Fe	0,18138	0,10125	0,10055
Mn	0,083485	-0,16096	-0,15828
GST-Br	0,047958	-0,03059	0,058287
GST-GD	-0,034795	-0,085526	0,044182
Cometa	0,025067	-0,0084875	0,012643
B-As	0,03812	0,42866	0,20576
B-Cd	0,25609	0,17368	0,15566
B-Cr	0,62149	0,0049689	0,055227
B-Fe	-0,033548	0,041175	0,17194
B-Mn	-0,09263	0,62199	0,32686
B-Ni	-0,04144	-0,10937	0,070581
B-Pb	0,63033	-0,2657	0,25243
Autovalores	35,327	21,482	14,151
% variância	36,276	22,059	14,531
Variância total	36,276	58,335	72,866

*B-As: Bioacumulação de Arsênio; B-Cd: Bioacumulação de Cádmio; B-Cr: Bioacumulação de Cromo; B-Fe: Bioacumulação de Ferro; B-Mn: Bioacumulação de Manganês; B-Ni: Bioacumulação de Níquel; B-Pb: Bioacumulação de Chumbo.

Com o intuito de revelar a tendência das variáveis em relação às amostragens foi construída a Figura 6, onde se pode perceber uma certa divisão dos resultados entre as campanhas (cores diferenciadas) de acordo com a localização dos pontos de amostragem dentro do gráfico. A distribuição espacial dos pontos da campanha B (vermelho) parece estar sofrendo uma tendência da bioacumulação de Mn (B-Mn), que se mostrou superior às demais campanhas, enquanto as campanhas C (Azul) e

D (Verde) parecem estar sofrendo uma tendência da presença de Cd na água, que apresentou um crescimento em relação as demais. Já os resultados do Ensaio Cometa, e da atividade da GST das brânquias e da glândula digestiva não apresentaram nenhuma forte tendência com nenhum fator avaliado.

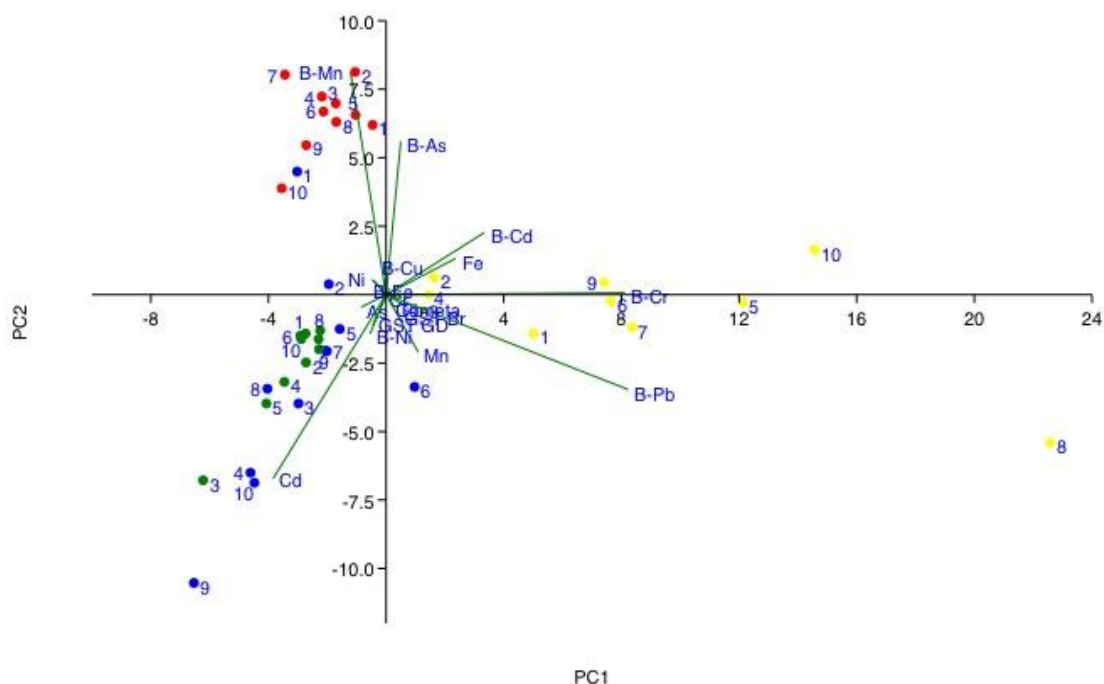


Figura 6. Análise de Componentes Principais (PCA) com base em 18 variáveis a partir da coleta de água de 10 pontos amostrais do litoral de Aracruz, em quatro campanhas. Círculos amarelos indicam campanha A, círculos vermelhos indicam campanha B, círculos azuis indicam campanha C e círculos verdes indicam campanha D. *B-As: Bioacumulação de Arsênio; B-Cd: Bioacumulação de Cádmi; B-Cr: Bioacumulação de Cromo; B-Fe: Bioacumulação de Ferro; B-Mn: Bioacumulação de Manganês; B-Ni: Bioacumulação de Níquel; B-Pb: Bioacumulação de Chumbo.

Os coeficientes de correlação das dezoito (18) variáveis distintas analisadas estão apresentados na Tabela 4 com nenhuma grande relação. As maiores relações positivas existentes com a atividade da enzima GST nas brânquias (GST-Br) foram com a presença de Mn na água e com a bioacumulação de Cr (B-Cr), enquanto a atividade da GST na glândula digestiva (GST-GD) apresentou sua maior correlação positiva com a bioacumulação de Ni (B-Ni). Já o índice de danos no DNA, analisado pelo Ensaio Cometa (Cometa) apresentou sua maior correlação positiva com a presença de Mn na água e com a bioacumulação de Cr (B-Cr) e Pb (B-Pb).

Coeficientes próximos de zero ou negativos entre os elementos presentes na água e os quantificados nos tecidos como os que foram encontrados entre todos os elementos analisados, podem indicar concentrações na água abaixo do limiar do qual esses organismos são capazes de regular a acumulação em seus corpos, durante o período de exposição (10 dias), ou a concentração quantificada na água reflete a forma não disponível para incorporação biológica .

Tabela 4. Correlações das 18 variáveis físicas e biológicas mensuradas (todos os pontos combinados). Coeficiente de correlação de Pearson.

	As	Cd	Cr	Ni	Pb	Fe	Mn	GST-Br	GST-GD	Cometa	B-As	B-Cd	B-Cr	B-Cu	B-Fe	B-Mn	B-Ni
As																	
Cd	0,58																
Cr	0,30	0,30															
Ni	-0,10	0,10	-0,05														
Pb	-0,39	-0,26	-0,36	-0,16													
Fe	-0,21	-0,22	0,07	0,03	0,15												
Mn	-0,28	-0,05	-0,14	-0,15	0,17	0,02											
GST-Br	-0,18	-0,07	0,07	-0,22	0,10	-0,02	0,30										
GST-GD	0,09	0,08	0,02	0,07	-0,28	-0,39	0,18	-0,07									
Cometa	-0,33	-0,16	-0,13	-0,12	0,15	0,18	0,30	0,34	-0,21								
B-As	-0,02	-0,33	0,19	0,20	-0,16	0,37	-0,39	-0,05	-0,48	0,01							
B-Cd	-0,29	-0,36	0,24	-0,07	-0,04	0,62	0,07	0,05	-0,36	0,26	0,57						
B-Cr	-0,36	-0,31	0,23	-0,09	-0,01	0,50	0,25	0,28	-0,07	0,42	0,09	0,60					
B-Cu	0,19	0,17	0,34	0,10	-0,59	0,14	-0,28	-0,04	0,10	-0,27	0,26	0,18	-0,01				
B-Fe	0,55	0,21	0,29	0,15	-0,52	-0,02	-0,33	-0,34	0,01	-0,12	0,23	0,08	-0,07	0,42			
B-Mn	0,09	-0,21	0,25	0,23	-0,17	0,22	-0,56	-0,18	-0,35	-0,24	0,87	0,29	-0,16	0,29	0,28		
B-Ni	0,23	0,23	-0,31	-0,15	0,04	-0,45	0,38	-0,08	0,25	0,13	-0,59	-0,41	-0,32	-0,26	0,09	-0,65	
B-Pb	-0,19	-0,12	-0,02	-0,23	0,00	0,46	0,22	0,07	-0,15	0,32	-0,08	0,56	0,55	0,04	-0,11	-0,25	-0,13

*B-As: Bioacumulação de Arsênio; B-Cr: Bioacumulação de Cádmi; B-Cr: Bioacumulação de Cromo; B-Fe: Bioacumulação de Ferro; B-Mn: Bioacumulação de Manganês; B-Ni: Bioacumulação de Níquel; B-Pb: Bioacumulação de Chumbo.

4. DISCUSSÃO

Os estudos realizados no litoral de Aracruz constantemente revelam altos níveis de As em sua composição sedimentar (Mirlean et al., 2012, 2011), assim como o que compartilharam as campanhas de coletas com este estudo (Medeiros et al. 2016, dados não publicados). O elevado enriquecimento de As do sedimento coletado na costa de Aracruz, possivelmente, tem grande contribuição de fonte litogénica, originário de areias ferruginosas da Formação Barreiras (Mirlean et al., 2012), mas não se pode descartar a contribuição antropogénica para esta contaminação, uma vez que o As e seus compostos são generalizadamente usados na fabricação de pesticidas, fungicidas, herbicidas e inseticidas e, principalmente, como um preservativo de madeira o que contribuem para o enriquecimento do ambiente marinho por este composto (Reimann et al., 2009). Tal elemento presente no sedimento de fundo pode ser disponibilizado na coluna d'água e enriquecer suas concentrações por meio de processos de ressuspensão, principalmente, proporcionado por processos de dragagem e deposição de material dragado que remobiliza o sedimento de fundo, acarretando assim, em uma contaminação maior nos organismos tanto da área dragada, como das áreas adjacentes (Bolam, 2014; Lions et al., 2010; Stronkhorst et al., 2003; Torres et al., 2009; Zimmerman et al., 2003).

Durante este estudo, um grande processo de dragagem na instalação de um novo porto agregado a um estaleiro naval ocorreu na área. E processos de dragagens menores são rotineiramente realizados na região para escavação nos canais de acesso e áreas de atracação dos portos para manutenção ou aumento da profundidade, o que provavelmente pode ter influenciado na concentração de todos os elementos investigados no presente trabalho.

A quantificação de elementos metálicos e de As no tecido dos mexilhões não apresentou nenhuma correlação com os elementos presentes na água. Possivelmente o pouco tempo de exposição aliado à biodisponibilidade de elementos presentes determinaram estes resultados. Yeung et al. (2016) também acreditam que a adoção de exposição à baixas concentrações de Cd e um curto tempo de exposição (10 dias) podem terem sido responsáveis pela inexistência de diferenças nas concentrações de Cd tecidual em *Perna viridis* entre o controle e os tratamentos. Já a queda na concentração do Fe em relação ao que havia sido observado nos mexilhões recém coletados pode

estar ligada a não oferta de alimento para os organismos durante o experimento, assim como realizado por Yeung et al. (2016), o que ocasionou na queima de proteína, abundante do ponto de vista de elementos essenciais como Fe e Zn (Stankovic e Jovic, 2012), para geração de energia e manutenção do organismo mantendo a integridade fisiológica. Proteínas são vistas como combustível de emergência e utilizadas quando outros nutrientes não estão disponíveis (Bayne et al., 1985).

As concentrações teciduais de contaminantes acumulados podem refletir os níveis ambientais de frações biodisponíveis desses produtos químicos e, portanto, estes dados são muitas vezes utilizados para a análise da exposição na avaliação dos riscos ambientais (Fung et al., 2004; Liu e Kueh, 2005). Quando expostos a elementos metálicos os mexilhões podem encontrar uma incompatibilidade de metabolização e excreção, o que os leva a acumular altos níveis desses metais no tecido mole (Chan, 1988; D'Silva and Kureishy, 1978; Lakshmanan e Nambisan, 1989). A bioacumulação de contaminantes químicos por mexilhões marinhos tem sido amplamente documentada em estudos laboratoriais e de campo (Belabed et al., 2013; Blackmore and Wang, 2003; Liu e Kueh, 2005).

Estudos laboratoriais permitem um controle de parâmetros para estudo de respostas de biomarcadores a acumulação de metais, a fim de gerar um modelo para aplicação prática em programas de biomonitoramento *in situ*, assim como foi desenvolvido por Yeung et al. (2016) que investigaram os efeitos da exposição à concentrações sub-letais de Cu e Cd em *P. viridis*. Ou ainda permite testar o potencial tóxico de substâncias, como observado por Nogueira et al. (2015), que avaliaram se diferentes concentrações de biodiesel são capazes de causar o estresse oxidativo em mexilhões *P. perna*. Já estudos de campo podem trazer uma infinidade de fatores de influência, o que pode gerar algumas dúvidas sobre os fatores responsáveis pelas respostas encontradas. Nosso trabalho como utilizou amostras de água coletadas de ambientes naturais e a totalidade dos compostos presentes não pode ser investigada, também trouxe dúvida sobre o conjunto de elementos responsáveis pelas respostas encontradas.

O ensaio do cometa tem sido previamente utilizado para descrever os efeitos das condições desfavoráveis e/ou tóxicas sobre a integridade do DNA

de organismos, incluindo moluscos (Canova et al., 1998; Connors e Black, 2004; Mitchelmore et al., 1998; Villela et al., 2006). Os resultados do Ensaio Cometa neste estudo detectaram alterações significativas nos níveis de quebras da fita de DNA de hemócitos de *P. perna*, em todos os pontos amostrais em relação ao controle, durante todas as campanhas. Vosloo et al. (2012) observaram um aumento do nível de danos no DNA de hemócitos de *Perna perna* durante a exposição ao cobre, quando comparado com animais não expostos, possivelmente por um aumento do consumo de oxigênio que eleva a formação de EROs e conseqüentemente danifica o DNA, lipídios e proteínas. Venier et al. (1997) também relatam aumento rápido de danos ao DNA causado pela produção de EROs, como reativo subproduto metabólico, após a exposição de mexilhões a Benzo(a)pireno (B[a]P). Eventos estes que possivelmente podem ter ocorrido em nosso experimento influenciado pela presença de Mn na água e pelo Cr e Pb bioacumulados, como indicou nosso teste de correlação.

O uso preferencial de hemócitos neste tipo de investigação ambiental, em parte, se deve ao seu importante papel fisiológico na defesa imunitária, fagocitose, transporte, excreção e desintoxicação de xenobióticos (Cheng, 1975). Por serem células do sistema vascular aberto de mexilhões (Mersch et al., 1996) se tornam mais sensíveis do que outras no contato com fatores externos, tais como os xenobióticos genotóxicos (Venier et al., 1997). E são capazes de gerar EROs (Cajaraville et al., 1996), em resposta à exposição aos xenobióticos, como o cobre (Cu) e o B[a]P (Gómez-Mendikute e Cajaraville, 2003).

É importante ressaltar que o uso de respostas de biomarcadores em bivalves é por vezes controversa devido à variabilidade em algumas atividades de enzimas relacionadas com a estádios de maturação gonadal, idade, temperatura e disponibilidade de alimentos, tornando difícil estabelecer claramente as relações entre contaminantes e mudanças de biomarcadores (Bend e James, 1978; Bocchetti e Regoli, 2006; Fisher et al., 2000; Najimi et al., 1997; Sheehan e Power, 1999). Porém acredita-se que o aumento observado na atividade de GST após exposição dos exemplares de *P. perna* às amostras de água dos pontos amostrais do litoral de Aracruz é, provavelmente,

devido ao aumento do processo de biotransformação do xenobiótico pelos animais expostos, conforme sugerido por Sáenz et al. (2010).

De acordo com nosso teste de correlação, a atividade da GST nas brânquias foi mais influenciada pela presença de Mn na água e pela bioacumulação de Cr, enquanto a glândula digestiva foi mais influenciada pela bioacumulação de Ni. Tais induções da GST nos dois órgãos é parte de uma resposta adaptativa ao estresse químico (Gadagbui e James, 2000), envolvendo a desintoxicação de intermediários reativos (van der Oost et al., 2003). Assim como observado por Sáenz et al. (2010), nosso trabalho também identificou atividade da GST sendo influenciada de um modo específico em cada órgão, ao detectarmos uma menor atividade na glândula digestiva em relação às brânquias, que pode ser devido ao tempo de exposição pequeno e/ou à não oferta de alimento aos animais durante o tempo de exposição, já que Bocchetti e Regoli (2006) afirmam que a disponibilidade de alimentos também pode ser responsável por alterações na atividade da GST. As brânquias também estão diretamente expostas aos produtos químicos, tendo alta taxa de replicação de células, enquanto os demais tecidos são expostos após a distribuição dos produtos químicos e / ou seus metabólitos no corpo (Vosloo et al., 2012).

O aumento da atividade de GST observado no presente trabalho e as demais vias de defesa quando não se mostram suficientes para eliminar os produtos do contaminante, tais elementos acabam por comprometer o DNA do animal (Sáenz et al., 2010), como observado em nosso estudo. Uma vez na célula os íons metálicos livres se ligam em proteínas específicas para processos de desintoxicação (Kádár et al., 2001), mas quando se ultrapassa a capacidade de ligação destas proteínas se induz uma resposta tóxica (Vosloo et al., 2012).

Os coeficientes de correlação encontrados em nossa análise de PCA foram “fracos”, explicando pouco a variância no conjunto de dados originais. Liu et al. (2003) classificaram os fatores de carga encontrados na análise da PCA como "forte", "moderado" e "fraco" correspondente aos valores de carga absoluta $> 0,75$, $0,75-0,50$ e $0,50-0,3$ respectivamente. Tal fato aponta para a possibilidade da resposta dos biomarcadores observada, após a exposição à água de Aracruz, ter sido causada por outros metais presentes na água, ou

outros agentes químicos ou fatores de estresse não mensurados neste estudo, que influenciam isoladamente ou sinergicamente aos elementos avaliados. Os efeitos sinérgicos produzidos por metais e poluentes orgânicos têm sido frequentemente documentados (Doney, 2010) e não podem ser excluídos do impacto tóxico observado no presente estudo. De acordo com Cesar et al. (2007) a maioria dos produtos químicos antropogênicos e materiais residuais, incluindo produtos químicos orgânicos e inorgânicos tóxicos, contribuem para a degradação dos ambientes aquáticos que são constantemente afetados por múltiplas fontes de contaminação ao redor do mundo. Desta forma, como os resultados do Índice de Danos ao DNA e da atividade da GST das brânquias e da glândula digestiva não apresentaram nenhuma forte tendência com nenhum fator avaliado, sugerimos que tais biomarcadores sofreram influência também de outros contaminantes.

5. CONCLUSÃO

Levando-se em conta a espécie de mexilhão estudada, *Perna perna*, e as condições experimentais utilizadas neste estudo, os resultados mostraram que a exposição à água coletada em 10 pontos amostrais do litoral de Aracruz, ES, nas quatro campanhas realizadas entre 2014 e 2015, certamente provocou alterações importantes nos biomarcadores analisados, bem como alterações significativas nas concentrações teciduais da maioria dos elementos quantificados. Estes resultados indicam que o litoral de Aracruz está sofrendo com pressões antrópicas, causadas não necessariamente por elevadas concentrações de metais. Como os biomarcadores analisados não são específicos para contaminação por metais, eles podem refletir diferentes formas de estresse ambiental. A análise de correlação aplicada confirmam essa inespecificidade dos biomarcadores testados, visto que não se conseguiu estabelecer relações exclusivas entre os contaminantes investigados e as mudanças dos biomarcadores. É possível concluir então que outros compostos presentes na água possam também ter influenciado nas respostas observadas durante o período de exposição.

Assim, recomenda-se que novos estudos sejam desenvolvidos na área, ampliando os poluentes elementares investigados, afim de se obter uma resposta mais completa sobre as fontes causadoras do estresse ambiental da

região. No geral, os ensaios demonstrados neste trabalho fornecem um conjunto de práticas recomendadas como ferramentas de biomonitoramento, altamente sensíveis para avaliação da saúde ambiental.

6. REFERÊNCIAS

- Ablanedo, N., González, H., Ramirez, M., Torres, I., 1990. Evaluación del erizo de mar *Echinometra lucunter* como indicador de la contaminación por metales pesados. *Aquat. Living Resour.* 3, 113–120. doi:10.1051/alr
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2006. Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata - Echinoidea) - ABNT NBR 15350.
- ABNT NBR 15350 - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2012. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata; Echinoidea);
- ABNT NBR 15469 - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2015. Ecotoxicologia - Coleta, preservação e preparo de amostras.
- Ahtiainen, J., Nakari, T., Silvonen, J., 1996. Toxicity of TCF and ECF pulp bleaching effluents assessed by biological toxicity tests., in: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Florida, pp. 33–40.
- Akcha, F., Tanguy, a., Leday, G., Pelluhet, L., Budzinski, H., Chiffolleau, J.F., 2004. Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast. *Mar. Environ. Res.* 58, 753–756. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.090
- Ali, M., Sreekrishnan, T., 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Adv. Environ. Res.* 5, 175–196. doi:10.1016/S1093-0191(00)00055-1
- Allen, H., 1971. Effects of petroleum fractions on the early development of a sea urchin. *Mar. Pollut. Bull.* 2, 138–140. doi:10.1016/0025-326X(71)90034-8
- Almeida, E.A. de, 2003. Avaliação de variações bioquímicas em moluscos bivalves em resposta ao estresse ambiental.
- Aloupi, M., Angelidis, M., 2001. Geochemistry of natural and anthropogenic metals in the coastal sediments of the island of Lesbos, Aegean Sea. *Environ. Pollut.* 113, 211–219. doi:10.1016/S0269-7491(00)00173-1
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., Carrião Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Eliza Ronsein, G., Alexandre Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Maria Gracioso Martins, A., Helena Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146, 588–600. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.040
- Anderson, B., Hunt, J., Phillips, B., Thompson, B., Lowe, S., Taberski, K., Scott Carr, R., 2007. Patterns and trends in sediment toxicity in the San Francisco Estuary. *Environ. Res.* 105, 145–155. doi:10.1016/j.envres.2006.07.005
- Andrade, V.M., de Freitas, T.R.O., da Silva, J., 2004. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of

- genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 560, 57–67. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.02.006
- Andral, B., Galgani, F., Tomasino, C., Bouchoucha, M., Blottiere, C., Scarpato, A., Benedicto, J., Deudero, S., Calvo, M., Cento, A., Benbrahim, S., Boulahdid, M., Sammari, C., 2011. Chemical Contamination Baseline in the Western Basin of the Mediterranean Sea Based on Transplanted Mussels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 261–271. doi:10.1007/s00244-010-9599-x
- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 704–712. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.05.008
- APHA - American Public Health Association, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. Washington.
- ASTM - American Society for Testing and Materials, 2012. *Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos*.
- Atli, G., Canli, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 145, 282–7. doi:10.1016/j.cbpc.2006.12.012
- Ausili, A., Mecozzi, M., Gabellini, M., Ciuffa, G., Mellara, F., 1998. Physico-chemical characteristics and multivariate analysis of contaminated harbour sediments. *Water Sci. Technol.* 37, 131–139.
- Azqueta, A., Collins, A.R., 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* 87, 949–68. doi:10.1007/s00204-013-1070-0
- Baig, S., Liechti, P.A., 2001. Ozone treatment for biorefractory COD removal. *Water Sci. Technol.* 43, 197–204.
- Bainy, A.C.D., Almeida, E.A., Müller, I.C., Ventura, E.C., Medeiros, I.D., 2000. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar. Environ. Res.* 50, 411–416. doi:10.1016/S0141-1136(00)00039-8
- Barbosa, J.S., Cabral, T.M., Ferreira, D.N., Agnez-Lima, L.F., Batistuzzo de Medeiros, S.R., 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 320–325. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.10.008
- Barnes, R.D., 2006. *Zoologia dos invertebrados*. Roca.
- Barnes, R.S.K., Calow, P.P., Olive, P.J.W., Golding, D.W., Spicer, J.I., 2009. *The Invertebrates: A Synthesis*. Wiley-Blackwell.
- Barra, C.M., Santelli, R.E., Abrão, J.J., 2000. Especificação de Arsênio -Uma Revisão. *Quim. Nova* 23, 58–70.
- Baršienė, J., Lehtonen, K.K., Koehler, A., Broeg, K., Vuorinen, P.J., Lang, T., Pempkowiak, J., Šyvokienė, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Repečka, R., Vuontisjärvi, H., Kopecka, J., 2006. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipėda-Būtingė

- area (Baltic Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 53, 422–436. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.03.009>
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., Widdows, J., 1985. *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. Praeger, New York.
- Bejarano, A.C., Chandler, G.T., He, L., Coull, B.C., 2006. Individual to population level effects of South Louisiana crude oil water accommodated hydrocarbon fraction (WAF) on a marine meiobenthic copepod. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 332, 49–59. doi:[10.1016/j.jembe.2005.11.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2005.11.006)
- Belabed, B.-E., Laffray, X., Dhib, A., Fertouna-Belakhal, M., Turki, S., Aleya, L., 2013. Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria), *Marine Pollution Bulletin*. doi:[10.1016/j.marpolbul.2013.06.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.004)
- Belivermis, M., Kiliç, O., Çotuk, Y., 2016. Assessment of metal concentrations in indigenous and caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*) on entire Turkish coastline. *Chemosphere* 144, 1980–1987. doi:[10.1016/j.chemosphere.2015.10.098](http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.098)
- Bellotto, V.R., De Brito, P.C., Manzoni, G., Wegner, E., 2005. Biomonitoramento ativo de metais traço e efeito biológico em mexilhões transplantados para área de influência de efluente de indústria de beneficiamento de aço - Fase I. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.* 9, 33. doi:[10.14210/bjast.v9n2.p33-37](http://dx.doi.org/10.14210/bjast.v9n2.p33-37)
- Bend, J.R., James, M.O., 1978. No Title Xenobiotic metabolism in marine freshwater species, in: Malins, D.C., Sargent, J.. (Eds.), *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, London, England, pp. 125–188.
- Bianchi, J., Espindola, E.L.G., Marin-Morales, M.A., 2011. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 826–833. doi:[10.1016/j.ecoenv.2010.11.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.006)
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 463, 33–51. doi:[10.1016/S1383-5742\(00\)00004-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00004-1)
- Blackmore, G., Wang, W.-X., 2003. Comparison of metal accumulation in mussels at different local and global scales. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 388–395. doi:[10.1002/etc.5620220221](http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620220221)
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913–21. doi:[10.1016/j.chemosphere.2006.03.049](http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.049)
- Bolam, S.G., 2014. Macrofaunal recovery following the intertidal recharge of dredged material: A comparison of structural and functional approaches. *Mar. Environ. Res.* 97, 15–29. doi:[10.1016/j.marenvres.2014.01.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.01.008)
- Bonfim, C.L.L., 2005. Efeitos do fenol e 4-clorofenol sobre o desenvolvimento

- embriolarval de *echinometra lucunter* (linnaeus, 1758): avaliação dessas substâncias como referência. Universidade Federal da Bahia.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brooks, R., Rumsby, M., 1967. Studies on the uptake of cadmium by the oyster, *Ostrea sinuata* (Lamarck). *Mar. Freshw. Res.* 18, 53. doi:10.1071/MF9670053
- Brooks, S.J., Harman, C., Grung, M., Farmen, E., Ruus, A., Vingen, S., Godal, B.F., Baršienė, J., Andreikėnaitė, L., Skarphéðinsdóttir, H., Liewenborg, B., Sundt, R.C., 2011. Water Column Monitoring of the Biological Effects of Produced Water from the Ekofisk Offshore Oil Installation from 2006 to 2009. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 74, 582–604. doi:10.1080/15287394.2011.550566
- Brown, K.R., McPherson, R.G., 1992. Concentrations of copper, zinc and lead in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) from the Georges River, New South Wales. *Sci. Total Environ.* 126, 27–33.
- Bubb, J.M., Lester, J.N., 1991. An Honour Volume For Eric I. Hamilton The impact of heavy metals on lowland rivers and the implications for man and the environment. *Sci. Total Environ.* 100, 207–233. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(91)90379-S
- Burgeot, T., Woll, S., Galgani, F., 1996. Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French coasts. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 39–46. doi:10.1016/0025-326X(96)89526-9
- Burton, E.D., Phillips, I.R., Hawker, D.W., 2005. Trace metal distribution and enrichment in benthic, estuarine sediments: Southport Broadwater, Australia. *Environ. Geochem. Health* 27, 369–83. doi:10.1007/s10653-004-7086-x
- Buruaem, L.M., Hortellani, M.A., Sarkis, J.E., Costa-Lotufo, L. V, Abessa, D.M.S., 2012. Contamination of port zone sediments by metals from Large Marine Ecosystems of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 479–88. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.017
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4
- Cajaraville, M.P., Olabarrieta, I., Marigomez, I., 1996. In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 253–60. doi:10.1006/eesa.1996.0108
- Canova, S., Degan, P., Peters, L., Livingstone, D., Voltan, R., Venier, P., 1998. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-

- immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 399, 17–30. doi:10.1016/S0027-5107(97)00263-7
- Carletti, E., Sulpizio, M., Bucciarelli, T., Del Boccio, P., Federici, L., Di Ilio, C., 2008. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. *Aquat. Toxicol.* 90, 48–57. doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.015
- Castro, H., Aguilera, P.A., Martinez Vidal, J.L., Carrique, E.L., 1999. Differentiation of Clams from Fishing Areas as an Approximation to Coastal Quality Assessment. *Environ. Monit. Assess.* 54, 229–237. doi:10.1023/A:1005960212211
- Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001
- Cesar, A., Choueri, R.B., Riba, I., Morales-Caselles, C., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Abessa, D.M.S., DelValls, T.A., 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. doi:10.1016/j.envint.2006.11.007
- Cesar, A., Lia, L.R.B., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cortez, F.S., Choueri, R.B., Orte, M.R. De, Rachid, B.R.F., 2014. Science of the Total Environment Environmental assessment of dredged sediment in the major Latin American seaport (Santos , São Paulo — Brazil): An integrated approach. *Sci. Total Environ.* 497–498, 679–687. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.037
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1999. Metodo de Ensaio: Agua do Mar-teste de Toxicidade Cronica de Curta Duracao com *Lytechinus variegatus*, Lamark, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). Cia. De Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de Sao Paulo, São Paulo.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1992. Água do Mar – teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea) Norma Técnica L5.250.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1990. Projeto: Desenvolvimento de implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos.
- Chaillou, G., Schäfer, J., Anschutz, P., Lavaux, G., Blanc, G., 2003. The behaviour of arsenic in muddy sediments of the Bay of Biscay (France). *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2993–3003. doi:10.1016/S0016-7037(03)00204-7
- Chan, H.M., 1989. Temporal and spatial fluctuations in trace metal concentrations in transplanted mussels in Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.* 20, 82–86. doi:10.1016/0025-326X(89)90231-2
- Chan, H.M., 1988. Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and

- zinc by the green mussel *Perna viridis*. *Mar. Ecol.* 48, 295–303.
- Chandler, T.G., Cary, T.L., Volz, D.C., Walse, S.S., Ferry, J.L., Klosterhaus, S.L., 2004. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 117. doi:10.1897/03-124
- Chapman, P.M., McDonald, B.G., Lawrence, G.S., 2002. Weight-of-Evidence Issues and Frameworks for Sediment Quality (And Other) Assessments. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 8, 1489–1515. doi:10.1080/20028091057457
- Chase, M.E., Jones, S.H., Hennigar, P., Sowles, J., Harding, G.C.H., Freeman, K., Wells, P.G., Krahforst, C., Coombs, K., Crawford, R., Pederson, J., Taylor, D., 2001. Gulfwatch: Monitoring spatial and temporal patterns of trace metal and organic contaminants in the Gulf of Maine (1991-1997) with the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 490–504. doi:10.1016/S0025-326X(00)00193-4
- Cheng, T.C., 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266, 343–79.
- Cheung, C.C., Zheng, G., Lam, P.K., Richardson, B., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 181–191. doi:10.1016/S0025-326X(01)00301-0
- Cheung, C.C., Zheng, G., Li, A.M., Richardson, B., Lam, P.K., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 52, 189–203. doi:10.1016/S0166-445X(00)00145-4
- Chiu, S.T., 1988. *Anthocidaris crassispina* (Echinodermata: chinoidea) grazing epibenthic macroalgae in Hong Kong. *Asian Mar. Biol.* 5, 123–132.
- Choueri, R.B., Cesar, A., Abessa, D.M.S., Torres, R.J., Morais, R.D., Riba, I., Pereira, C.D.S., Nascimento, M.R.L., Mozeto, A.A., DelValls, T.A., 2009. Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South Atlantic littoral zones: Comparison against national and international sediment quality benchmarks. *J. Hazard. Mater.* 170, 320–331. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.093
- Coimbra, A.G., 2003. Distribuição de metais pesados em moluscos e sedimentos nos manguezais de Coroa Grande e da Enseada das Garças, Baía de Sepetiba, RJ. Universidade Federal Fluminense.
- Collins, A.R., Ai-guo, M., Duthie, S.J., 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res. Repair* 336, 69–77. doi:10.1016/0921-8777(94)00043-6
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispões sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências., Diário Oficial da União.

- Conners, D.E., Black, M.C., 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 362–71.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 106–21. doi:10.1006/eesa.1999.1842
- Cruz, A.C., 2001. Seleção de substâncias orgânicas como referência em testes de toxicidade com embriões de ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1928): Controle da qualidade analítica de testes ecotoxicológicos. Universidade Federal da Bahia.
- D'Silva, C., Kureishy, T.W., 1978. Experimental studies on the accumulation of copper and zinc in the green mussel. *Mar. Pollut. Bull.* 9, 187–190.
- Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. 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. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00005-9
- DelValls, T.A., Forja, J.M., Gómez-Parra, A., 1998. The use of multivariate analysis to link sediment contamination and toxicity data to establish sediment quality guidelines: An example in the Gulf of Cádiz (SW, Spain). *Ciencias Mar.* 24, 127–154.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161–72. doi:10.1007/BF00117081
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 5–32. doi:10.1007/s10565-008-9072-z
- Díaz, A., Carro, S., Santiago, L., Estévez, J., Guevara, C., Blanco, M., Sánchez, L., Sánchez, L., López, N., Cruz, D., López, R., Cuetara, E.B., Fuentes, J.L., 2009. Estimates of DNA strand breakage in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) leukocytes measured with the Comet and DNA diffusion assays. *Genet. Mol. Biol.* 32, 367–72. doi:10.1590/S1415-47572009005000030
- Diegues, A.C., 2001. *Ecologia humana e planejamento costeiro*, 2nd ed. Edusp, São Paulo.
- Dinnel, P.A., Link, J.M., Stober, Q.J., Letourneau, M.W., Roberts, W.E., 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 748–755. doi:10.1007/BF01225012
- Dinnel, P.A., Stober, Q.J., 1987. Application of the sea urchin sperm bioassay to sewage treatment efficiency and toxicity in marine waters. *Mar. Environ. Res.* 21, 121–133. doi:10.1016/0141-1136(87)90046-8

- Doney, S.C., 2010. The Growing Human Footprint on Coastal and Open-Ocean Biogeochemistry. *Science* (80-.). 328, 1512 LP-1516.
- Environment Canada, 1997. Biological Test Method: Fertilization Assay using Echinoids (sea urchins and sand dollars). Method Development and Applications. Environmental Technology Center, Ottawa.
- Environment Canada, 1999. Guidance document on application and interpretation of single-species testes in environmental toxicology.
- Environment Canada, 1995. Guidance document on measurements of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant.
- Environment Canada, 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants.
- Falk-Petersen, I.-B., 1979. Toxic effects of aqueous extracts of ekofisk crude oil, crude oil fractions, and commercial oil products on the development of sea urchin eggs. *Sarsia* 64, 161–169. doi:10.1080/00364827.1979.10411377
- Fang, J.K.H., Wu, R.S.S., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Shin, P.K.S., 2008. Induction, adaptation and recovery of lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 467–472. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.03.038
- Fichet, D., Radenac, G., Miramand, P., 1998. Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity, *Marine Pollution Bulletin*. Pergamon. doi:10.1016/S0025-326X(97)00190-2
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51, 115–38.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317, 207–233. doi:10.1016/S0048-9697(03)00141-4
- Fliedner, A., Klein, W., 1996. Effects of Lindane on the Planktonic Community in Freshwater Microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 228–235. doi:http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1996.0029
- Folk, R., 1974. *Petrology of Sedimentary Rocks*. Hemphills Bookstore, Austin.
- Fossi, M.C., Marsili, L., Neri, G., Casini, S., Bearzi, G., Politi, E., Zanardelli, M., Panigada, S., 2000. Skin biopsy of Mediterranean cetaceans for the investigation of interspecies susceptibility to xenobiotic contaminants. *Mar. Environ. Res.* 50, 517–521. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00127-6
- Freitas, R., Ramos Pinto, L., Sampaio, M., Costa, A., Silva, M., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Figueira, E., 2012. Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 110, 43–53. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2012.01.011
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation

- of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 681, 80–92. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001
- Fuentes-Rios, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gavilán, J.F., Barra, R., 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): Biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere* 61, 192–199. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.062
- Fung, C.N., Lam, J.C.W., Zheng, G.J., Connell, D.W., Monirith, I., Tanabe, S., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2004. Mussel-based monitoring of trace metal and organic contaminants along the east coast of China using *Perna viridis* and *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* 127, 203–216. doi:10.1016/j.envpol.2003.08.007
- Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquat. Toxicol.* 49, 27–37. doi:10.1016/S0166-445X(99)00073-9
- Galvão, J.A., 2004. Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP. Universidade de São Paulo.
- Giesy, J.P., Hook, R.A., 1989. Freshwater sediment quality criteria: Toxicity bioassessment., in: Baudo, R., Giesy, J.P., Muntau, H. (Eds.), *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp. 265–348.
- Gillikin, D.P., Dehairs, F., Baeyens, W., Navez, J., Lorrain, A., Andr??, L., 2005. Inter- and intra-annual variations of Pb/Ca ratios in clam shells (*Mercenaria mercenaria*): A record of anthropogenic lead pollution? *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1530–1540. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.06.020
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 2009. The Mussel Watch. *Environ. Conserv.* 5, 101–125. doi:10.1017/S0376892900005555
- Goldburg, R., Elliot, M., Naylor, R.L., 2001. *Marine Aquaculture in the United States: Environmental impacts and policy options*. Pew Oceans Commission, Arlington, Virginia.
- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. Vitr.* 17, 539–546. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6
- Gowland, B.T.G., McIntosh, A.D., Davies, I.M., Moffat, C.F., Webster, L., 2002. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Mar. Environ. Res.* 54, 231–235. doi:10.1016/S0141-1136(02)00129-0
- Gray, J.S., 1992. Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection. *Mar. Pollut. Bull.* 25, 48–50. doi:10.1016/0025-326X(92)90184-8
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77, 218–31.

- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- HABTEC - Engenharia Sanitária e Ambiental Ltda, 1997. Diagnóstico do Plano Diretor das Bacias dos rios Santa Maria da Vitória e Jucu., Relatório Diagnóstico.
- Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G.T., Shaw, T.J., 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar. Environ. Res.* 51, 247–64.
- Hardiman, S., Pearson, B., 1995. Heavy metals, TBT and DDT in the Sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) sampled from the Hawkesbury River estuary, NSW, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 563–567.
- Hayase, D., Horai, S., Isobe, T., Miller, T.W., Takahashi, S., Omori, K., Tanabe, S., 2009. Monitoring Trace Elements in Coastal Waters Using Sardine as a Bioindicator 167–175.
- Heslinga, G.A., 1976. Effects of copper on the coral-reef echinoid *Echinometra mathaei*. *Mar. Biol.* 35, 155–160. doi:10.1007/BF00390937
- Heuser, V.D., de Andrade, V.M., Peres, A., Gomes de Macedo Braga, L.M., Bogo Chies, J.A., 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol. Int.* 32, 1223–1229. doi:10.1016/j.cellbi.2008.07.005
- Hewitt, L.M., Marvin, C.H., 2005. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 589, 208–232. doi:10.1016/j.mrrev.2005.02.001
- Hicks, G.R.F., Coull, B.C., 1983. The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 67–175. doi:10.1234/2013/999990.
- Huber, P.C., Almeida, W.P., 2008. GLUTATIONA E ENZIMAS RELACIONADAS: PAPEL BIOLÓGICO E IMPORTÂNCIA EM PROCESSOS PATOLÓGICOS. *Quim. Nov.* 31, 1170–1179.
- Hugget, R.J., Unger, M.A., Seligman, P.F., Valkirs, A.O., 1992. The marine biocide Tributyltin: Assessing and managing the environmental risks. *Environ. Sci. Technol.* 26, 232–237.
- Ihnat, M., Gamble, D.S., Gilchrist, G.F.R., 1993. Determination of Trace Element Levels in Natural Fresh Water by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 53, 63–78. doi:10.1080/03067319308045983
- Islam, M.S., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 624–649. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.12.004
- Jeffries, K.M., Jackson, L.J., Ikonou, M.G., Habibi, H.R., 2010. Presence of natural and anthropogenic organic contaminants and potential fish health impacts along two river gradients in Alberta, Canada. *Environ. Toxicol.*

- Chem. 29, 2379–2387. doi:10.1002/etc.265
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–221. doi:10.1093/mutage/gen014
- Joyeux, J.-C., Campanha Filho, E.A., Jesus, H.C. de, 2004. Trace metal contamination in estuarine fishes from Vitória Bay, ES, Brazil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 47, 765–774. doi:10.1590/S1516-89132004000500012
- Kádár, E., Salánki, J., Jugdaohsingh, R., Powell, J.J., McCrohan, C.R., White, K.N., 2001. Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquat. Toxicol.* 55, 137–148. doi:10.1016/S0166-445X(01)00183-7
- Kammann, U., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M., Wosniok, W., 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environ. Pollut.* 132, 279–287. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.021
- Kammann, U., Bunke, M., Steinhart, H., Theobald, N., 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 498, 67–77. doi:10.1016/S1383-5718(01)00268-6
- Kennish, M.J., 1991. *Ecology of estuaries : anthropogenic effects*. CRC Press.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The role of glutathione in detoxication. *Environ. Health Perspect.* 49, 59–69.
- Kim, I.-Y., Hyun, C.-K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 288–297. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.05.019
- Kitzmann, D., Asmus, M., 2006. Gestão ambiental portuária: desafios e possibilidades*. *RAP Rio Janeiro* 40, 1041–60.
- Kobayashi, N., 2005. Marine Pollution Bioassay using Sea Urchins. *Environ. Sci.* 18, 155–167. doi:10.11353/sesj1988.18.155
- Kobayashi, N., 1977. Preliminary experiments with sea urchin pluteus and metamorphosis in marine pollution bioassay. *Natl. Mar. Biol. Libr.* 24, 9–21.
- Kobayashi, N., Naidenko, I.K., Vaschenko, M.A., 1994. Standardization of the biotest based on using of sea urchin embryos 20, 457–464.
- Kobayashi, N., Okamura, H., 2004. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere* 55, 1403–1412. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.11.052
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751–4.
- Kralik, M., Haslinger, E., Picer, M., Picer, N., Ottner, F., 2007. PCB-anomalies in the sediments of the harbour basin of Zadar (Croatia) as consequence of war action and / or industrial contamination. *CHINESE J. GEOCHEMISTRY* 25.
- Kristensen, E., Andersen, F.Ø., 1987. Determination of organic carbon in

- marine sediments: a comparison of two CHN-analyzer methods. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 109, 15–23. doi:10.1016/0022-0981(87)90182-1
- Krull, M., Abessa, D.M.S., Hatje, V., Barros, F., 2014. Integrated assessment of metal contamination in sediments from two tropical estuaries. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 195–203. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.038
- Kulicova, I., Seisuma, Z., Legzdina, M., 1985. Heavy metals in marine organisms, in: *Heavy Metals in Water Organisms*. Akadtmiai Kiado, Budapest, pp. 141–154.
- Kumari, M. V, Hiramatsu, M., Ebadi, M., 1998. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radic. Res.* 29, 93–101.
- Kusk, K.O., Petersen, S., 1997. Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1629–1633. doi:10.1002/etc.5620160810
- Kusk, K.O., Wollenberger, L., 2007. Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. *Ecotoxicology* 16, 183–95. doi:10.1007/s10646-006-0112-2
- Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Bao, V.W.W., Lee, J.-S., 2008. Copper toxicity in the marine copepod *Tigropus japonicus*: Low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 632–636. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.03.026
- Lakshmanan, P.T., Nambisan, P.N.K., 1989. Bioaccumulation and depuration of some trace metals in the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 131–138. doi:10.1007/BF01702249
- Lau, P., Wong, H., 2003. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1563–1572. doi:10.1016/S0025-326X(03)00321-7
- Leal, D.A.G., Franco, R.M.B., 2008. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. *Rev Panam Infectol* 10, 48–57.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 544, 43–64. doi:10.1016/S1383-5742(03)00017-6
- Lehtonen, K.K., Turja, R., Budzinski, H., Devier, M.-H., 2016. An integrated chemical-biological study using caged mussels (*Mytilus trossulus*) along a pollution gradient in the Archipelago Sea (SW Finland, Baltic Sea). *Mar. Environ. Res.* 119, 207–221. doi:10.1016/j.marenvres.2016.06.003
- Lekube, X., Izagirre, U., Soto, M., Marigómez, I., 2014. Lysosomal and tissue-level biomarkers in mussels cross-transplanted among four estuaries with different pollution levels. *Sci. Total Environ.* 472, 36–48. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.075
- Lemos, P., 2003. Respostas bioquímicas e moleculares em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) expostos ao óleo diesel.

- Lercari, D., Defeo, O., Celentano, E., 2002. Consequences of a freshwater canal discharge on the benthic community and its habitat on an exposed sandy beach. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 1397–1404. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00304-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00304-1)
- Li, X., Wai, O.W.H., Li, Y.S., Coles, B.J., Ramsey, M.H., Thornton, I., 2000. Heavy metal distribution in sediment profiles of the Pearl River estuary, South China. *Appl. Geochemistry* 15, 567–581. doi:10.1016/S0883-2927(99)00072-4
- Lions, J., Guérin, V., Bataillard, P., van der Lee, J., Laboudigue, A., 2010. Metal availability in a highly contaminated, dredged-sediment disposal site: Field measurements and geochemical modeling. *Environ. Pollut.* 158, 2857–2864. doi:10.1016/j.envpol.2010.06.011
- Liu, C.W., Lin, K.H., Kuo, Y.M., 2003. Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a blackfoot disease area in Taiwan. *Sci. Total Environ.* 313, 77–89. doi:10.1016/S0048-9697(02)00683-6
- Liu, J.H., Kueh, C.S.W., 2005. Biomonitoring of heavy metals and trace organics using the intertidal mussel *Perna viridis* in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 857–875. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.04.014
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–66.
- Lorenzo, J., Nieto, O., Beiras, R., 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat. Toxicol.* 58, 27–41. doi:10.1016/S0166-445X(01)00219-3
- Losso, C., Arizzi Novelli, A., Picone, M., Volpi Ghirardini, A., Ghetti, P.F., Rudello, D., Ugo, P., 2004. Sulfide as a confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: comparisons with chemical analysis data. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 396–401.
- Loureiro, D.D., Araujo, C.L., Lacerda, L.D., 2008. Efeitos da dragagem na distribuição espacial de mercúrio no sedimento superficial da Lagoa Rodrigo de Freitas. I Congr. Ibero-Americano Oceanogr. – I CIAO Fortaleza.
- Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H., 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study 129, 189–196.
- MacFarlane, G., Burchett, M., 2000. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquat. Bot.* 68, 45–59. doi:10.1016/S0304-3770(00)00105-4
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 70, 83–93. doi:10.1016/j.aquatox.2004.07.003
- Marigómez, I., Zorita, I., Izagirre, U., Ortiz-Zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., Orbea, A., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2013. Combined use

- of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquat. Toxicol.* 136, 32–48. doi:10.1016/j.aquatox.2013.03.008
- Marques, D.C., Matta, S.L.P., Oliveira, J.A., Dergam, J.A., 2009. Alterações histológicas em brânquias de *Astyanax bimaculatus* causadas pela exposição aguda ao zinco. *Rev. Bras. Toxicol.* 22–26.
- Mastroi, R.R., 2002. Testes de toxicidade com gamentas de ouriço- do-mar (fertilização)., in: NASCIMENTO, I.A., SOUSA, E.C.P.M., NIPPER, M. (Eds.), *Métodos Em Ecotoxicologia: Aplicações No Brasil*. Artes Gráficas e Indústria LTDA, São Paulo, p. 262.
- Mendiguchía, C., Moreno, C., García-Vargas, M., 2007. Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients. *Chemosphere* 69, 1509–1517. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.082
- Mersch, J., Beauvais, M.-N., Nagel, P., 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat. Res. Toxicol.* 371, 47–55. doi:10.1016/S0165-1218(96)90093-2
- Micó, C., Recatalá, L., Peris, M., Sánchez, J., 2006. Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere* 65, 863–872. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.016
- Mirlean, N., Andrus, V.E., Baisch, P., Griep, G., Casartelli, M.R., 2003. Arsenic pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1480–1484. doi:10.1016/S0025-326X(03)00257-1
- Mirlean, N., Baisch, P., Travassos, M.P., Nassar, C., 2011. Calcareous algae bioclast contribution to sediment enrichment by arsenic on the Brazilian subtropical coast. *Geo-Marine Lett.* 31, 65–73. doi:10.1007/s00367-010-0215-x
- Mirlean, N., Medeanic, S., Garcia, F. a., Travassos, M.P., Baisch, P., 2012. Arsenic enrichment in shelf and coastal sediment of the Brazilian subtropics. *Cont. Shelf Res.* 35, 129–136. doi:10.1016/j.csr.2012.01.006
- Mitchelmore, C.L., Birmelin, C., Livingstone, D.R., Chipman, J.K., 1998. Detection of DNA Strand Breaks in Isolated Mussel (*Mytilus edulis*L.) Digestive Gland Cells Using the “Comet” Assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 51–58. doi:10.1006/eesa.1998.1666
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Lund Amado, L., Martinez Gaspar Martins, C., Lopes Leães Pinho, G., Soares Chaves, I., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 146, 221–234.

doi:10.1016/j.cbpc.2006.08.012

- Montagna, P.A., 1995. Rates of metazoan meiofaunal microbivory: A review. *Vie Milieu* 45, 1–9.
- Montserrat, J.M., Geracitano, L.A., Assis, H.C.S., Colares, E.P., Bianchini, A., 2006. Biomarcadores Bioquímicos., in: Lana, P.C., Bianchini, A., Ribeiro, C.A.O., Niencheski, L.F.H., Fillmann, G., Santos, C.S.G. (Eds.), *Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros-Diretrizes Metodológicas*. Museu Nacional/UFRJ, Rio de Janeiro, pp. 124–131.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31–36. doi:10.1016/S0003-2670(00)88444-5
- Nadmitov, B., Hong, S., In Kang, S., Chu, J.M., Gomboev, B., Janchivdorj, L., Lee, C.-H., Khim, J.S., 2015. Large-scale monitoring and assessment of metal contamination in surface water of the Selenga River Basin (2007-2009). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 2856–67. doi:10.1007/s11356-014-3564-6
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubèze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.F., Moukrim, A., 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 901–8.
- Narchi, W., Galvão-Bueno, M.S., 1997. ANATOMIA FUNCIONAL DE PERNA PERNA (L1NNÉ) (BIVALVIA, MYTILIDAE). *Rev. Bras. Zool.* 14, 135–168.
- Niencheski, L.F., Milani, M.R., Milani, I.B., 2008. Metais Traço: Água., in: *Poluição Marinha*. Interciência, Rio de Janeiro, p. 412.
- Nilin, J., Moreira, L.B., Aguiar, J.E., Marins, R., Moledo de Souza Abessa, D., Monteiro da Cruz Lotufo, T., Costa-Lotufo, L.V., 2013. Sediment quality assessment in a tropical estuary: The case of Ceará River, Northeastern Brazil. *Mar. Environ. Res.* 91, 89–96. doi:10.1016/j.marenvres.2013.02.009
- Nogueira, L., Garcia, D., Trevisan, R., Sanches, A.L.M., da Silva Acosta, D., Dafre, A.L., Oliveira, T.Y.K., de Almeida, E.A., 2015. Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5. *Chemosphere* 134, 210–216. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.034
- Nuss, P., Eckelman, M.J., 2014. Life Cycle Assessment of Metals: A Scientific Synthesis. *PLoS One* 9, e101298. doi:10.1371/journal.pone.0101298
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 567, 109–149. doi:10.1016/j.mrrev.2004.08.003
- Owens, J.E., Niemeyer, E.D., 2006. Analysis of chemical contamination within a canal in a Mexican border colonia. *Environ. Pollut.* 140, 506–515. doi:10.1016/j.envpol.2005.07.019
- Ozretić, B., Krajnović-Ozretić, M., 1985. Morphological and biochemical evidence of the toxic effect of pentachlorophenol on the developing embryos of the sea urchin. *Aquat. Toxicol.* 7, 255–263. doi:10.1016/0166-445X(85)90043-8

- Papadopoulos, A.I., Polemitou, I., Laifi, P., Yiangou, A., Tananaki, C., 2004. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica*: Kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 139, 93–97. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2004.09.010>
- Pavlica, M., Klobučar, G.I. V, Mojaš, N., Erben, R., Papeš, D., 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 490, 209–214. doi:10.1016/S1383-5718(00)00162-5
- Payne, P.I., 1987. Genetics of Wheat Storage Proteins and the Effect of Allelic Variation on Bread-Making Quality. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 141–153. doi:10.1146/annurev.pp.38.060187.001041
- Pereira, C.D.S., Abessa, D.M.D.S., Bairy, A.C.D., Zaroni, L.P., Gasparro, M.R., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Furley, T.H., De Sousa, E.C.P.M., 2007. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 462–9.
- Phillips, B.M., Anderson, B.S., Hunt, J.W., 1998. Spatial and temporal variation in results of purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) toxicity tests with zinc. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 453–459. doi:10.1002/etc.5620170316
- Phillips, D.J.H., 1995. The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 193–200. doi:10.1016/0025-326X(95)00194-R
- Phillips, D.J.H. (Acer E.L. (United K., 1991. Selected trace elements and the use of biomonitors in subtropical and tropical marine ecosystems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*
- Pierce, M.L., Moore, C.B., 1982. Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. *Water Res.* 16, 1247–1253. doi:10.1016/0043-1354(82)90143-9
- Poli, P., Buschini, A., Maria, F., 1999. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis* 14, 547–555.
- Prá, D., Lau, A.H., Knakievicz, T., Carneiro, F.R., Erdtmann, B., 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 585, 79–85. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.04.002
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 120, 497–507. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00238-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00238-5)
- Raisuddin, S., Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Schlenk, D., Lee, J.-S., 2007. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat. Toxicol.* 83, 161–173. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.04.005>
- Rank, J., 2009. Intersex in *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1271–1277.

doi:10.1016/j.ecoenv.2008.12.008

- Rank, J., Jensen, K., Jespersen, P.H., 2005. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 585, 33–42. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.04.008
- Reimann, C., Matschullat, J., Birke, M., Salminen, R., 2009. Arsenic distribution in the environment: The effects of scale. *Appl. Geochemistry* 24, 1147–1167. doi:10.1016/j.apgeochem.2009.03.013
- Renzi, M., Perra, G., Guerranti, C., Franchi, E., Focardi, S., 2009. Abatement efficiency of municipal wastewater treatment plants using different technologies (Orbetello Lagoon, Italy). *Int. J. Environ. Heal.* 3, 58–70.
- Riba, I., Casado-Martínez, C., Forja, J.M., DelValls, A., 2004. Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 271–282. doi:10.1897/03-146
- Riba, I., Forja, J.M., Gómez-Parra, A., DelValls, T.Á., 2004. Sediment quality in littoral regions of the Gulf of Cádiz: A triad approach to address the influence of mining activities. *Environ. Pollut.* 132, 341–353. doi:10.1016/j.envpol.2004.03.021
- Rodríguez-Ariza, A., Alhama, J., Díaz-Méndez, F.M., López-Barea, J., 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat. Res.* 438, 97–107.
- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., Elder, J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671–679. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00333-2
- Rubio, B., Nombela, M., Vilas, F., 2000. Geochemistry of Major and Trace Elements in Sediments of the Ria de Vigo (NW Spain): an Assessment of Metal Pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 968–980. doi:10.1016/S0025-326X(00)00039-4
- Ruschi, A., 2007. PARQUE NACIONAL MARINHO DE SANTA CRUZ – ES. [WWW Document]. URL http://ruschicolibri.com.br/parque_nacional.php (accessed 9.18.16).
- Sá, F., Machado, E.C., Angulo, R.J., Veiga, F.A., Brandini, N., 2006. Arsenic and Heavy metals in Sediments near Paranaguá Port, Southern Brazil. *J. Coast. Res.* 39, 1066–1068.
- Saco-Álvarez, L., Durán, I., Ignacio Lorenzo, J., Beiras, R., 2010. Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 491–499. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.01.018
- Sáenz, L.A., Seibert, E.L., Zanette, J., Fiedler, H.D., Curtius, A.J., Ferreira, J.F., Alves de Almeida, E., Marques, M.R.F., Bairy, A.C.D., 2010. Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 796–804. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.02.015

- Salazar, M.H., Salazar, S.M., 1991. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Mar. Environ. Res.* 32, 131–150. doi:10.1016/0141-1136(91)90038-A
- Sanders, M.J., Du Preez, H.H., Van Vuren, J.H.J., 1998. The Freshwater River Crab, *Potamonautes warreni*, as a Bioaccumulative Indicator of Iron and Manganese Pollution in Two Aquatic Systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 203–214. doi:10.1006/eesa.1998.1699
- Santana, L.I. De, Eduardo, C., Carvalho, V. De, Gomes, M.P., Metais, D. De, Perna, M., Santana, I. De, 2001. Distribuição de Metais Pesados em Mexilhões SUMMARY.
- Scanes, P., Roach, A., 1999. Determining natural 'background' concentrations of trace metals in oysters from New South Wales, Australia. *Environ. Pollut.* 105, 437–446. doi:10.1016/S0269-7491(99)00030-5
- Scanes, P.R., 1997. Uptake and depuration of organochlorine compounds in Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). *Mar. Freshw. Res.* 48, 1–6.
- Semmler, M.G.M.C., 2007. Biomonitoração de Hg, Cd, Pb e outros elementos em áreas costeiras do Estado de São Paulo por meio do mexilhão transplantado - Perna perna (Linnaeus, 1758). Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/T.85.2007.tde-27112007-140442
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 193–199. doi:10.1016/S0742-8413(99)00033-X
- Shulkin, V.M., Presley, B.J., Kavun, V.I., 2003. Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environ. Int.* 29, 493–502.
- Sim, W.-J., Lee, J.-W., Lee, E.-S., Shin, S.-K., Hwang, S.-R., Oh, J.-E., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere* 82, 179–186. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.026
- Sloman, K.A., 2007. Effects of trace metals on salmonid fish: The role of social hierarchies. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 326–345. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.003
- Souza, R.C.C.L., Fernandes, F.C., Silva, E.P., 2003. A study on the occurrence of the brown mussel *Perna perna* on the sambaquis of the Brazilian coast. *Rev. do Mus. Arqueol. e Etnol.* 13, 3–24.
- Souza, I.S. de, Araujo, G.S. de, Cruz, A.C.F., Fonseca, T.G., Camargo, J.B.D.A. de, Medeiros, G.F., Abessa, D.M. de S., 2016. Using and integrated approach to assess the sediment quality of an estuary from the semi-arid coast of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushi, K., Simazaki, D., 2003. Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-

- roadside environments. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 541, 31–44. doi:10.1016/S1383-5718(03)00177-3
- Stankovic, S., Jovic, M., 2012. Health risks of heavy metals in the mediterranean mussels as seafood. *Environ. Chem. Lett.* 10, 119–130. doi:10.1007/s10311-011-0343-1
- Stark, J.S., 1998. Effects of Copper on Macrobenthic Assemblages in Soft Sediments: A Laboratory Experimental Study. *Ecotoxicology* 7, 161–173. doi:10.1023/A:1014356327595
- Sternbeck, J., Östlund, P., 2001. Metals in Sediments from the Stockholm Region: Geographical Pollution Patterns and Time Trends. *Water, Air Soil Pollut. Focus* 1, 151–165. doi:10.1023/A:1017508322097
- Stronkhorst, J., Ariese, F., van Hattum, B., Postma, J.F., de Kluijver, M., Den Besten, P.J., Bergman, M.J.N., Daan, R., Murk, A.J., Vethaak, A.D., 2003. Environmental impact and recovery at two dumping sites for dredged material in the North Sea. *Environ. Pollut.* 124, 17–31. doi:10.1016/S0269-7491(02)00430-X
- Tanabe, S., Prudente, M.S., Kan-atireklap, S., Subramanian, A., 2000. Mussel watch: marine pollution monitoring of butyltins and organochlorines in coastal waters of Thailand, Philippines and India. *Ocean Coast. Manag.* 43, 819–839. doi:10.1016/S0964-5691(00)00060-0
- Theodorakis, C.W., 2001. Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology* 10, 245–56.
- Thompson, E.L., Taylor, D. a, Nair, S. V, Birch, G., Haynes, P. a, Raftos, D. a, 2012. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquat. Toxicol.* 109, 202–12. doi:10.1016/j.aquatox.2011.09.018
- Thompson, G., Swain, J., Kay, M., Forster, C., 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresour. Technol.* 77, 275–286. doi:10.1016/S0960-8524(00)00060-2
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–21.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, a., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J
- Torres, M.A., Pires Testa, C., Gáspari, C., Beatriz Masutti, M., Maria Neves Panitz, C., Curi-Pedrosa, R., Alves de Almeida, E., Di Mascio, P., Wilhelm Filho, D., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 923–932. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00142-X
- Torres, R.J., Abessa, D.M.S., Santos, F.C., Maranhão, L.A., Davanso, M.B., do Nascimento, M.R.L., Mozeto, A.A., 2009. Effects of dredging operations on

- sediment quality: contaminant mobilization in dredged sediments from the Port of Santos, SP, Brazil. *J. Soils Sediments* 9, 420–432. doi:10.1007/s11368-009-0121-x
- Tran, D., Moody, A.J., Fisher, A.S., Foulkes, M.E., Jha, A.N., 2007. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquat. Toxicol.* 84, 11–18. doi:10.1016/j.aquatox.2007.05.009
- Trefry, J.H., Naito, K.L., Trocine, R.P., Metz, S., 1995. Distribution and bioaccumulation of heavy metals from produced water discharges to the gulf of Mexico. *Water Sci. Technol.* 32, 31–36. doi:10.1016/0273-1223(95)00566-6
- Tsangaris, C., Vergolyas, M., Fountoulaki, E., Nizheradze, K., 2011. Oxidative Stress and Genotoxicity Biomarker Responses in Grey Mullet (*Mugil cephalus*) From a Polluted Environment in Saronikos Gulf, Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 482–490. doi:10.1007/s00244-010-9629-8
- Turja, R., 2015. Biological Effects of Contaminants in Mussels (*Mytilus trossulus*) Transplanted in Northern Baltic Sea Coastal Areas. Department of Environmental Sciences. Division of Aquatic Sciences.
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Uluturhan, E., Kucuksezgin, F., 2007. Heavy metal contaminants in Red Pandora (*Pagellus erythrinus*) tissues from the Eastern Aegean Sea, Turkey. *Water Res.* 41, 1185–1192. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.044
- USEPA (United States Environmental Protection Agency/Department of The Army U.S. Army Corps of Engineers), 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal — testing manual, EPA-503-8-91/001.
- Usero, J., González-Regalado, E., Gracia, I., 1997. Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic Coast of Southern Spain. *Environ. Int.* 23, 291–298. doi:10.1016/S0160-4120(97)00030-5
- Usero, J., Morillo, J., Gracia, I., 2005. Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere* 59, 1175–1181. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.089
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Venier, P., Maron, S., Canova, S., 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 390, 33–44. doi:10.1016/S0165-1218(96)00162-0
- Villela, I.V., de Oliveira, I.M., da Silva, J., Henriques, J.A.P., 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*)

- exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 605, 78–86. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.02.006
- Vosloo, D., Sara, J., Vosloo, A., 2012. Acute responses of brown mussel (*Perna perna*) exposed to sub-lethal copper levels: Integration of physiological and cellular responses. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 1–8. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.001
- Warnau, M., Ledent, G., Temara, A., Bouquegneau, J.-M., Jangoux, M., Dubois, P., 1995. Heavy metals in *Posidonia oceanica* and *Paracentrotus lividus* from seagrass beds of the north-western Mediterranean. *Sci. Total Environ.* 171, 95–99. doi:10.1016/0048-9697(95)04721-8
- Waterman, A., 1937. Effect of Salts of Heavy Metals on Development of the Sea Urchin, *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* 73, 401–420.
- Wells, P.G., Depledge, M.H., Butler, J.N., Manock, J., Knap, A.H., 2001. Rapid Toxicity Assessment and Biomonitoring of Marine Contaminants — Exploiting the Potential of Rapid Biomarker Assays and Microscale Toxicity Tests. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 799–804. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00054-6
- Widerlund, A., Ingri, J., 1995. Early diagenesis of arsenic in sediments of the Kalix River estuary, northern Sweden. *Chem. Geol.* 125, 185–196. doi:10.1016/0009-2541(95)00073-U
- Yabe, M.J.S., Oliveira, E. de, 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Quim. Nova* 21, 551–556. doi:10.1590/S0100-40421998000500003
- Yeung, J.W.Y., Zhou, G.-J., Leung, K.M.Y., 2016. Sub-lethal effects of cadmium and copper on RNA/DNA ratio and energy reserves in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 59–67. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.05.023
- Zagatto, P.A. Bertoletti, E., 2006. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos.
- Zhadan, P.M., Vashchenko, V. V., Malakhov, L.A., Medvedeva, V., G.R., 1992. The effect of environmental pollution, hydrocarbons and heavy metals on reproduction of sea urchins and bivalves, in: Ilyichev, V.I., Anikiev, V. V. (Eds.), *Oceanic and Anthropogenic Controls of Life in the Pacific Ocean*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp. 267–286.
- Zhang, W., Guo, Z., Zhou, Y., Liu, H., Zhang, L., 2015. Biotransformation and detoxification of inorganic arsenic in Bombay oyster *Saccostrea cucullata*. *Aquat. Toxicol.* 158, 33–40. doi:10.1016/j.aquatox.2014.10.021
- Zimmerman, L.E., Jutte, P.C., Van Dolah, R.F., 2003. An environmental assessment of the Charleston Ocean Dredged Material Disposal Site and surrounding areas after partial completion of the Charleston Harbor Deepening Project. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1408–1419. doi:10.1016/S0025-326X(03)00289-3
- Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201–208. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001

CAPÍTULO 4

Avaliação da contaminação por metais utilizando biomarcadores genotóxicos e enzimáticos em mexilhões (*Perna perna*) transplantados

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi o de avaliar a aplicabilidade da abordagem de transplante de organismos bivalves, por 60 dias, em um ambiente marinho costeiro antropicamente impactado com grande aporte fluvial, lançamento de esgoto industrial e doméstico, além de forte tráfego portuário. Para tal foram realizadas análises de quantificação de metais (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Pb) e de um semi metal (As) teciduais, de averiguação de danos ao DNA, mensurados por meio do Ensaio Cometa, e da atividade da enzima glutathione S-Transferase (GST), em brânquias e glândulas digestivas de mexilhões *Perna perna* transplantados em quatro pontos amostrais na região estuarina da Baía de Vitória (ES). Todos os pontos avaliados apresentaram aumento significativo nos biomarcadores analisados. A presença de Cd, Ni, Pb e As na água foram superiores ao limite permitido pela agência reguladora nacional, e este pode ter sido um dos fatores responsáveis pelos resultados encontrados. Os elementos Fe e As foram os que se apresentaram em maiores concentrações nos tecidos dos organismos expostos. Análises de correlação indicaram o Cu e o Ni na água como os possíveis contribuidores para o alto índice de danos ao DNA encontrados. Tal análise estatística também indicou a presença de Fe na água como principal responsável pelo aumento da atividade da enzima GST nas brânquias e a presença de Mn na água e do acúmulo de As e de Cd no tecido pelo resultado na atividade desta enzima na glândula digestiva. Desta forma ficou evidente que a aplicação do método de transplantação de organismos bivalves se mostrou satisfatório para investigação ambiental mostrando a importância do uso de diferentes avaliações para identificar e caracterizar impactos ambientais costeiros.

Palavras-Chave: Transplante de organismos bivalves, Ensaio Cometa, GST, Bioacumulação e Danos no DNA.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the applicability of the transplantation approach of bivalve organisms for 60 days in an antropically impacted coastal marine environment with high water supply, industrial and domestic sewage, and strong port traffic. For this, quantification analyzes of metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni and Pb) and of a semi-metal (As) were performed, DNA damage as measured by the Cometa Assay, and the activity Of the glutathione S-transferase enzyme (GST), in gills and digestive glands of *Perna perna* mussels transplanted at four sampling points in the estuarine region of Vitória Bay (ES). All the evaluated points showed a significant increase in the analyzed biomarkers. The presence of Cd, Ni, Pb and As in the water were higher than the limit allowed by the national regulatory agency, and this may have been one of the factors responsible for the results found. The Fe and As elements were the ones that presented in higher concentrations in the tissues of the exposed organisms. Correlation analyzes indicated Cu and Ni in water as the possible contributors to the high DNA damage index found. Such statistical analysis also indicated the presence of Fe in the water as the main responsible for the increase of the activity of the GST enzyme in the gills and the presence of Mn in the water and the accumulation of As and Cd in the tissue by the result in the activity of this enzyme in the digestive gland. Thus, it was evident that the application of the bivalve organisms transplantation method proved to be satisfactory for environmental research showing the importance of using different assessments to identify and characterize coastal environmental impacts.

Keywords: Transplantation of bivalve organisms, Comet Assay, GST, Bioaccumulation and Damage to DNA.

1 INTRODUÇÃO

A zona costeira apresenta grande importância do ponto de vista ambiental, pois é o espaço geográfico de interação entre os ecossistemas terrestres e marinhos que abriga uma grande variedade de plantas e animais (Castro et al., 1999). Mas infelizmente tal região é, muitas vezes, o principal destino da poluição antrópica, oriunda de cidades costeiras, aterros industriais e carreamento fluvial, o que têm atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores ambientais (Shulkin et al., 2003). Durante as últimas duas décadas uma quantidade substancial de pesquisas sobre avaliação da poluição química ambiental tem se concentrado no desenvolvimento e aplicação de biomarcadores em programas de biomonitoramento (Lehtonen et al., 2016).

Uma dessas zonas costeiras do litoral brasileiro que sofre com a pressão antrópica é a Baía de Vitória a qual está inserida na região metropolitana de Vitória, capital do estado do Espírito Santo. Além disso, banha os municípios de Vitória, Cariacica e Vila Velha. A Baía de Vitória possui aproximadamente 93.381 Km², é caracterizada por uma alta densidade demográfica, oriunda de ocupação desordenada associada ao desenvolvimento industrial, e é um local conhecidamente afetado por contaminação antropogênica, tendo seus níveis de poluição associados ao tráfego marítimo, escoamento fluvial e principalmente aos despejos de esgotos sanitários municipais sem prévio tratamento (HABTEC, 1997).

Os complexos portuários, como os situados na Baía de Vitória, são estruturas ambientalmente impactantes, geradoras de altos níveis de poluição (Ausili et al., 1998), pois representam fontes diretas e indiretas de macronutrientes, oligoelementos, compostos alifáticos, hidrocarbonetos aromáticos, e xenobióticos diversos (Kralik et al., 2007; Renzi et al., 2009). Mesmo que parte destes compostos descarregados possa ser diluída e dispersa por trocas de água entre a região portuária e o ambiente marítimo, uma grande parte deles tende a ser adsorvida e acumulada em partículas sólidas de matéria orgânica, que estão presentes na coluna de água (Sternbeck e Östlund, 2001) ou ainda depositam-se no sedimento.

Os efluentes municipais também são conhecidos contribuintes da poluição ambiental liberando no ambiente elementos potencialmente nocivos, tais como metais, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e produtos

farmacêuticos (Jeffries et al., 2010; Sim et al., 2011). O aumento dos níveis de metais nos recursos hídricos causados por resíduos industriais e domésticos se tornou um dos principais indicadores de contaminação química (Barbosa et al., 2010).

A contaminação por metais representa uma ameaça significativa para a sustentabilidade biológica de vias costeiras navegáveis ao redor do mundo (Li et al., 2000). Uma vez que, compostos metálicos apresentam alta toxicidade e capacidade de se acumular na biota (Islam e Tanaka, 2004). Tal contaminação por compostos persistentes levou a busca por métodos eficazes de monitoramento, tanto no nível geoquímico como biológico (Thompson et al., 2012). Portanto, a determinação das concentrações de metais em organismos deve fazer parte de qualquer avaliação e monitoramento de programas nas zonas costeiras (Usero et al., 2005).

Sendo assim, para monitorar e avaliar o grau de poluição ambiental, a abordagem de transplante de organismos tem sido considerada um dos métodos mais relevantes para estudar o acúmulo de produtos químicos e seus efeitos biológicos nos organismos marinhos (Andral et al., 2004; Brooks et al., 2011; Lekube et al., 2014; Marigómez et al., 2013; Tsangaris et al., 2011; Turja, 2015). Diversas vantagens podem ser apontadas na utilização deste método, como melhor representatividade do grau de toxicidade do ambiente monitorado, além de possibilitar que as observações sejam realizadas sem as incertezas relacionadas ao potencial fisiológico de adaptação genética das populações que habitam locais cronicamente poluídos ou o problema prático comum da falta de organismos indicadores adequados nas áreas de investigação (Lehtonen et al., 2016). No entanto, a transplantação de organismos também apresenta dificuldades logísticas na execução desse processo, como perda e roubo de estruturas de cultivo, eventos climáticos que impossibilitam campanhas de campo, predação, entre outros.

Os moluscos bivalves têm sido amplamente utilizados nesses programas de biomonitoramento como sentinelas e como bioindicadores de poluição, uma vez que possuem um grande número de características úteis para este fim (Goldberg et al., 2009; Lehtonen et al., 2016). Sendo a principal delas sua eficiência bioacumulativa ao filtrar grandes quantidades de água, acumulando assim vários tipos de contaminantes (Chase et al., 2001; Gillikin et al., 2005;

Tanabe et al., 2000). Esta capacidade de bioacumular contaminantes de forma rápida vem aliada à habilidade de depurá-los lentamente, contribuindo com o processo de análise (Brown e McPherson, 1992; Hardiman e Pearson, 1995; Scanes e Roach, 1999; Scanes, 1997). Além disso, são notavelmente tolerantes à poluição química e ao mesmo tempo expressam respostas biológicas sensíveis e mensuráveis, quando expostos às condições de estresse (Lehtonen et al., 2016).

Neste contexto de usar organismos testes em programas de biomonitoramento faz-se necessário determinar o grau de impacto do local avaliado na saúde da biota, além de tentar identificar os estressores ou poluentes responsáveis por estes efeitos. Um grupo apropriado de respostas biológicas (marcadores biológicos ou biomarcadores) pode ser útil nessa avaliação (Fuentes-Rios et al., 2005). Dentre elas, as respostas genotóxicas, normalmente, são manifestadas relativamente em pouco tempo após a exposição ao local contaminado ou ao contaminante específico. Consequências biológicas significativas podem ocorrer nas células, nos órgãos, no animal inteiro e, finalmente, em níveis de comunidade e de população (Jha, 2008). Atualmente, para avaliação de genotoxicidade, o ensaio do cometa está bem definido e tem demonstrado ser uma ferramenta valiosa por ser simples, versátil, de execução rápida, visual e altamente sensível para detectar lesões do DNA (Dhawan et al., 2009), e pode ser aplicado a diversos organismos, em diferentes tecidos e células, com o objetivo de avaliar o potencial genotóxico de substâncias e/ou condições ambientais (Dhawan et al., 2009; Díaz et al., 2009; Kammann et al., 2004, 2001; Poli et al., 1999; Prá et al., 2005; Sriussadaporn et al., 2003)

Em resposta à exposição a metais, certos biomarcadores são úteis no indicativo de estresse oxidativo, o qual ocorre quando os mecanismos de defesa celular são incapazes de agir sobre os radicais livres ou sobre os seus efeitos deletérios (Kumari et al., 1998). Para minimizar o dano oxidativo aos componentes celulares, todos os organismos desenvolveram uma série de defesas antioxidantes, como por exemplo, a ativação das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST) (Ketterer et al., 1983). Esta última é um importante mecanismo de detoxificação intracelular (Papadopoulos et al., 2004), ao utilizar esses compostos como seus

substratos específicos (Atli e Canli, 2007). A CAT é um componente de defesa antioxidante primário, a qual promove de forma eficiente, a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxido molecular (Valko et al., 2006). Enquanto que a SOD possui afinidade por radicais ânions superóxido e são capazes de convertê-los inicialmente a peróxido de hidrogênio e, depois, em água (Valko et al., 2006). A GST, por sua vez, pertence a uma família multifuncional de proteínas envolvidas no processo de detoxificação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos ao catalisar a conjugação da glutathiona reduzida (GSH) com compostos endógenos ou exógenos de poluentes, a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e excretados (Carletti et al., 2008; Huber e Almeida, 2008). Além desses biomarcadores genotóxicos e bioquímicos, a quantificação da bioacumulação dos metais nos diversos tecidos também é um excelente indicativo de contaminação e justificativa para alterações fisiológicas e bioquímicas encontradas nos organismos.

Desta forma, as inclusões de indicadores biológicos e de biomarcadores em estudos de monitoramento ambiental são de grande importância para averiguar de forma mais precisa a saúde da biota e do ambiente, além de compreender e desvendar os mecanismos de ação de contaminantes ambientais. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade da abordagem de transplantação de organismos bivalves em um ambiente marinho costeiro antropicamente impactado, estabelecendo a relação da bioacumulação corporal de metais com biomarcadores de exposição: genotóxico e bioquímico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenho amostral

Em outubro de 2015, mexilhões oriundos de um cultivo localizado no Município de Anchieta (ambiente referência) (cerca de 86 km ao sul de Vitória (ES)) foram transplantados para estruturas de cultivo (sacos de germinação) localizadas em quatro pontos no interior da Baía de Vitória/ES (Figura 1), onde permaneceram submersas por 60 dias para promover a exposição dos animais. Buscando-se garantir o número de organismos suficientes para realização das

análises, foram disponibilizados três sacos de germinação (Figura 2) por ponto de biomonitoramento, totalizando 12 mexilhoneiras fixadas em poitas de cimento e distribuídas ao longo da Baía de Vitória (ES).

Para se registrar as condições iniciais dos animais implantados nos pontos de biomonitoramento da Baía de Vitória, um lote de organismos desse cultivo da cidade litorânea de Anchieta (ES) foi destinado para realização de análises preliminares, antes da exposição, para compor o grupo controle deste estudo.

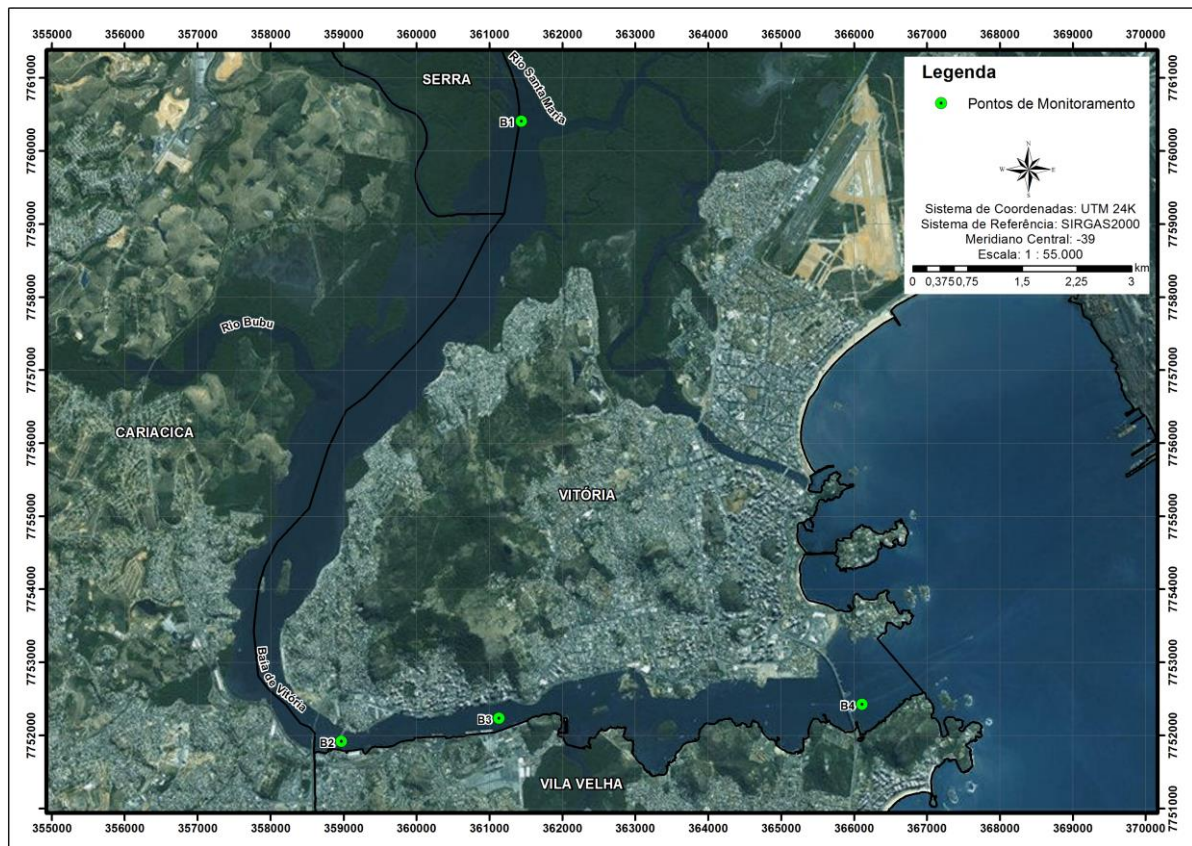


Figura 1. Pontos de biomonitoramento na Baía de Vitória – ES onde foram instaladas estruturas de cultivo de mexilhões *Perna perna*.



Figura 2. Estruturas de cultivo de mexilhões *Perna perna* instaladas nos quatro pontos (B1, B2, B3 e B4) de biomonitoramento na Baía de Vitória - ES.

2.2 Vistorias das estruturas de cultivo

Com o intuito de garantir a exposição dos animais e preservar a integridade das estruturas de cultivo, vistorias foram realizadas, em intervalos de 20 dias, onde as estruturas foram reforçadas e também foram realizadas a limpeza de organismos incrustantes (epifauna), que por ventura se assentaram nas carapaças e nas redes das mexilhoneiras. Devido à grande vazão e ataque de predadores em alguns pontos, algumas estruturas foram perdidas, mas como já se previa este problema, um número a mais de estruturas foi colocada, esta perda não prejudicou o resultado do trabalho.

2.3 Coleta e definição de parâmetros

2.3.1 Coleta de água

Nos momentos da instalação, das vistorias e das coletas foram analisados os parâmetros físico-químicos *in situ*, com o auxílio de uma sonda multiparametro Horiba U10, a qual mediu: temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, condutividade, turbidez e potencial hidrogeniônico (pH). Nos momentos da instalação e das coletas também foram coletadas amostras de água superficial com auxílio de uma garrafa de Van Dorn, para quantificação em laboratório de elementos metálicos e arsênio. A metodologia de preparo de

vidrarias para a coleta e armazenamento da água seguiu rigorosamente os métodos descritos em APHA (1998).

Após as coletas, as amostras de água seguiram para o Laboratório de Ictiologia Aplicada - LABPEIXE – no complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV onde foram armazenadas em refrigerador (4 °C) até o momento da utilização nas análises de quantificação de metais.

2.3.2 Quantificação de metais e de arsênio na água

No laboratório, as amostras de água coletadas foram utilizadas na análise de quantificação de: Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Chumbo (Pb) e de Arsênio (As). Para tanto, as amostras foram acidificadas (ácido nítrico), filtradas utilizando filtro de seringa (poro 0,45 mm de poro) e armazenadas (13 ml) em tubos falcon (ppt). Posteriormente, os elementos investigados foram determinados por espectrometria de absorção atômica (FAAS; ICE 3000 Series, Thermo Scientific) em forno de grafite (GFAAS), com o uso de lâmpadas específicas, amostrador automático e soluções padrão (SpecSol®).

2.3.3 Coleta e análise de mexilhões

No mês de dezembro de 2015, após os 60 dias de exposição, todos os sacos de germinação restantes foram coletados dos quatro pontos de biomonitoramento e encaminhados ao Laboratório de Ictiologia Aplicada - LABPEIXE – no complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV para dar andamento às análises.

Imediatamente após a chegada ao Laboratório, oito mexilhões de cada ponto foram dessensibilizados em água gelada para posterior extração de hemolinfa do músculo adutor posterior com ajuda de uma seringa com agulha hipodérmica, segundo metodologia descrita por Lowe et al., (1995), para realização da análise genotóxica (Ensaio Cometa). Após a dessensibilização com água fria, cinco indivíduos de cada ponto tiveram sua concha aberta e seu tecido mole removido, para quantificação de metais. E outros oito indivíduos de cada ponto também tiveram suas conchas abertas e suas brânquias e

glândulas digestivas dissecadas. Tais tecidos foram congelados em ultra freezer -80 °C para posterior quantificação proteica e enzimática.

2.3.4 Bioacumulação de metais

Após a remoção do tecido mole dos animais, o material coletado foi macerado e digerido utilizando ácido nítrico, seguido de filtração, avolumação (10 ml) e transferência para tubos falcon (ppt) até o momento da leitura. A leitura dos elementos investigados (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e As) foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (FAAS; ICE 3000 Series, Thermo Scientific) em forno de grafite (GFAAS), com o uso de lâmpadas específicas, amostrador automático e soluções padrão (SpecSol®).

Para comparar o teor total de metais e do As nos diferentes locais de amostragem e o grupo controle, foi utilizado o índice de poluição por metais (IPM), obtido com a equação (Usero et al., 2005):

$$ICM = (Cf_1 \times Cf_2 \dots Cf_n)^{1/n}$$

Onde:

Cf_n = concentração do n de metal na amostra.

2.3.5 Ensaio Cometa

A análise de fragmentos de DNA foi realizada utilizando ensaio cometa alcalino e coloração com nitrato de prata modificado de Tice et al. (2000) e Andrade et al., (2004). O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para isso lâminas de microscopia, duas para cada exemplar, foram previamente cobertas com agarose 1,5 % (1,80 g de agarose e 120 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4). O primeiro passo foi centrifugar as amostras de hemolinfa coletadas (400 g por 2,5 min.) para promover a concentração de células no precipitado. Alíquotas destes precipitados foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente, 20 µl da hemolinfa diluída foram misturadas com 100 µl de agarose low melting (0,15 g de agarose em 20 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 40 °C. Em seguida foram colocadas sobre as lâminas com pré-cobertura e recobertas com lamínulas para que o gel se espalhe uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, os slides foram colocados na solução de lise (146,1 g NaCl (2,5 M), 37,2 g EDTA (100 mM), 1,2 g de Tris (10 mM), 1 litro de água destilada e o pH

da solução foi ajustado para 13 com NaOH e no momento do uso foram adicionados 1 % de Triton X-100 e 10 % DMSO) por no mínimo 2 h, em geladeira e protegidos da luz. Depois da lise as lâminas foram colocadas em cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300 mM NaOH e 1 mM EDTA em pH>13) por 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25 V e 300 mA por 15 min. Após esta etapa as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (48,5 g de Tris em 1 litro de água destilada) durante 5 min. por três vezes e sendo lavadas com água destilada por duas vezes. As lâminas foram secas por 2 h a 37 °C. Após esse período as lâminas foram fixadas em solução fixadora (15 % de ácido tricloacético, 5 % de sulfato de zinco (heptahidratado), 5 % de glicerol e 1 litro de água destilada) por 10 min. Após esta etapa as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e secas por 2 h a 37 °C. Depois de secas as lâminas foram hidratadas por 5 min. com água destilada e coradas com solução de coloração com prata (66 ml da solução de carbonato de cálcio (12,5 g de carbonato de cálcio para 250 ml de água) e 34 ml da solução de nitrato de prata (50 mg de nitrato de prata, 50 mg de nitrato de amônio, 250 mg de ácido tungstosalicílico e 125 µl de formaldeído) por 15 min. a 37 °C. Depois de coradas as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e foram submersas por 5 min. em solução stop (ácido acético 1%). Passados os 5 min. de reação foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente.

Os danos no DNA foram contabilizados após a avaliação de 100 nucleóides por lâmina, sendo duas para cada animal, selecionadas aleatoriamente e não sobrepostas, as quais foram classificadas de acordo com o dano que apresentaram, ou seja, o tamanho da cauda formado por arraste de DNA fragmentado, em 5 classes: 0 – 20 % (classe 0), 20 – 40 % (classe 1), 40 – 60 % (classe 2), 60 – 80 % (classe 3) e >80 % (classe 4) (Collins et al., 1995). O índice de danos (ID) analisado pelo ensaio cometa foi calculado com a somatória do número de nucleóides observados em cada classe de dano multiplicado pelo valor de sua respectiva classe de danos (0, 1, 2, 3 e 4). Estes valores demonstram os danos apresentados nos tratamentos de acordo com Heuser et al. (2008). Os resultados foram expressos como a média de dano, para cada ponto de biomonitoramento. Durante as análises, as células foram analisadas em teste cego e sempre pelo mesmo observador.

2.3.6 Atividade enzimática da Glutathione S-transferase (GST) e quantificação de proteína

As análises da atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) foram realizadas nas brânquias e na glândula digestiva dos bivalves. Tais tecidos após serem coletados, foram congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posteriormente serem pesados e homogeneizados, individualmente, em três vezes o volume de tampão de homogeneização (Tris.HCl 20 mM, EDTA 1 mM, sacarose 0,5 M, DTT 1 mM, PMSF 0,1 M, pH 7.6). As amostras foram centrifugadas a 15000g em $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, para extração do sobrenadante.

A atividade da GST foi determinada utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM GSH e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância ($\lambda = 340\text{ nm}$) por 2 min. em um leitor de placa (Molecular Device). A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDBN (Habig et al., 1974; Habig e Jakoby, 1981). A atividade da GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 U de produto por miligrama de proteína.

As concentrações de proteína dos extratos dos tecidos analisados (brânquia e glândula digestiva) foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 595 nm, em um espectrofotômetro de leitor de placa (Molecular Device), usando albumina sérica bovina como padrão. Os ensaios foram feitos em duplicata e os resultados foram expressos como a média calculada e o desvio padrão.

2.4 Análises estatísticas

As comparações entre os resultados encontrados nos diferentes pontos de biomonitoramento e o controle foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $p > 0,05$.

Uma análise de correlação foi desenvolvida, com o coeficiente de correlação de Pearson, ao combinar todas as variáveis analisadas na tentativa de explicar as mudanças observadas ao identificar tendências significativas.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico PAST (Paleontological Statistics).

3. RESULTADOS

A média dos parâmetros físico-químicos da água, analisados durante o tempo de exposição dos animais nas quatro estações amostrais da Baía de Vitória, se encontra na tabela 1. Em geral, um gradiente estuarino pode ser observado, onde a salinidade é menor na estação estuarina interior (B1), o que reflete o aporte fluvial de água doce, e maior salinidade na região estuarina exterior (B4), deixando claro a influência da zona marinha. O parâmetro turbidez, ao se apresentar superior nos pontos internos da Baía, pode demonstrar um aporte de partículas sólidas em suspensão oriundas do carreamento fluvial e da ressuspensão gerada pelo fluxo marítimo dentro dos diversos terminais portuários presentes na região.

Tabela 1. Variação de parâmetros físico-químicos da água na Baía de Vitória durante a exposição dos mexilhões (*Perna perna*), nos quatro pontos amostrais.

Pontos amostrais	Temperatura Ambiente [°C]	Temperatura da Água [°C]	pH	Salinidade	OD [mg.L ⁻¹]	Turbidez [UNT]	Condutividade [mS/m]
B1	31,63±1,26	25,75±2,34	6,63±0,26	27,45±2,50	4,97±0,13	23,75±13,15	40,78±0,95
B2	30,53±1,76	24,38±1,69	6,43±0,16	27,84±1,33	5,37±0,24	32,00±20,45	43,88±0,58
B3	30,60±1,69	24,28±1,39	6,61±0,12	29,20±1,58	5,95±0,62	20,25±14,06	44,55±2,38
B4	30,38±1,38	24,15±1,85	6,64±0,21	30,43±1,19	6,04±0,48	14,50±5,45	45,98±2,14

A média dos resultados da quantificação de metais e de As nas amostras de água, coletadas nas quatro estações amostrais, no início e no final da exposição dos animais, estão apresentadas na Tabela 2. Valores em negrito representam concentrações acima dos padrões de qualidade para água salobra de classe I - Resolução CONAMA n. 357/05 (CONAMA, 2005). É possível observar nessa tabela que todas as estações apresentaram o parâmetros Cd, Cu, Fe, Ni, Pb e As em desconformidade com a legislação, enquanto que os parâmetros Cr e Mn não apresentaram valores em desconformidade em nenhuma estação. Apenas o As apresentou diferença significativa de concentração entre os pontos amostrais.

Tabela 2. Concentrações de metais e de arsênio (As) dissolvidos na água dos quatro pontos amostrais da Baía de Vitória (ES), durante a exposição dos mexilhões (*Perna perna*). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes (a-c) indicam diferenças significativas (Mann-Whitney, $p < 0,05$) no parâmetro Arsênio (As) entre estações amostrais.

	Cd (mg.L ⁻¹)	Cr (mg.L ⁻¹)	Cu (mg.L ⁻¹)	Fe (mg.L ⁻¹)	Mn (mg.L ⁻¹)	Ni (mg.L ⁻¹)	Pb (mg.L ⁻¹)	As (mg.L ⁻¹)
B1	0,063 \pm 0,011	0,029 \pm 0,011	0,332 \pm 0,873	0,558 \pm 0,455	0,055 \pm 0,020	0,244 \pm 0,072	0,495 \pm 0,206	0,022 \pm 0,003 ^{ab}
B2	0,053 \pm 0,014	0,031 \pm 0,015	0,156 \pm 0,052	0,549 \pm 0,538	0,059 \pm 0,012	0,213 \pm 0,091	0,418 \pm 0,150	0,020 \pm 0,004 ^a
B3	0,065 \pm 0,013	0,020 \pm 0,009	0,239 \pm 0,229	1,156 \pm 0,685	0,053 \pm 0,025	0,161 \pm 0,096	0,366 \pm 0,130	0,028 \pm 0,003 ^c
B4	0,066 \pm 0,013	0,030 \pm 0,020	0,139 \pm 0,064	1,219 \pm 0,616	0,078 \pm 0,024	0,200 \pm 0,106	0,460 \pm 0,166	0,025 \pm 0,003 ^{bc}

Valores máximos em mg.L⁻¹ total^(*) ou dissolvido^(**) permitido pela legislação brasileira resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA): Cd* 0,005; Cr* 0,05; Cu** 0,005; Fe** 0,3; Mn* 0,1; Ni 0,025; Pb* 0,01 e As* 0,01.

Enquanto isso, as concentrações da maioria dos metais nos tecidos dos bivalves variaram notavelmente, dependendo da localização da estação de amostragem (Tabela 3). O Fe seguido do As mostram-se ser os elementos, dentre os investigados, os mais abundantes no tecido mole de mexilhões distribuídos pelos quatro pontos amostrais da área estudada.

Tabela 3. Quantificação de metais e de arsênio no tecido mole de mexilhões (*Perna perna*), exposto por 60 dias em 4 pontos amostrais (B1-B4) da Baía de Vitória.

	Cd (μ g.Kg ⁻¹)	Cr (mg.Kg ⁻¹)	Cu (mg.Kg ⁻¹)	Fe (mg.Kg ⁻¹)	Mn (mg.Kg ⁻¹)	Ni (mg.Kg ⁻¹)	Pb (mg.Kg ⁻¹)	As (mg.Kg ⁻¹)
Cont	0,436 \pm 0,24 ^a	0,361 \pm 0,23 ^a	0,016 \pm 0,01 ^a	0,50 \pm 0,24 ^a	0,364 \pm 0,21 ^a	0,237 \pm 0,12 ^{ab}	0,014 \pm 0,01	0,302 \pm 0,17 ^{abc}
B1	2,614 \pm 0,78 ^b	0,382 \pm 0,09 ^a	0,043 \pm 0,01 ^b	4,86 \pm 1,90 ^b	0,818 \pm 0,44 ^{abc}	0,231 \pm 0,05 ^a	0,012 \pm 0,01	0,343 \pm 0,07 ^{ab}
B2	3,260 \pm 1,15 ^b	0,723 \pm 0,09 ^b	0,024 \pm 0,01 ^a	7,95 \pm 3,17 ^b	1,634 \pm 0,36 ^b	0,729 \pm 0,43 ^c	0,017 \pm 0,01	0,778 \pm 0,19 ^d
B3	2,526 \pm 1,27 ^b	0,291 \pm 0,08 ^a	0,036 \pm 0,01 ^b	3,99 \pm 1,73 ^b	0,971 \pm 0,37 ^c	0,301 \pm 0,25 ^{ab} _c	0,011 \pm 0,01	0,477 \pm 0,15 ^{bc}
B4	4,414 \pm 2,01 ^b	0,304 \pm 0,03 ^a	0,040 \pm 0,01 ^b	5,01 \pm 1,05 ^b	0,604 \pm 0,20 ^{bc}	0,425 \pm 0,18 ^{bc}	0,012 \pm 0,01	0,595 \pm 0,14 ^{cd}

Em resumo, dando um panorama geral da situação ambiental dos pontos de amostragem por meio da bioacumulação dos organismos bioindicadores, o IPM (Índice de Poluição por Metais) das amostras colhidas na Baía de Vitória apresenta-se maior no ponto B2 em relação aos outros pontos de amostragem. E o IPM de todas as estações apresenta-se significativamente maior do que o mensurado no controle (Figura 3).

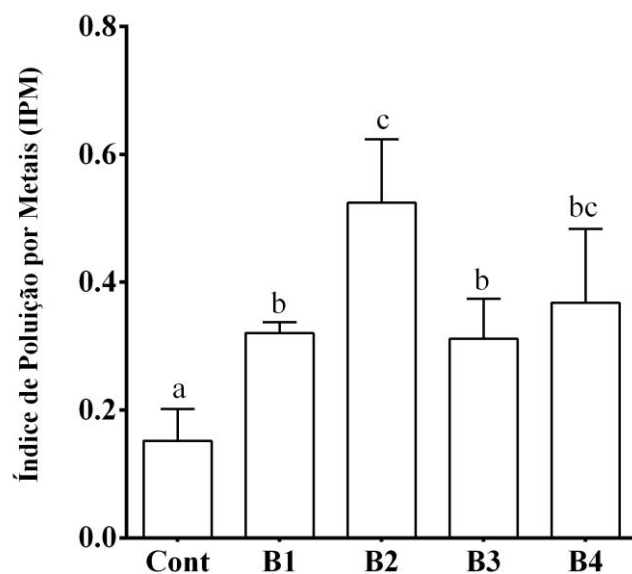


Figura 3. Índice de Poluição por Metais (IPM), nos mexilhões *Perna perna*, nos pontos de biomonitoramento da Baía de Vitória e amostras controle. $p > 0,05$.

A caracterização da genotoxicidade das águas nos pontos amostrais (B1-B4) realizada por meio do Índice de Danos no DNA (ID), observada pelo Ensaio Cometa, nos exemplares de *P. perna* encontra-se na Figura 4. Nela é possível observar que todos os pontos monitorados apresentaram significativas quebras no material genético de células da hemolinfa dos bivalves expostos, em relação ao controle. Os pontos amostrais (B1-B4) não apresentaram diferença significativa entre si nas respostas deste biomarcador.

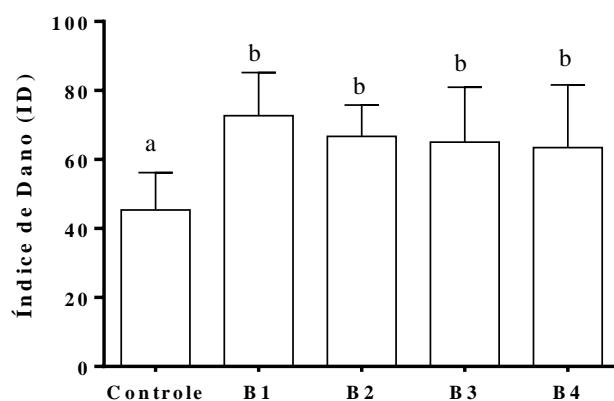


Figura 4. Índice de Danos no DNA em hemócitos de mexilhão *Perna perna*, depois de 60 dias de exposição em quatro pontos da Baía de Vitória (ES) e do grupo controle (antes da exposição). $p > 0,05$.

A avaliação da atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST) revelou um aumento significativo nos dois tecidos avaliados (brânquias e glândula digestiva) em relação ao grupo controle (Figura 5). Diferenças na atividade da enzima pode ser observada entre os diferentes pontos amostrais, para os dois tecidos estudados, sendo o ponto amostral B1 o que apresentou menor atividade da enzima em relação aos demais pontos. Observa-se também que a atividade da GST nas brânquias foi duas vezes maior do que na glândula digestiva.

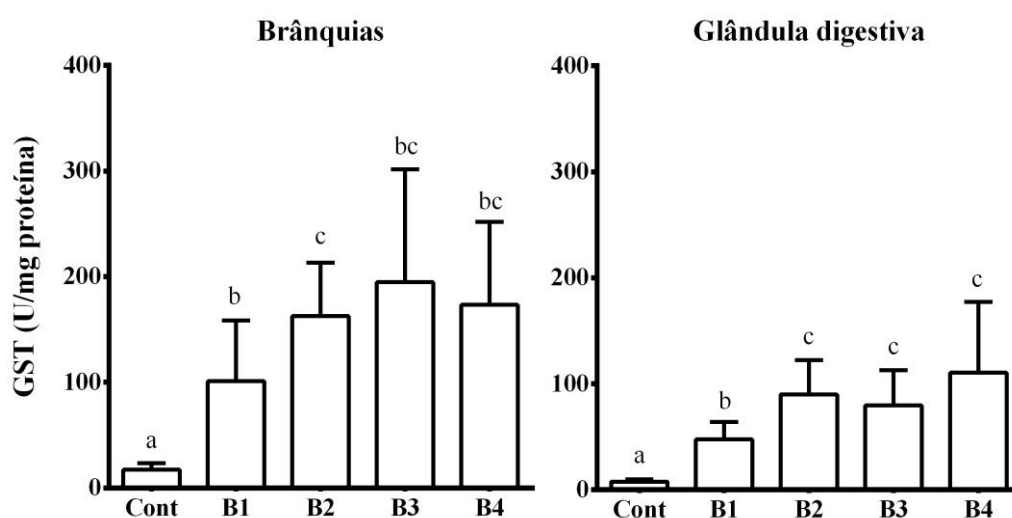


Figura 5. Atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST) em brânquias e glândula digestiva de mexilhões *Perna perna*, depois de 60 dias de exposição, em quatro pontos da Baía de Vitória (ES) e do grupo controle (antes da exposição). $p > 0,05$.

A análise de correlação identificou tendências significativas entre as variáveis estudadas (Tabela 4). Respostas biológicas com coeficientes altos mais próximos de 1 revelaram interações importantes entre os parâmetros. Os danos no DNA avaliados no Ensaio Cometa se mostraram positivamente relacionados à presença de Cu e Ni na água. Já a atividade da enzima GST nas brânquias dos bivalves se mostrou positivamente relacionada com a presença de Fe na água. Enquanto isso, a atividade desta enzima na glândula digestiva se mostrou relacionada com a presença de Mn na água e também com a presença de As e Cd no tecido do animal.

Coeficientes próximos de zero ou negativos entre os elementos presentes na água e os quantificados nos tecidos, como os que foram

encontrados entre As, Cd, Fe, Mn, Ni e Pb, podem indicar concentrações na água abaixo do limiar do qual esses organismos são capazes de regular a acumulação em seus corpos ou a concentração quantificada na água reflete a forma não disponível para incorporação biológica.

Tabela 4. Correlações das variáveis físicas e biológicas mensuradas nos pontos de biomonitoramento da Baía de Vitória (todos os pontos combinados). Coeficiente de correlação de Pearson.

	B-As	B-Cd	B-Cr	B-Cu	B-Fe	B-Mn	B-Ni	B-Pb	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	As	Cometa	GST-Br
B-As																		
B-Cd	0,50																	
B-Cr	0,72	-0,03																
B-Cu	-0,87	0,00	-0,86															
B-Fe	0,82	0,21	0,97	-0,83														
B-Mn	0,68	-0,27	0,92	-0,94	0,83													
B-Ni	0,97	0,37	0,86	-0,91	0,93	0,79												
B-Pb	0,75	0,10	0,99	-0,82	0,99	0,86	0,89											
Cd	-0,71	0,09	-1,00	0,88	-0,95	-0,95	-0,85	-0,97										
Cr	0,37	0,54	0,52	-0,13	0,65	0,15	0,47	0,63	-0,46									
Cu	-0,87	-0,78	-0,31	0,55	-0,48	-0,25	-0,74	-0,38	0,28	-0,26								
Fe	-0,07	0,41	-0,73	0,33	-0,63	-0,60	-0,30	-0,70	0,73	-0,53	-0,38							
Mn	0,35	0,99	-0,19	0,17	0,05	-0,43	0,21	-0,06	0,26	0,47	-0,69	0,50						
Ni	-0,18	0,01	0,34	0,18	0,35	0,03	0,01	0,40	-0,30	0,79	0,38	-0,77	-0,01					
Pb	-0,33	0,28	-0,05	0,52	0,04	-0,40	-0,23	0,05	0,11	0,75	0,30	-0,40	0,32	0,89				
As	-0,46	-0,09	-0,87	0,51	-0,88	-0,63	-0,64	-0,90	0,84	-0,83	0,10	0,86	0,04	-0,75	-0,45			
Cometa	-0,37	-0,45	0,34	0,14	0,24	0,17	-0,14	0,33	-0,33	0,47	0,69	-0,89	-0,46	0,89	0,66	-0,65		
GST-Br	0,49	0,26	-0,12	-0,39	-0,07	0,12	0,30	-0,14	0,09	-0,54	-0,68	0,72	0,23	-0,94	-0,84	0,54	-0,95	
GST-GD	0,72	0,83	0,05	-0,34	0,23	0,01	0,54	0,12	-0,02	0,13	-0,96	0,60	0,78	-0,49	-0,31	0,14	-0,81	0,74

B-As: Bioacumulação de Arsênio; B-Cd: Bioacumulação de Cádmio; B-Cr: Bioacumulação de Cromo; B-Cu: Bioacumulação de Cobre; B-Fe: Bioacumulação de Ferro; B-Mn: Bioacumulação de Manganês; B-Ni: Bioacumulação de Níquel; B-Pb: Bioacumulação de Chumbo; Cometa: Índice de Dano calculado no Ensaio Cometa; GST-Br: Atividade da GST na brânquia; GST-GD: Atividade da GST na glândula digestiva.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, a exposição de mexilhões nas quatro estações amostrais da Baía de Vitória, por 60 dias, gerou um aumento significativo em todos os biomarcadores analisados. A presença de metais nas amostras de água superiores aos limites permitidos pelas agências reguladoras ambientais é um forte indicador de atividades antrópicas (Mendiguchía et al., 2007; Micó et al., 2006; Owens e Niemeyer, 2006) e pode ter sido um dos fatores responsáveis pelos resultados encontrados. Tais dados obtidos mostraram níveis excessivos de Cd, Cu, Fe, Ni, Pb e As em todas as amostras de água dos quatro pontos monitorados. E devido à estabilidade e persistência dos metais, a presença destes contaminantes na água constitui uma ameaça grave para a saúde dos organismos expostos (Barbosa et al., 2010).

O elemento Fe mostrou-se o elemento mais abundante tanto na água como no tecido dos animais avaliados. Kulicova et al. (1985), depois de analisar 11 metais em 3 espécies de bivalves, também descobriu o Fe como o elemento de concentração mais elevada. Usero et al. (1997) ao estudarem duas espécies de bivalves também encontraram o Fe como elemento mais abundante e o Cd com uma das concentrações médias mais baixas, assim como em nosso estudo. Tais informações se mostram coerentes, uma vez que, moluscos marinhos são uma rica fonte de proteína animal, abundante do ponto de vista de elementos essenciais, tais como Fe e Zn (Stankovic e Jovic, 2012).

Já elementos não essenciais, tais como Cd, Pb e As, por não serem biodegradáveis, podem se tornar prejudiciais ao acumularem-se nos organismos vivos, principalmente devido à sua analogia com elementos essenciais (Belivermis et al., 2016; Stankovic e Jovic, 2012). Em alguns casos, tais elementos, podem ser assimilados pelos tecidos ocupando áreas intercelulares até, finalmente, constituir componentes celulares. (Belivermis et al., 2016). Dentre estes componentes não essenciais, o As se apresentou o mais abundante nos tecidos avaliados corroborando com os estudos de Andral et al. (2011) e Belivermis et al. (2016), que também quantificaram o As em *Mytilus galloprovincialis* presentes em áreas costeiras do mediterrâneo. Embora, de um

modo geral, 80 % do As presente nos tecidos dos organismos marinhos se apresenta na forma de arsenobetaina (AsB), o que não é considerado um produto químico prejudicial para os organismos vivos (Barra et al., 2000; Belivermis et al., 2016). Zhang et al., (2015), demonstraram que ostras marinhas (*Saccostrea cucullata*) possuem alta capacidade de acumular, biotransformar, e desintoxicar o arsênico inorgânico ao transformarem a forma inorgânica em orgânica.

De qualquer forma, os resultados encontrados na análise do IPM (Índice de Poluição por Metais) indicam o ponto B2 como o mais disponibilizador de elementos metálicos e de As para acumulação dos organismos avaliados. Tal resultado, possivelmente, é influenciado pelo conjunto de tributários de médio porte (rio Santa Maria da Vitória) e de pequeno porte (rios Bubú, Marinho e Aribiri) existentes na região que carregam efluentes industriais, gerados pelas diversas empresas atuantes nos municípios de Vitória e Vila Velha, e o grande aporte de esgoto doméstico (maioria “in natura”) (Joyeux et al., 2004). A proximidade dos pontos amostrados com a região portuária conhecida pelo lançamento de águas de lastro, também pode ter influenciado na bioacumulação de metais, bem como a redistribuição de contaminantes presentes nas camadas de sedimentos depositadas no fundo do canal de acesso aos berços e da área de evolução, prejudicando a qualidade da água (Kitzmann e Asmus, 2006). Lembrando ainda que, as entradas de água doce e de partículas de sedimentos em suspensão do fundo pode enriquecer a água com concentrações de As de fonte litogênica, em vez de antropogênica, dada a formação geológica da região (Belivermis et al., 2016).

Os resultados do Ensaio Cometa ao detectarem maiores quebras da fita de DNA de hemócitos de *P. perna*, em todos os pontos amostrais em relação ao controle mostraram por meio da análise de correlação, que a presença de Cu e Ni na água dos pontos amostrais colaborou neste resultado. Rank et al. (2005), encontraram correlações positivas dos danos ao DNA de células da hemolinfa em mexilhões (*Mytilus edulis*) com os níveis de Ni e Cr nos sedimentos de áreas costeiras submetidas a resíduos urbanos e industriais. E em um estudo

realizado por Rank (2009), um aumento significativo nas quebras de DNA foi observado em células das brânquias de *M. edulis* de uma região portuária altamente contaminada, com níveis de metais extremamente elevados, em relação a uma região referência. Tais exemplos, mostram que a aplicação da avaliação de danos causados ao DNA em diferentes organismos e tecidos responde à diferentes elementos presentes no ambiente, e tal ferramenta pode ser amplamente utilizada, pois é sensível e confiável para detectar genotoxicidade em ambientes aquáticos em programas de biomonitoramento ambiental (Andrade et al., 2004; Frenzilli et al., 2009), indicando riscos causados por mistura complexas de poluentes nos diferentes compartimentos (Kim e Hyun, 2006). Vale ressaltar que danos no DNA em animais aquáticos pode estar associado a um crescimento reduzido, desenvolvimento anormal e diminuição da sobrevivência dos embriões e adultos (Lee e Steinert, 2003), conduzindo assim a uma redução no tamanho da população e mesmo a extinção da espécie (Bickham et al., 2000; Theodorakis, 2001).

Com relação à análise enzimática, nosso trabalho possivelmente refletiu a poluição local ao encontrar um aumento significativo da atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) nos dois tecidos avaliados (brânquias e glândula digestiva) em relação ao grupo controle, já que, diversos trabalhos apontam maior atividade da GST em organismos provenientes de locais poluídos quando comparados com aqueles a partir de locais de referência (Bainy et al., 2000; Burgeot et al., 1996; Lau e Wong, 2003; Manduzio et al., 2004). Assim como em nosso trabalho, Sáenz et al. (2010) relatou a atividade de GST nas brânquias superior ao encontrado na glândula digestiva. Desta forma fica claro que os compostos presentes na água podem influenciar a atividade desta enzima de um modo específico em cada órgão. Além disso, uma correlação positiva entre a carga contaminante no tecido e a atividade de GST, também foram descritas em mexilhões *Perna viridis* e *M. edulis* (Cheung et al., 2002, 2001; Gowland et al., 2002), e é possível observar que os resultados da atividade da GST na glândula digestiva seguiu a mesma tendência apresentada pelos dados do IPM.

Contudo, fica evidente que apesar da área estudada sofrer diferentes pressões ambientais, principalmente por conta do lançamento de efluentes urbanos e industriais de natureza complexa, e desta forma os resultados encontrados não poderem ser exclusivamente atribuídos aos elementos investigados, é possível constatar seguramente a influência dos elementos estudados na qualidade ambiental local.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo revelou contaminação química nas águas da Baía de Vitória, causada pela presença de metais e de arsênio e, possivelmente, por outros contaminantes não mensurados neste trabalho. A aplicação do método de transplantação de organismos bivalves se mostrou satisfatório para investigação ambiental em todos os pontos amostrais por vários motivos: (1) propiciou acúmulo de elementos presentes no sistema, revelando maior concentração em seus tecidos; (2) permitiu detectar a sensibilidade aos efeitos genotóxicos, detectado com o aumento no nível de quebras na fita de DNA em hemócitos de bivalves; (3) possibilitou a conjugação de xenobióticos, indicada pela elevada atividade da enzima GST. Analisados em conjunto, estes resultados mostram a importância do uso de diferentes avaliações para identificar e caracterizar impactos ambientais costeiros.

6. REFERÊNCIAS

- Ablanedo, N., González, H., Ramirez, M., Torres, I., 1990. Evaluación del erizo de mar *Echinometra lucunter* como indicador de la contaminación por metales pesados. *Aquat. Living Resour.* 3, 113–120. doi:10.1051/alr
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2006. *Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata - Echinoidea) - ABNT NBR 15350.*
- ABNT NBR - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2012. *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata; Echinoidea);*
- ABNT NBR 15469 - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2015. *Ecotoxicologia - Coleta, preservação e preparo de amostras.*
- Ahtiainen, J., Nakari, T., Silvonen, J., 1996. Toxicity of TCF and ECF pulp bleaching effluents assessed by biological toxicity tests., in: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents.* St. Lucie Press, Florida, pp. 33–40.
- Akcha, F., Tanguy, a., Leday, G., Pelluhet, L., Budzinski, H., Chiffolleau, J.F., 2004. Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast. *Mar. Environ. Res.* 58, 753–756. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.090
- Ali, M., Sreerishnan, T., 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Adv. Environ. Res.* 5, 175–196. doi:10.1016/S1093-0191(00)00055-1
- Allen, H., 1971. Effects of petroleum fractions on the early development of a sea urchin. *Mar. Pollut. Bull.* 2, 138–140. doi:10.1016/0025-326X(71)90034-8
- Almeida, E.A. de, 2003. *Avaliação de variações bioquímicas em moluscos bivalves em resposta ao estresse ambiental.*
- Aloupi, M., Angelidis, M., 2001. Geochemistry of natural and anthropogenic metals in the coastal sediments of the island of Lesbos, Aegean Sea. *Environ. Pollut.* 113, 211–219. doi:10.1016/S0269-7491(00)00173-1
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., Carrião Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Eliza Ronsein, G., Alexandre Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Maria Gracioso Martins, A., Helena Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146, 588–600. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.040
- Anderson, B., Hunt, J., Phillips, B., Thompson, B., Lowe, S., Taberski, K., Scott Carr, R., 2007. Patterns and trends in sediment toxicity in the San Francisco

Estuary. Environ. Res. 105, 145–155. doi:10.1016/j.envres.2006.07.005

Andrade, V.M., de Freitas, T.R.O., da Silva, J., 2004. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 560, 57–67. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.02.006

Andral, B., Galgani, F., Tomasino, C., Bouchoucha, M., Blottiere, C., Scarpato, A., Benedicto, J., Deudero, S., Calvo, M., Cento, A., Benbrahim, S., Boulahdid, M., Sammari, C., 2011. Chemical Contamination Baseline in the Western Basin of the Mediterranean Sea Based on Transplanted Mussels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 261–271. doi:10.1007/s00244-010-9599-x

Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 704–712. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.05.008

APHA - American Public Health Association, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. Washington.

ASTM - American Society for Testing and Materials, 2012. *Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos*.

Atli, G., Canli, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 145, 282–7. doi:10.1016/j.cbpc.2006.12.012

Ausili, A., Mecozzi, M., Gabellini, M., Ciuffa, G., Mellara, F., 1998. Physico-chemical characteristics and multivariate analysis of contaminated harbour sediments. *Water Sci. Technol.* 37, 131–139.

Azqueta, A., Collins, A.R., 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* 87, 949–68. doi:10.1007/s00204-013-1070-0

Baig, S., Liechti, P.A., 2001. Ozone treatment for biorefractory COD removal. *Water Sci. Technol.* 43, 197–204.

Bainy, A.C.D., Almeida, E.A., Müller, I.C., Ventura, E.C., Medeiros, I.D., 2000. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar. Environ. Res.* 50, 411–416. doi:10.1016/S0141-1136(00)00039-8

Barbosa, J.S., Cabral, T.M., Ferreira, D.N., Agnez-Lima, L.F., Batistuzzo de Medeiros, S.R., 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 320–325. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.10.008

Barnes, R.D., 2006. *Zoologia dos invertebrados*. Roca.

Barnes, R.S.K., Calow, P.P., Olive, P.J.W., Golding, D.W., Spicer, J.I., 2009. *The Invertebrates: A Synthesis*. Wiley-Blackwell.

- Barra, C.M., Santelli, R.E., Abrão, J.J., 2000. Especificação de Arsênio -Uma Revisão. *Quim. Nova* 23, 58–70.
- Baršienė, J., Lehtonen, K.K., Koehler, A., Broeg, K., Vuorinen, P.J., Lang, T., Pempkowiak, J., Šyvokienė, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Repečka, R., Vuontisjärvi, H., Kopecka, J., 2006. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipėda-Būtingė area (Baltic Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 53, 422–436. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.03.009>
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., Widdows, J., 1985. *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. Praeger, New York.
- Bejarano, A.C., Chandler, G.T., He, L., Coull, B.C., 2006. Individual to population level effects of South Louisiana crude oil water accommodated hydrocarbon fraction (WAF) on a marine meiobenthic copepod. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 332, 49–59. doi:[10.1016/j.jembe.2005.11.006](https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.11.006)
- Belabed, B.-E., Laffray, X., Dhib, A., Fertouna-Belakhal, M., Turki, S., Aleya, L., 2013. Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria), *Marine Pollution Bulletin*. doi:[10.1016/j.marpolbul.2013.06.004](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.004)
- Belivermis, M., Kiliç, O., Çotuk, Y., 2016. Assessment of metal concentrations in indigenous and caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*) on entire Turkish coastline. *Chemosphere* 144, 1980–1987. doi:[10.1016/j.chemosphere.2015.10.098](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.098)
- Bellotto, V.R., De Brito, P.C., Manzoni, G., Wegner, E., 2005. Biomonitoramento ativo de metais traço e efeito biológico em mexilhões transplantados para área de influência de efluente de indústria de beneficiamento de aço - Fase I. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.* 9, 33. doi:[10.14210/bjast.v9n2.p33-37](https://doi.org/10.14210/bjast.v9n2.p33-37)
- Bend, J.R., James, M.O., 1978. No TitleXenobiotic metabolism in marine freshwater species, in: Malins, D.C., Sargent, J.. (Eds.), *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, London, England, pp. 125–188.
- Bianchi, J., Espindola, E.L.G., Marin-Morales, M.A., 2011. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 826–833. doi:[10.1016/j.ecoenv.2010.11.006](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.006)
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 463, 33–51. doi:[10.1016/S1383-5742\(00\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00004-1)
- Blackmore, G., Wang, W.-X., 2003. Comparison of metal accumulation in mussels at different local and global scales. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 388–395. doi:[10.1002/etc.5620220221](https://doi.org/10.1002/etc.5620220221)

- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913–21. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.049
- Bolam, S.G., 2014. Macrofaunal recovery following the intertidal recharge of dredged material: A comparison of structural and functional approaches. *Mar. Environ. Res.* 97, 15–29. doi:10.1016/j.marenvres.2014.01.008
- Bonfim, C.L.L., 2005. Efeitos do fenol e 4-clorofenol sobre o desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758): avaliação dessas substâncias como referência. Universidade Federal da Bahia.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brooks, R., Rumsby, M., 1967. Studies on the uptake of cadmium by the oyster, *Ostrea sinuata* (Lamarck). *Mar. Freshw. Res.* 18, 53. doi:10.1071/MF9670053
- Brooks, S.J., Harman, C., Grung, M., Farmen, E., Ruus, A., Vingen, S., Godal, B.F., Baršienė, J., Andreikėnaitė, L., Skarphéðinsdóttir, H., Liewenborg, B., Sundt, R.C., 2011. Water Column Monitoring of the Biological Effects of Produced Water from the Ekofisk Offshore Oil Installation from 2006 to 2009. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 74, 582–604. doi:10.1080/15287394.2011.550566
- Brown, K.R., McPherson, R.G., 1992. Concentrations of copper, zinc and lead in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) from the Georges River, New South Wales. *Sci. Total Environ.* 126, 27–33.
- Bubb, J.M., Lester, J.N., 1991. An Honour Volume For Eric I. Hamilton The impact of heavy metals on lowland rivers and the implications for man and the environment. *Sci. Total Environ.* 100, 207–233. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(91)90379-S
- Burgeot, T., Woll, S., Galgani, F., 1996. Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French coasts. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 39–46. doi:10.1016/0025-326X(96)89526-9
- Burton, E.D., Phillips, I.R., Hawker, D.W., 2005. Trace metal distribution and enrichment in benthic, estuarine sediments: Southport Broadwater, Australia. *Environ. Geochem. Health* 27, 369–83. doi:10.1007/s10653-004-7086-x
- Buruaem, L.M., Hortellani, M.A., Sarkis, J.E., Costa-Lotufo, L. V, Abessa, D.M.S., 2012. Contamination of port zone sediments by metals from Large Marine Ecosystems of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 479–88. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.017

- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4
- Cajaraville, M.P., Olabarrieta, I., Marigomez, I., 1996. In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 253–60. doi:10.1006/eesa.1996.0108
- Canova, S., Degan, P., Peters, L., Livingstone, D., Voltan, R., Venier, P., 1998. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 399, 17–30. doi:10.1016/S0027-5107(97)00263-7
- Carletti, E., Sulpizio, M., Bucciarelli, T., Del Boccio, P., Federici, L., Di Ilio, C., 2008. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. *Aquat. Toxicol.* 90, 48–57. doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.015
- Castro, H., Aguilera, P.A., Martinez Vidal, J.L., Carrique, E.L., 1999. Differentiation of Clams from Fishing Areas as an Approximation to Coastal Quality Assessment. *Environ. Monit. Assess.* 54, 229–237. doi:10.1023/A:1005960212211
- Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001
- Cesar, A., Choueri, R.B., Riba, I., Morales-Caselles, C., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Abessa, D.M.S., DeValls, T.A., 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. doi:10.1016/j.envint.2006.11.007
- Cesar, A., Lia, L.R.B., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cortez, F.S., Choueri, R.B., Orte, M.R. De, Rachid, B.R.F., 2014. Science of the Total Environment Environmental assessment of dredged sediment in the major Latin American seaport (Santos , São Paulo — Brazil): An integrated approach. *Sci. Total Environ.* 497–498, 679–687. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.037
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1999. Metodo de Ensaio: Agua do Mar-teste de Toxicidade Cronica de Curta Duracao com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). Cia. De Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de Sao Paulo, São Paulo.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1992. Água do Mar – teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea) Norma Técnica L5.250.

- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1990. Projeto: Desenvolvimento de implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos.
- Chaillou, G., Schäfer, J., Anschutz, P., Lavaux, G., Blanc, G., 2003. The behaviour of arsenic in muddy sediments of the Bay of Biscay (France). *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2993–3003. doi:10.1016/S0016-7037(03)00204-7
- Chan, H.M., 1989. Temporal and spatial fluctuations in trace metal concentrations in transplanted mussels in Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.* 20, 82–86. doi:10.1016/0025-326X(89)90231-2
- Chan, H.M., 1988. Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. *Mar. Ecol.* 48, 295–303.
- Chandler, T.G., Cary, T.L., Volz, D.C., Walse, S.S., Ferry, J.L., Klosterhaus, S.L., 2004. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 117. doi:10.1897/03-124
- Chapman, P.M., McDonald, B.G., Lawrence, G.S., 2002. Weight-of-Evidence Issues and Frameworks for Sediment Quality (And Other) Assessments. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 8, 1489–1515. doi:10.1080/20028091057457
- Chase, M.E., Jones, S.H., Hennigar, P., Sowles, J., Harding, G.C.H., Freeman, K., Wells, P.G., Krahforst, C., Coombs, K., Crawford, R., Pederson, J., Taylor, D., 2001. Gulfwatch: Monitoring spatial and temporal patterns of trace metal and organic contaminants in the Gulf of Maine (1991-1997) with the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 490–504. doi:10.1016/S0025-326X(00)00193-4
- Cheng, T.C., 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266, 343–79.
- Cheung, C.C., Zheng, G., Lam, P.K., Richardson, B., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 181–191. doi:10.1016/S0025-326X(01)00301-0
- Cheung, C.C., Zheng, G., Li, A.M., Richardson, B., Lam, P.K., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 52, 189–203. doi:10.1016/S0166-445X(00)00145-4
- Chiu, S.T., 1988. *Anthocidaris crassispina* (Echinodermata: chinoidea) grazing epibenthic macroalgae in Hong Kong. *Asian Mar. Biol.* 5, 123–132.
- Choueri, R.B., Cesar, A., Abessa, D.M.S., Torres, R.J., Morais, R.D., Riba, I., Pereira, C.D.S., Nascimento, M.R.L., Mozeto, A.A., DelValls, T.A., 2009. Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South

- Atlantic littoral zones: Comparison against national and international sediment quality benchmarks. *J. Hazard. Mater.* 170, 320–331. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.093
- Coimbra, A.G., 2003. Distribuição de metais pesados em moluscos e sedimentos nos manguezais de Coroa Grande e da Enseada das Garças, Baía de Sepetiba, RJ. Universidade Federal Fluminense.
- Collins, A.R., Ai-guo, M., Duthie, S.J., 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res. Repair* 336, 69–77. doi:10.1016/0921-8777(94)00043-6
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente., 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispões sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências., Diário Oficial da União.
- Conners, D.E., Black, M.C., 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 362–71.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 106–21. doi:10.1006/eesa.1999.1842
- Cruz, A.C., 2001. Seleção de substâncias orgânicas como referência em testes de toxicidade com embriões de ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1928): Controle da qualidade analítica de testes ecotoxicológicos. Universidade Federal da Bahia.
- D'Silva, C., Kureishy, T.W., 1978. Experimental studies on the accumulation of copper and zinc in the green mussel. *Mar. Pollut. Bull.* 9, 187–190.
- Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. 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. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00005-9
- DelValls, T.A., Forja, J.M., Gómez-Parra, A., 1998. The use of mul-tivariate analysis to link sediment contamination and toxicity data to establish sediment quality guidelines: An example in the Gulf of Cádiz (SW, Spain). *Ciencias Mar.* 24, 127–154.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161–72. doi:10.1007/BF00117081
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 5–32.

doi:10.1007/s10565-008-9072-z

- Díaz, A., Carro, S., Santiago, L., Estévez, J., Guevara, C., Blanco, M., Sánchez, L., Sánchez, L., López, N., Cruz, D., López, R., Cuetara, E.B., Fuentes, J.L., 2009. Estimates of DNA strand breakage in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) leukocytes measured with the Comet and DNA diffusion assays. *Genet. Mol. Biol.* 32, 367–72. doi:10.1590/S1415-47572009005000030
- Diegues, A.C., 2001. *Ecologia humana e planejamento costeiro*, 2nd ed. Edusp, São Paulo.
- Dinnel, P.A., Link, J.M., Stober, Q.J., Letourneau, M.W., Roberts, W.E., 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 748–755. doi:10.1007/BF01225012
- Dinnel, P.A., Stober, Q.J., 1987. Application of the sea urchin sperm bioassay to sewage treatment efficiency and toxicity in marine waters. *Mar. Environ. Res.* 21, 121–133. doi:10.1016/0141-1136(87)90046-8
- Doney, S.C., 2010. The Growing Human Footprint on Coastal and Open-Ocean Biogeochemistry. *Science* (80-). 328, 1512 LP-1516.
- Environment Canada, 1997. *Biological Test Method: Fertilization Assay using Echinoids (sea urchins and sand dollars)*. Method Development and Applications. Environmental Technology Center, Ottawa.
- ENVIRONMENT CANADÁ, 1999. Guidance document on application and interpretation of single-species testes in environmental toxicology.
- ENVIRONMENT CANADÁ, 1995. Guidance document on measurements of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant.
- ENVIRONMENT CANADÁ, 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants.
- Falk-Petersen, I.-B., 1979. Toxic effects of aqueous extracts of ekofisk crude oil, crude oil fractions, and commercial oil products on the development of sea urchin eggs. *Sarsia* 64, 161–169. doi:10.1080/00364827.1979.10411377
- Fang, J.K.H., Wu, R.S.S., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Shin, P.K.S., 2008. Induction, adaptation and recovery of lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 467–472. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.03.038
- Fichet, D., Radenac, G., Miramand, P., 1998. Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity, *Marine Pollution Bulletin*. Pergamon. doi:10.1016/S0025-326X(97)00190-2
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51, 115–

38.

- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317, 207–233. doi:10.1016/S0048-9697(03)00141-4
- Fliedner, A., Klein, W., 1996. Effects of Lindane on the Planktonic Community in Freshwater Microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 228–235. doi:http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1996.0029
- Folk, R., 1974. *Petrology of Sedimentary Rocks*. Hemphills Bookstore, Austin.
- Fossi, M.C., Marsili, L., Neri, G., Casini, S., Bearzi, G., Politi, E., Zanardelli, M., Panigada, S., 2000. Skin biopsy of Mediterranean cetaceans for the investigation of interspecies susceptibility to xenobiotic contaminants. *Mar. Environ. Res.* 50, 517–521. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00127-6
- Freitas, R., Ramos Pinto, L., Sampaio, M., Costa, A., Silva, M., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Figueira, E., 2012. Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 110, 43–53. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2012.01.011
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 681, 80–92. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001
- Fuentes-Rios, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gavilán, J.F., Barra, R., 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): Biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere* 61, 192–199. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.062
- Fung, C.N., Lam, J.C.W., Zheng, G.J., Connell, D.W., Monirith, I., Tanabe, S., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2004. Mussel-based monitoring of trace metal and organic contaminants along the east coast of China using *Perna viridis* and *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* 127, 203–216. doi:10.1016/j.envpol.2003.08.007
- Gadagbui, B.K.M., James, M.O., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquat. Toxicol.* 49, 27–37. doi:10.1016/S0166-445X(99)00073-9
- Galvão, J.A., 2004. *Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP*. Universidade de São Paulo.
- Giesy, J.P., Hook, R.A., 1989. Freshwater sediment quality criteria: Toxicity bioassessment., in: Baudo, R., Giesy, J.P., Muntau, H. (Eds.), *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp. 265–348.

- Gillikin, D.P., Dehairs, F., Baeyens, W., Navez, J., Lorrain, A., Andr??, L., 2005. Inter- and intra-annual variations of Pb/Ca ratios in clam shells (*Mercenaria mercenaria*): A record of anthropogenic lead pollution? *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1530–1540. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.06.020
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 2009. The Mussel Watch. *Environ. Conserv.* 5, 101–125. doi:10.1017/S0376892900005555
- Goldburg, R., Elliot, M., Naylor, R.L., 2001. Marine Aquaculture in the United States: Environmental impacts and policy options. Pew Oceans Commission, Arlington, Virginia.
- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. Vitro.* 17, 539–546. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6
- Gowland, B.T.G., McIntosh, A.D., Davies, I.M., Moffat, C.F., Webster, L., 2002. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Mar. Environ. Res.* 54, 231–235. doi:10.1016/S0141-1136(02)00129-0
- Gray, J.S., 1992. Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection. *Mar. Pollut. Bull.* 25, 48–50. doi:10.1016/0025-326X(92)90184-8
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77, 218–31.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- HABTEC, E.S. e A.L., 1997. Diagnóstico do Plano Diretor das Bacias dos rios Santa Maria da Vitória e Jucu., Relatório Diagnóstico.
- Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G.T., Shaw, T.J., 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar. Environ. Res.* 51, 247–64.
- Hardiman, S., Pearson, B., 1995. Heavy metals, TBT and DDT in the Sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) sampled from the Hawkesbury River estuary, NSW, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 563–567.
- Hayase, D., Horai, S., Isobe, T., Miller, T.W., Takahashi, S., Omori, K., Tanabe, S., 2009. Monitoring Trace Elements in Coastal Waters Using Sardine as a Bioindicator 167–175.
- Heslinga, G.A., 1976. Effects of copper on the coral-reef echinoid *Echinometra mathaei*. *Mar. Biol.* 35, 155–160. doi:10.1007/BF00390937
- Heuser, V.D., de Andrade, V.M., Peres, A., Gomes de Macedo Braga, L.M.,

- Bogo Chies, J.A., 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol. Int.* 32, 1223–1229. doi:10.1016/j.cellbi.2008.07.005
- Hewitt, L.M., Marvin, C.H., 2005. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 589, 208–232. doi:10.1016/j.mrrev.2005.02.001
- Hicks, G.R.F., Coull, B.C., 1983. The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 67–175. doi:10.1234/2013/999990.
- Huber, P.C., Almeida, W.P., 2008. GLUTATIONA E ENZIMAS RELACIONADAS: PAPEL BIOLÓGICO E IMPORTÂNCIA EM PROCESSOS PATOLÓGICOS. *Quim. Nov.* 31, 1170–1179.
- Hugget, R.J., Unger, M.A., Seligman, P.F., Valkirs, A.O., 1992. The marine biocide Tributyltin: Assessing and managing the environmental risks. *Environ. Sci. Technol.* 26, 232–237.
- Ihnat, M., Gamble, D.S., Gilchrist, G.F.R., 1993. Determination of Trace Element Levels in Natural Fresh Water by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 53, 63–78. doi:10.1080/03067319308045983
- Islam, M.S., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 624–649. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.12.004
- Jeffries, K.M., Jackson, L.J., Ikonomou, M.G., Habibi, H.R., 2010. Presence of natural and anthropogenic organic contaminants and potential fish health impacts along two river gradients in Alberta, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2379–2387. doi:10.1002/etc.265
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–221. doi:10.1093/mutage/gen014
- Joyeux, J.-C., Campanha Filho, E.A., Jesus, H.C. de, 2004. Trace metal contamination in estuarine fishes from Vitória Bay, ES, Brazil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 47, 765–774. doi:10.1590/S1516-89132004000500012
- Kádár, E., Salánki, J., Jugdaohsingh, R., Powell, J.J., McCrohan, C.R., White, K.N., 2001. Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquat. Toxicol.* 55, 137–148. doi:10.1016/S0166-445X(01)00183-7
- Kammann, U., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M., Wosniok, W., 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environ. Pollut.* 132, 279–287. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.021
- Kammann, U., Bunke, M., Steinhart, H., Theobald, N., 2001. A permanent fish

cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 498, 67–77. doi:10.1016/S1383-5718(01)00268-6

- Kennish, M.J., 1991. *Ecology of estuaries : anthropogenic effects*. CRC Press.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The role of glutathione in detoxication. *Environ. Health Perspect.* 49, 59–69.
- Kim, I.-Y., Hyun, C.-K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 288–297. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.05.019
- Kitzmann, D., Asmus, M., 2006. Gestão ambiental portuária: desafios e possibilidades*. *RAP Rio Janeiro* 40, 1041–60.
- Kobayashi, N., 2005. Marine Pollution Bioassay using Sea Urchins. *Environ. Sci.* 18, 155–167. doi:10.11353/sesj1988.18.155
- Kobayashi, N., 1977. Preliminary experiments with sea urchin pluteus and metamorphosis in marine pollution bioassay. *Natl. Mar. Biol. Libr.* 24, 9–21.
- Kobayashi, N., Naidenko, I.K., Vaschenko, M.A., 1994. Standardization of the biotest based on using of sea urchin embryos 20, 457–464.
- Kobayashi, N., Okamura, H., 2004. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere* 55, 1403–1412. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.11.052
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751–4.
- Kralik, M., Haslinger, E., Picer, M., Picer, N., Ottner, F., 2007. PCB-anomalies in the sediments of the harbour basin of Zadar (Croatia) as consequence of war action and / or industrial contamination. *CHINESE J. GEOCHEMISTRY* 25.
- Kristensen, E., Andersen, F.Ø., 1987. Determination of organic carbon in marine sediments: a comparison of two CHN-analyzer methods. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 109, 15–23. doi:10.1016/0022-0981(87)90182-1
- Krull, M., Abessa, D.M.S., Hatje, V., Barros, F., 2014. Integrated assessment of metal contamination in sediments from two tropical estuaries. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 195–203. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.038
- Kulicova, I., Seisuma, Z., Legzdina, M., 1985. Heavy metals in marine organisms, in: *Heavy Metals in Water Organisms*. Akadtmiai Kiado, Budapest, pp. 141–154.
- Kumari, M. V, Hiramatsu, M., Ebadi, M., 1998. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radic. Res.* 29, 93–101.
- Kusk, K.O., Petersen, S., 1997. Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ.*

Toxicol. Chem. 16, 1629–1633. doi:10.1002/etc.5620160810

- Kusk, K.O., Wollenberger, L., 2007. Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. *Ecotoxicology* 16, 183–95. doi:10.1007/s10646-006-0112-2
- Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Bao, V.W.W., Lee, J.-S., 2008. Copper toxicity in the marine copepod *Tigropus japonicus*: Low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 632–636. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.03.026
- Lakshmanan, P.T., Nambisan, P.N.K., 1989. Bioaccumulation and depuration of some trace metals in the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 131–138. doi:10.1007/BF01702249
- Lau, P., Wong, H., 2003. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1563–1572. doi:10.1016/S0025-326X(03)00321-7
- Leal, D.A.G., Franco, R.M.B., 2008. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. *Rev Panam Infectol* 10, 48–57.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544, 43–64. doi:10.1016/S1383-5742(03)00017-6
- Lehtonen, K.K., Turja, R., Budzinski, H., Devier, M.-H., 2016. An integrated chemical-biological study using caged mussels (*Mytilus trossulus*) along a pollution gradient in the Archipelago Sea (SW Finland, Baltic Sea). *Mar. Environ. Res.* 119, 207–221. doi:10.1016/j.marenvres.2016.06.003
- Lekube, X., Izagirre, U., Soto, M., Marigómez, I., 2014. Lysosomal and tissue-level biomarkers in mussels cross-transplanted among four estuaries with different pollution levels. *Sci. Total Environ.* 472, 36–48. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.075
- Lemos, P., 2003. Respostas bioquímicas e moleculares em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) expostos ao óleo diesel.
- Lercari, D., Defeo, O., Celentano, E., 2002. Consequences of a freshwater canal discharge on the benthic community and its habitat on an exposed sandy beach. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 1397–1404. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00304-1
- Li, X., Wai, O.W.H., Li, Y.S., Coles, B.J., Ramsey, M.H., Thornton, I., 2000. Heavy metal distribution in sediment profiles of the Pearl River estuary, South China. *Appl. Geochemistry* 15, 567–581. doi:10.1016/S0883-2927(99)00072-4
- Lions, J., Guérin, V., Bataillard, P., van der Lee, J., Laboudigue, A., 2010. Metal

- availability in a highly contaminated, dredged-sediment disposal site: Field measurements and geochemical modeling. *Environ. Pollut.* 158, 2857–2864. doi:10.1016/j.envpol.2010.06.011
- Liu, C.W., Lin, K.H., Kuo, Y.M., 2003. Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a blackfoot disease area in Taiwan. *Sci. Total Environ.* 313, 77–89. doi:10.1016/S0048-9697(02)00683-6
- Liu, J.H., Kueh, C.S.W., 2005. Biomonitoring of heavy metals and trace organics using the intertidal mussel *Perna viridis* in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 857–875. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.04.014
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–66.
- Lorenzo, J., Nieto, O., Beiras, R., 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat. Toxicol.* 58, 27–41. doi:10.1016/S0166-445X(01)00219-3
- Losso, C., Arizzi Novelli, A., Picone, M., Volpi Ghirardini, A., Ghetti, P.F., Rudello, D., Ugo, P., 2004. Sulfide as a confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: comparisons with chemical analysis data. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 396–401.
- Loureiro, D.D., Araujo, C.L., Lacerda, L.D., 2008. Efeitos da dragagem na distribuição espacial de mercúrio no sedimento superficial da Lagoa Rodrigo de Freitas. I Congr. Ibero-Americano Oceanogr. – I CIAO Fortaleza.
- Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H., 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study 129, 189–196.
- MacFarlane, G., Burchett, M., 2000. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquat. Bot.* 68, 45–59. doi:10.1016/S0304-3770(00)00105-4
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 70, 83–93. doi:10.1016/j.aquatox.2004.07.003
- Marigómez, I., Zorita, I., Izagirre, U., Ortiz-Zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., Orbea, A., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2013. Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquat. Toxicol.* 136, 32–48. doi:10.1016/j.aquatox.2013.03.008
- Marques, D.C., Matta, S.L.P., Oliveira, J.A., Dergam, J.A., 2009. Alterações histológicas em brânquias de *Astyanax bimaculatus* causadas pela exposição aguda ao zinco. *Rev. Bras. Toxicol.* 22–26.

- Mastroti, R.R., 2002. Testes de toxicidade com gamentas de ouriço-do-mar (fertilização), in: NASCIMENTO, I.A., SOUSA, E.C.P.M., NIPPER, M. (Eds.), Métodos Em Ecotoxicologia: Aplicações No Brasil. Artes Gráficas e Indústria LTDA, São Paulo, p. 262.
- Mendiguchía, C., Moreno, C., García-Vargas, M., 2007. Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients. *Chemosphere* 69, 1509–1517. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.082
- Mersch, J., Beauvais, M.-N., Nagel, P., 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat. Res. Toxicol.* 371, 47–55. doi:10.1016/S0165-1218(96)90093-2
- Micó, C., Recatalá, L., Peris, M., Sánchez, J., 2006. Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere* 65, 863–872. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.016
- Mirlean, N., Andrus, V.E., Baisch, P., Griep, G., Casartelli, M.R., 2003. Arsenic pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1480–1484. doi:10.1016/S0025-326X(03)00257-1
- Mirlean, N., Baisch, P., Travassos, M.P., Nassar, C., 2011. Calcareous algae bioclast contribution to sediment enrichment by arsenic on the Brazilian subtropical coast. *Geo-Marine Lett.* 31, 65–73. doi:10.1007/s00367-010-0215-x
- Mirlean, N., Medeanic, S., Garcia, F. a., Travassos, M.P., Baisch, P., 2012. Arsenic enrichment in shelf and coastal sediment of the Brazilian subtropics. *Cont. Shelf Res.* 35, 129–136. doi:10.1016/j.csr.2012.01.006
- Mitchelmore, C.L., Birmelin, C., Livingstone, D.R., Chipman, J.K., 1998. Detection of DNA Strand Breaks in Isolated Mussel (*Mytilus edulis*L.) Digestive Gland Cells Using the “Comet” Assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 51–58. doi:10.1006/eesa.1998.1666
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
- Montserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Lund Amado, L., Martinez Gaspar Martins, C., Lopes Leães Pinho, G., Soares Chaves, I., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 146, 221–234. doi:10.1016/j.cbpc.2006.08.012
- Montagna, P.A., 1995. Rates of metazoan meiofaunal microbivory: A review. *Vie Milieu* 45, 1–9.

- Montserrat, J.M., Geracitano, L.A., Assis, H.C.S., Colares, E.P., Bianchini, A., 2006. Biomarcadores Bioquímicos., in: Lana, P.C., Bianchini, A., Ribeiro, C.A.O., Niencheski, L.F.H., Fillmann, G., Santos, C.S.G. (Eds.), Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros-Diretrizes Metodológicas. Museu Nacional/UFRJ, Rio de Janeiro, pp. 124–131.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31–36. doi:10.1016/S0003-2670(00)88444-5
- Nadmitov, B., Hong, S., In Kang, S., Chu, J.M., Gomboev, B., Janchivdorj, L., Lee, C.-H., Khim, J.S., 2015. Large-scale monitoring and assessment of metal contamination in surface water of the Selenga River Basin (2007-2009). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 2856–67. doi:10.1007/s11356-014-3564-6
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubèze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.F., Moukrim, A., 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 901–8.
- Narchi, W., Galvão-Bueno, M.S., 1997. ANATOMIA FUNCIONAL DE PERNA PERNA (L1NNÉ) (BIVALVIA, MYTILIDAE). *Rev. Bras. Zool.* 14, 135–168.
- Niencheski, L.F., Milani, M.R., Milani, I.B., 2008. Metais Traço: Água., in: Poluição Marinha. Interciência, Rio de Janeiro, p. 412.
- Nilin, J., Moreira, L.B., Aguiar, J.E., Marins, R., Moledo de Souza Abessa, D., Monteiro da Cruz Lotufo, T., Costa-Lotufo, L.V., 2013. Sediment quality assessment in a tropical estuary: The case of Ceará River, Northeastern Brazil. *Mar. Environ. Res.* 91, 89–96. doi:10.1016/j.marenvres.2013.02.009
- Nogueira, L., Garcia, D., Trevisan, R., Sanches, A.L.M., da Silva Acosta, D., Dafre, A.L., Oliveira, T.Y.K., de Almeida, E.A., 2015. Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5. *Chemosphere* 134, 210–216. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.034
- Nuss, P., Eckelman, M.J., 2014. Life Cycle Assessment of Metals: A Scientific Synthesis. *PLoS One* 9, e101298. doi:10.1371/journal.pone.0101298
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 567, 109–149. doi:10.1016/j.mrrev.2004.08.003
- Owens, J.E., Niemeyer, E.D., 2006. Analysis of chemical contamination within a canal in a Mexican border colonia. *Environ. Pollut.* 140, 506–515. doi:10.1016/j.envpol.2005.07.019
- Ozretić, B., Krajnović-Ozretić, M., 1985. Morphological and biochemical evidence of the toxic effect of pentachlorophenol on the developing embryos of the sea urchin. *Aquat. Toxicol.* 7, 255–263. doi:10.1016/0166-445X(85)90043-8
- Papadopoulos, A.I., Polemitou, I., Laifi, P., Yiangou, A., Tananaki, C., 2004.

Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica*: Kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 139, 93–97. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2004.09.010>

- Pavlica, M., Klobučar, G.I. V, Mojaš, N., Erben, R., Papeš, D., 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 490, 209–214. doi:10.1016/S1383-5718(00)00162-5
- Payne, P.I., 1987. Genetics of Wheat Storage Proteins and the Effect of Allelic Variation on Bread-Making Quality. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 141–153. doi:10.1146/annurev.pp.38.060187.001041
- Pereira, C.D.S., Abessa, D.M.D.S., Bainy, A.C.D., Zaroni, L.P., Gasparro, M.R., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Furley, T.H., De Sousa, E.C.P.M., 2007. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 462–9.
- Phillips, B.M., Anderson, B.S., Hunt, J.W., 1998. Spatial and temporal variation in results of purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) toxicity tests with zinc. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 453–459. doi:10.1002/etc.5620170316
- Phillips, D.J.H., 1995. The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 193–200. doi:10.1016/0025-326X(95)00194-R
- Phillips, D.J.H. (Acer E.L. (United K., 1991. Selected trace elements and the use of biomonitors in subtropical and tropical marine ecosystems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*
- Pierce, M.L., Moore, C.B., 1982. Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. *Water Res.* 16, 1247–1253. doi:10.1016/0043-1354(82)90143-9
- Poli, P., Buschini, A., Maria, F., 1999. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis* 14, 547–555.
- Prá, D., Lau, A.H., Knakievicz, T., Carneiro, F.R., Erdtmann, B., 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 585, 79–85. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.04.002
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 120, 497–507. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00238-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00238-5)
- Raisuddin, S., Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Schlenk, D., Lee, J.-S., 2007. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat. Toxicol.* 83, 161–173. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.04.005>

- Rank, J., 2009. Intersex in *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1271–1277. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.12.008
- Rank, J., Jensen, K., Jespersen, P.H., 2005. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 585, 33–42. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.04.008
- Reimann, C., Matschullat, J., Birke, M., Salminen, R., 2009. Arsenic distribution in the environment: The effects of scale. *Appl. Geochemistry* 24, 1147–1167. doi:10.1016/j.apgeochem.2009.03.013
- Renzi, M., Perra, G., Guerranti, C., Franchi, E., Focardi, S., 2009. Abatement efficiency of municipal wastewater treatment plants using different technologies (Orbetello Lagoon, Italy). *Int. J. Environ. Heal.* 3, 58–70.
- Riba, I., Casado-Martínez, C., Forja, J.M., DelValls, A., 2004. Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 271–282. doi:10.1897/03-146
- Riba, I., Forja, J.M., Gómez-Parra, A., DelValls, T.Á., 2004. Sediment quality in littoral regions of the Gulf of Cádiz: A triad approach to address the influence of mining activities. *Environ. Pollut.* 132, 341–353. doi:10.1016/j.envpol.2004.03.021
- Rodríguez-Ariza, A., Alhama, J., Díaz-Méndez, F.M., López-Barea, J., 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat. Res.* 438, 97–107.
- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., Elder, J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671–679. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00333-2
- Rubio, B., Nombela, M., Vilas, F., 2000. Geochemistry of Major and Trace Elements in Sediments of the Ria de Vigo (NW Spain): an Assessment of Metal Pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 968–980. doi:10.1016/S0025-326X(00)00039-4
- Ruschi, A., 2007. PARQUE NACIONAL MARINHO DE SANTA CRUZ – ES. [WWW Document]. URL http://ruschicolibri.com.br/parque_nacional.php (accessed 9.18.16).
- Sá, F., Machado, E.C., Angulo, R.J., Veiga, F.A., Brandini, N., 2006. Arsenic and Heavy metals in Sediments near Paranaguá Port, Southern Brazil. *J. Coast. Res.* 39, 1066–1068.
- Saco-Álvarez, L., Durán, I., Ignacio Lorenzo, J., Beiras, R., 2010. Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 491–499. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.01.018

- Sáenz, L.A., Seibert, E.L., Zanette, J., Fiedler, H.D., Curtius, A.J., Ferreira, J.F., Alves de Almeida, E., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2010. Biochemical biomarkers and metals in Perna perna mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 796–804. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.02.015
- Salazar, M.H., Salazar, S.M., 1991. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Mar. Environ. Res.* 32, 131–150. doi:10.1016/0141-1136(91)90038-A
- Sanders, M.J., Du Preez, H.H., Van Vuren, J.H.J., 1998. The Freshwater River Crab, *Potamonautes warreni*, as a Bioaccumulative Indicator of Iron and Manganese Pollution in Two Aquatic Systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 203–214. doi:10.1006/eesa.1998.1699
- Santana, L.I. De, Eduardo, C., Carvalho, V. De, Gomes, M.P., Metais, D. De, Perna, M., Santana, I. De, 2001. Distribuição de Metais Pesados em Mexilhões SUMMARY.
- Scanes, P., Roach, A., 1999. Determining natural 'background' concentrations of trace metals in oysters from New South Wales, Australia. *Environ. Pollut.* 105, 437–446. doi:10.1016/S0269-7491(99)00030-5
- Scanes, P.R., 1997. Uptake and depuration of organochlorine compounds in Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). *Mar. Freshw. Res.* 48, 1–6.
- Semmler, M.G.M.C., 2007. Biomonitoração de Hg, Cd, Pb e outros elementos em áreas costeiras do Estado de São Paulo por meio do mexilhão transplantado - Perna perna (Linnaeus, 1758). Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/T.85.2007.tde-27112007-140442
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 193–199. doi:10.1016/S0742-8413(99)00033-X
- Shulkin, V.M., Presley, B.J., Kavun, V.I., 2003. Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environ. Int.* 29, 493–502. doi:10.1016/S0160-4120(03)00004-7
- Sim, W.-J., Lee, J.-W., Lee, E.-S., Shin, S.-K., Hwang, S.-R., Oh, J.-E., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere* 82, 179–186. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.026
- Sloman, K.A., 2007. Effects of trace metals on salmonid fish: The role of social hierarchies. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 326–345. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.003
- Souza, R.C.C.L., Fernandes, F.C., Silva, E.P., 2003. A study on the occurrence

of the brown mussel *Perna perna* on the sambaquis of the Brazilian coast. *Rev. do Mus. Arqueol. e Etnol.* 13, 3–24.

- Souza, I.S. de, Araujo, G.S. de, Cruz, A.C.F., Fonseca, T.G., Camargo, J.B.D.A. de, Medeiros, G.F., Abessa, D.M. de S., 2016. Using and integrated approach to assess the sediment quality of an estuary from the semi-arid coast of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushi, K., Simazaki, D., 2003. Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 541, 31–44. doi:10.1016/S1383-5718(03)00177-3
- Stankovic, S., Jovic, M., 2012. Health risks of heavy metals in the mediterranean mussels as seafood. *Environ. Chem. Lett.* 10, 119–130. doi:10.1007/s10311-011-0343-1
- Stark, J.S., 1998. Effects of Copper on Macrobenthic Assemblages in Soft Sediments: A Laboratory Experimental Study. *Ecotoxicology* 7, 161–173. doi:10.1023/A:1014356327595
- Sternbeck, J., Östlund, P., 2001. Metals in Sediments from the Stockholm Region: Geographical Pollution Patterns and Time Trends. *Water, Air Soil Pollut. Focus* 1, 151–165. doi:10.1023/A:1017508322097
- Stronkhorst, J., Ariese, F., van Hattum, B., Postma, J.F., de Kluijver, M., Den Besten, P.J., Bergman, M.J.N., Daan, R., Murk, A.J., Vethaak, A.D., 2003. Environmental impact and recovery at two dumping sites for dredged material in the North Sea. *Environ. Pollut.* 124, 17–31. doi:10.1016/S0269-7491(02)00430-X
- Tanabe, S., Prudente, M.S., Kan-atireklap, S., Subramanian, A., 2000. Mussel watch: marine pollution monitoring of butyltins and organochlorines in coastal waters of Thailand, Philippines and India. *Ocean Coast. Manag.* 43, 819–839. doi:10.1016/S0964-5691(00)00060-0
- Theodorakis, C.W., 2001. Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology* 10, 245–56.
- Thompson, E.L., Taylor, D. a, Nair, S. V, Birch, G., Haynes, P. a, Raftos, D. a, 2012. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquat. Toxicol.* 109, 202–12. doi:10.1016/j.aquatox.2011.09.018
- Thompson, G., Swain, J., Kay, M., Forster, C., 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresour. Technol.* 77, 275–286. doi:10.1016/S0960-8524(00)00060-2
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–21.

- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, a., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J
- Torres, M.A., Pires Testa, C., Gáspari, C., Beatriz Masutti, M., Maria Neves Panitz, C., Curi-Pedrosa, R., Alves de Almeida, E., Di Mascio, P., Wilhelm Filho, D., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 923–932. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00142-X
- Torres, R.J., Abessa, D.M.S., Santos, F.C., Maranhão, L.A., Davanzo, M.B., do Nascimento, M.R.L., Mozeto, A.A., 2009. Effects of dredging operations on sediment quality: contaminant mobilization in dredged sediments from the Port of Santos, SP, Brazil. *J. Soils Sediments* 9, 420–432. doi:10.1007/s11368-009-0121-x
- Tran, D., Moody, A.J., Fisher, A.S., Foulkes, M.E., Jha, A.N., 2007. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquat. Toxicol.* 84, 11–18. doi:10.1016/j.aquatox.2007.05.009
- Trefry, J.H., Naito, K.L., Trocine, R.P., Metz, S., 1995. Distribution and bioaccumulation of heavy metals from produced water discharges to the gulf of Mexico. *Water Sci. Technol.* 32, 31–36. doi:10.1016/0273-1223(95)00566-6
- Tsangaris, C., Vergolyas, M., Fountoulaki, E., Nizheradze, K., 2011. Oxidative Stress and Genotoxicity Biomarker Responses in Grey Mullet (*Mugil cephalus*) From a Polluted Environment in Saronikos Gulf, Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 482–490. doi:10.1007/s00244-010-9629-8
- Turja, R., 2015. Biological Effects of Contaminants in Mussels (*Mytilus trossulus*) Transplanted in Northern Baltic Sea Coastal Areas. Department of Environmental Sciences. Division of Aquatic Sciences.
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Uluturhan, E., Kucuksezgin, F., 2007. Heavy metal contaminants in Red Pandora (*Pagellus erythrinus*) tissues from the Eastern Aegean Sea, Turkey. *Water Res.* 41, 1185–1192. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.044
- USEPA (United States Environmental Protection Agency/Department of The Army U.S. Army Corps of Engineers), 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal — testing manual, EPA-503-8-91/001.
- Usero, J., González-Regalado, E., Gracia, I., 1997. Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic Coast of Southern Spain. *Environ. Int.* 23, 291–298. doi:10.1016/S0160-4120(97)00030-5
- Usero, J., Morillo, J., Gracia, I., 2005. Heavy metal concentrations in molluscs

- from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere* 59, 1175–1181. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.089
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Venier, P., Maron, S., Canova, S., 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 390, 33–44. doi:10.1016/S0165-1218(96)00162-0
- Villela, I.V., de Oliveira, I.M., da Silva, J., Henriques, J.A.P., 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 605, 78–86. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.02.006
- Vosloo, D., Sara, J., Vosloo, A., 2012. Acute responses of brown mussel (*Perna perna*) exposed to sub-lethal copper levels: Integration of physiological and cellular responses. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 1–8. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.001
- Warnau, M., Ledent, G., Temara, A., Bouquegneau, J.-M., Jangoux, M., Dubois, P., 1995. Heavy metals in *Posidonia oceanica* and *Paracentrotus lividus* from seagrass beds of the north-western Mediterranean. *Sci. Total Environ.* 171, 95–99. doi:10.1016/0048-9697(95)04721-8
- Waterman, A., 1937. Effect of Salts of Heavy Metals on Development of the Sea Urchin, *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* 73, 401–420.
- Wells, P.G., Depledge, M.H., Butler, J.N., Manock, J., Knap, A.H., 2001. Rapid Toxicity Assessment and Biomonitoring of Marine Contaminants — Exploiting the Potential of Rapid Biomarker Assays and Microscale Toxicity Tests. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 799–804. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00054-6
- Widerlund, A., Ingri, J., 1995. Early diagenesis of arsenic in sediments of the Kalix River estuary, northern Sweden. *Chem. Geol.* 125, 185–196. doi:10.1016/0009-2541(95)00073-U
- Yabe, M.J.S., Oliveira, E. de, 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Quim. Nova* 21, 551–556. doi:10.1590/S0100-40421998000500003
- Yeung, J.W.Y., Zhou, G.-J., Leung, K.M.Y., 2016. Sub-lethal effects of cadmium and copper on RNA/DNA ratio and energy reserves in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 59–67. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.05.023
- Zagatto, P.A. Bertoletti, E., 2006. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e*

Aplicações. Rima, São Carlos.

- Zhadan, P.M., Vashchenko, V. V., Malakhov, L.A., Medvedeva, V., G.R., 1992. The effect of environmental pollution, hydrocarbons and heavy metals on reproduction of sea urchins and bivalves, in: Ilyichev, V.I., Anikiev, V. V. (Eds.), *Oceanic and Anthropogenic Controls of Life in the Pacific Ocean*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp. 267–286.
- Zhang, W., Guo, Z., Zhou, Y., Liu, H., Zhang, L., 2015. Biotransformation and detoxification of inorganic arsenic in Bombay oyster *Saccostrea cucullata*. *Aquat. Toxicol.* 158, 33–40. doi:10.1016/j.aquatox.2014.10.021
- Zimmerman, L.E., Jutte, P.C., Van Dolah, R.F., 2003. An environmental assessment of the Charleston Ocean Dredged Material Disposal Site and surrounding areas after partial completion of the Charleston Harbor Deepening Project. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1408–1419. doi:10.1016/S0025-326X(03)00289-3
- Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201–208. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001

CAPÍTULO 5
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização desta pesquisa foi possível demonstrar que as duas regiões do Estado do Espírito Santo avaliadas neste estudo, litoral do município de Aracruz e a região estuarina da Baía de Vitória, se apresentam impactadas pela presença de metais, assim como, pela presença de outros fatores que não foram mensurados. Demonstrando assim, o comprometimento de sua saúde ambiental, possivelmente devido a forte pressão antrópica com despejo de esgoto urbano sem prévio tratamento, despejo de efluentes industriais com grande carga de poluentes, forte tráfego marítimo e instalação de empreendimentos industriais que requerem grandes modificações estruturais costeiras.

A aplicação de testes de toxicidade já normatizados com larvas de ouriço do mar (*Echinometra lucunter*) possibilitou conhecer a toxicidade do elutriato, preparado com o sedimento marinho coletado, assim como a aplicação de métodos alternativos para testes de toxicidade aguda com gametas de *E. lucunter* e testes de toxicidade crônica utilizando sedimento bruto com o copépoda bentônico *Nitokra* sp.. Desta forma, tais testes se julgam aplicáveis na avaliação da toxicidade de amostras ambientais ao possibilitarem o conhecimento quanto ao potencial tóxico da amostra analisada.

Este trabalho também validou a utilização de um conjunto de práticas recomendadas como ferramentas de biomonitoramento ao testar a aplicação do método de transplantação de organismos bivalves, e propôs a exposição de tais organismos em laboratório ao invés de utilizar a técnica do transplante. Tal ferramenta de exposição em laboratório obteve considerável sucesso nesta avaliação, no entanto acredita-se que mais estudos devem ser desenvolvidos buscando o aprimoramento desta técnica para torná-la mais robusta ao ser utilizada em programas de avaliação ambiental.

A utilização de um conjunto de biomarcadores para se promover um diagnóstico ambiental concreto se mostrou claro, invalidando a utilização de apenas um, pois não fornece informações suficientemente sobre os diversos compartimentos ambientais do ecossistema a ser avaliado.

Desta forma, espera-se ter contribuído com informações que auxiliem na gestão e preservação de ecossistemas costeiros do litoral do Espírito Santo, principalmente incentivando a aplicação de biomarcadores como ferramentas de diagnóstico ambiental.

Tendo em vista o desastre ambiental ocorrido no país, com o recebimento da pluma de rejeitos de mineração oriunda do rompimento da barragem de Fundão (Mariana – MG), os dados levantados no atual estudo representam informações pretéritas que podem embasar trabalhos de biomonitoramento, mensuração de impactos e até mesmo mitigação ambiental.