

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BARBARA MAICHAK DE CARVALHO

AVALIAÇÃO GENTÓXICA EM HEMÁCIAS DE BAIACUS *Sphoeroides testudineus* (LINNAEUS, 1758) E *Sphoeroides greeleyi* (GILBERT, 1900) NA GAMBOA PEREQUÊ, PARANÁ, BRASIL.

PONTAL DO PARANÁ

2010

BARBARA MAICHAK DE CARVALHO

AVALIAÇÃO GENTÓXICA EM HEMÁCIAS DE BAIACUS *Spherooides testudineus* (LINNAEUS, 1758) E *Spherooides greeleyi* (GILBERT, 1900) NA GAMBOA PEREQUÊ, PARANÁ, BRASIL.

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia, com habilitação em Pesquisa Oceanográfica, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marco Fábio Maia Corrêa

PONTAL DO PARANÁ

2010

TERMO DE APROVAÇÃO


Barbara Maichak de Carvalho

"Avaliação genotóxica em hemácias dos baiacus *Sphaeroides testudineus* (Linnaeus 1758) e *Sphaeroides greyleyi* (Gilbert, 1900) da Gamboa do Perequê , Paraná , Brasil"

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Prof. Dr. Marta Margarite Cestari (Depto. de Genética-UFPR)


Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Júnior (CEM-UFPR)


Prof. Dr. Marco Fábio Maia Correa (CEM-UFPR)
Presidente

Pontal do Paraná, 28 de outubro de 2010.

Dedico aos meus pais, Rogério e Solangela.

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer aos meus pais, muito mais pelo amor dedicado a mim. Mas como também pelo apoio, compreensão e os ensinamentos que levarei durante esta e as próximas vidas.

Ao Prof. Marco Fábio pela orientação durante esses anos.

Aos professores Henry, Hedda, Sibelle e Elaine pelas sugestões, empréstimos de materiais, conversas e principalmente ensinamentos.

A equipe de coleta que ajudou incansavelmente Bia, Tinho, Lu, Bot, Bruna, Marisa, Gui, Nat, Ana Carolina e a laiá ninguém faz nada sozinho. Em especial a Bia que se tornou mais que uma companheira de laboratório.

Aos melhores amigos que alguém poderia ter Raíssa, Lu, Tinho, Bot e Marco.

Ao Daniel que tantas vezes ficou ao meu lado, tanto nos momentos bons como nos ruins.

Obrigada!

Plante seu jardim e decore sua alma ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente é forte e que pode ir muito longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida. Nossas dádivas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.

William Shakespeare

RESUMO

Os micronúcleos (MN) e as alterações morfológicas nucleares (AMN) em eritrócitos são compostos por pequenos fragmentos de cromatina, como resultado das quebras cromossômicas após ações genotóxicas, ou por cromossomos inteiros que não migram durante a anáfase como resposta aos contaminantes presentes no ambiente. O presente trabalho objetiva a comparação da ocorrência dos micronúcleos e alterações morfológicas nucleares entre as duas espécies de baiacus os *Spherooides testudineus* e *Spherooides greeleyi* na Gamboa do Perequê. Os exemplares foram coletados mensalmente na maré de quadratura, com uma rede Fyke, entre julho de 2009 e junho de 2010. As hemácias foram obtidas pela punção cardíaca, as lâminas permaneceram secando por 24 horas. Posteriormente foram fixadas durante 20 minutos com metanol (100%), lavadas com água destilada e coradas com Giemsa 5% por 40 minutos. Para cada lâmina, foram contadas 1000 células com o auxílio do microscópio ótico no aumento de 100 vezes. *S. testudineus* apresentou maior frequência de MN no outono com valores médios de 0,04 ($n = 21 \pm 0,082$)% e a menor no verão com valores médios de 0,01 ($n = 3 \pm 0,02$)% , e as AMN apresentaram maiores médias no outono 9,15 ($n = 4089 \pm 7,22$)% e menores no verão com 3,84 ($n = 1239 \pm 3,73$)%. O *S. greeleyi* apresentou as maiores médias de MN no inverno 0,04 ($n = 5 \pm 0,11$)% não ocorrendo na primavera, já as AMN tiveram maiores médias no outono 10,51 ($n = 1049 \pm 6,04$)%. Quando calculada a matriz da correlação de Pearson para o *S. testudineus* foi identificada uma significância entre os MN e o comprimento padrão, peso do corpo, ocorrendo também com a temperatura da água. Entretanto para o *S. greeleyi* não ocorreu significância entre os MN e as variáveis biométricas e os parâmetros ambientais. A partir do presente estudo pode-se concluir que as espécies *S. testudineus* e *S. greeleyi* são bons bioindicadores em ambientes estuarinos, desde que ambos sejam capturados na mesma proporção para facilitar uma comparação entre as taxas de frequências de MN e AMN entre as espécies.

Palavras chaves: Micronúcleos, baiacus, gamboas.

ABSTRACT

The micronuclei and the alterations in nuclear erythrocytes are composed of small fragments of chromatin, resulting of chromosomal ruptures, after genotoxic actions, or for entire chromosomes which don't migrate during the anaphase as answer to the contaminating presents in the environment. To the analysis of micronuclei usually are used erythrocytes due the facility to the facility to obtain of the sanguineous tissue through the cardiac puncture. This work aims the comparison of the micronuclei occurrence and nuclear erythrocytes alterations between the two species *Sphoeroides testudineus* and *Sphoeroides greeleyi* of the Perequê tidal creek. The exemplars were collected monthly during the quadrature tidal, with a Fyke net, between July of 2009 and June of 2010. The erythrocytes were obtained by cardiac puncture with 1 mL syringe prepared with EDTA. The laminas stayed drying for 24 hours after the rubbing in ambient temperature. Posteriorly were fixed during 20 minutes with methanol (100%), washed with distillated water and colored with Giemsa 5% for 40 minutes. To each lamina were counted 1000 cellules with the help of the optical microscope in the increase of 100 times. *S. testudineus* showed a higher frequency of MN in the fall with average values of 0.04 ($n = 21 \pm 0.082$)% and lower in summer with average values of 0.01 ($n = 3 \pm 0.02$)%, and the AMN showed higher 9.15 average in the fall ($n = 4089 \pm 7.22$)% and lower in summer with 3.84 ($n = 1239 \pm 3.73$)%. *S. greeleyi* showed the highest levels of NM in the winter 0.04 ($n = 5 \pm 0.11$)% did not occur in the spring, since the AMN had higher averages 10.51 in the fall ($n = 1049 \pm 6.04$)%. When calculated the Pearson correlation matrix for *S. testudineus* was identified a significant association between the MN and the standard length, body weight, also occurring with the water temperature. However, for *S. greeleyi* was not significant between the MN and the biometric variables and environmental parameters. From this study we can conclude that the species *S. testudineus* and *S. greeleyi* are good bioindicators in estuarine environments, since both are caught in the same proportion to facilitate a comparison of rates and frequencies of MN AMN between species.

Key words: micronuclei, pufferfish, tidal creek.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
3. MATERIAL E METODOS	16
3.1 ÁREA DE ESTUDO	16
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS	19
3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	20
3.4 ANÁLISE DOS DADOS	21
4. RESULTADOS	21
4.1 INFLUÊNCIA ANTRÓPICA	21
4.2 PARÂMETROS AMBIENTAIS	22
4.3 BIOMETRIA E PESAGEM de <i>Spherooides testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i>	24
4.4 ESTRUTURA SEXUAL DE <i>Spherooides testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i>	26
4.5 ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO E HEPATOSSOMÁTICO.	28
4.6 MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES de <i>Spherooides testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i>	30
5. DISCUSSÃO	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
7. REFERÊNCIAS	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Ilustração da mitose em células sanguíneas resultando em micronúcleos.	14
FIGURA 2. A) <i>Spherooides testudineus</i> e B) <i>Spherooides greeleyi</i> .	15
FIGURA 3. Mapa do Complexo Estuarino de Paranaguá.	18
FIGURA 4. A) Desembocadura do Canal do DNOS e B) Desembocadura do Rio Perequê.	18
Figura 5. Ilustração e foto da rede “Fyke” fixada na gamboa.	19
FIGURA 6. 1) Tipos de núcleos a) Célula Mononucleada, b) Micronúcleo Homórfico, c) Micronúcleo Heteromórfico e d) Célula Tri – nucleada; 2) Tipos de Alterações morfológicas nucleares MN) Micronúcleo, NT) com entalhe (Notched), BL) Bolhada “Blebbled”, LB) “Lobed e BN) binucleado	21
FIGURA 7. Fotos de alguns pontos de escoamento de efluentes domésticos diretamente na Gamboa	22
FIGURA 8. Temperaturas médias do ar e da água.	22
FIGURA 9. Médias e desvios padrões de salinidade e pH por épocas do ano observadas na Gamboa do Perequê.	23
Figura 10. Médias e desvios padrões de profundidade e transparência observados na Gamboa do Perequê.	23
TABELA 1. Médias e desvios padrões de CT, CP, peso do corpo (Pc) observados nas diferentes estações do ano para <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> na Gamboa do Perequê.	24
TABELA 2. Valores de F e p da ANOVA resultante da comparação das médias de comprimento total (CT), comprimento padrão (CP) e peso do corpo (Pc) pelas estações do ano. Valores inferiores a 0,05 significativos	25
FIGURA 11. Médias e intervalo de confiança (ic) de 95% das estimativas para as variáveis biométricas, comprimento total (CT em cm), comprimento padrão (CP) e peso de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> .	26

TABELA 3. Frequência de machos e fêmeas de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> capturados por diferentes épocas do ano na Gamboa do Perequê.	26
TABELA 4. Estágios de maturação gonadal de <i>Spherooides testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> em cada estação do ano (onde n= número de exemplares, A imaturos, B em maturação, C maduro, D desovado e E em descanso).	27
TABELA 5. Médias e desvios padrões dos Índices gonadal (IGS) e hepatossomatico (IHS) para o <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> nas estações do ano.	28
Figura 12. Médias de índice gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> nas diferentes estações do ano.	29
TABELA 6. Média e desvio padrão dos micronúcleos e alterações morfológicas nucleares para os <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> nas estações do ano.	30
TABELA 7. Valores de H e p de Kruskal-Wallis resultantes da comparação intraespecífica das frequências de MN e AMN por estações do ano, sexo e maturação gonadal. Valores de p inferiores a 0,05 significativos.	31
Tabela 8. Matriz de correlação linear de Pearson das variáveis biométricas e ambientais estando correlacionadas com os MN e as AMN, considerando valores significativos menores que 0,05 *.	31
FIGURA 13. Médias e intervalo de confiança (95%) das estimativas de micronúcleos (MN em %) e alterações morfológicas nucleares (AMN em %) observadas em células sanguíneas de <i>S. testudineus</i> e <i>S. greeleyi</i> em diferentes estações do ano.	33

1. INTRODUÇÃO

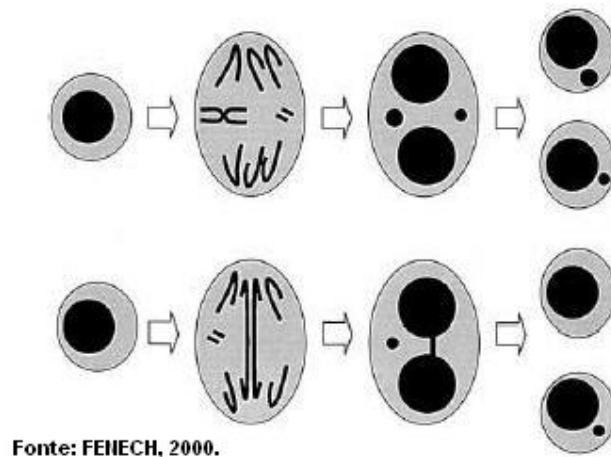
Os estuários são zonas de transição entre as águas continentais e os oceanos, dos quais diferem nas condições abióticas, na fauna e flora. Biologicamente, apresentam elevada produtividade, superando os recifes de corais, originada da rápida interação entre a coluna d'água e o sedimento que disponibiliza matéria orgânica para o sistema. A diversidade de fatores abióticos estuarinos auxiliou na evolução e diversificação dos ambientes de manguezais, gamboas, baixios, marismas e áreas de transição entre manguezais e restingas. São consideradas áreas importantes no recrutamento e alimentação de diferentes organismos (MCLUSKY; ELLIOT, 2004).

As gamboas são canais de drenagem que não possuem nascentes e são influenciadas pela maré (LANA, *et al.* 1989). Embora abundantes e amplamente distribuídas nos ecossistemas marinhos, têm sua importância ecológica subvalorizada que se reflete na falta de estudos sobre este ecossistema (MALLIN; LWITES, 2004). Contudo, é mundialmente aceito o fato de que algumas espécies de peixes utilizam este ambiente para completar o seu desenvolvimento ontogênico como áreas de alimentação, pela abundância de invertebrados e refúgio contra piscívoros (LAEGDSGAARD; JOHNSON, 2001 e NAGLEKERKEN, 2009). Embora de reconhecida importância para muitos organismos, alguns deles recursos pesqueiros, o ambiente estuarino é freqüentemente área de descarga de efluentes domésticos e industriais (MCLUSKY; ELLIOT, 2004). A maior concentração da população próxima às áreas litorâneas no Brasil resulta no carreamento dos dejetos industriais ou residenciais, pela chuva, diretamente através dos estuários e gamboas para os oceanos (KOLM; ANDREATTA, 2003).

Os contaminantes domésticos e industriais afetam os organismos aquáticos de forma direta ou indireta. Podem ser ou não degradados, entrar na cadeia trófica ou acumular-se no sedimento (ONOFRE *et al.* 2007). Nos peixes, após 72 horas de exposição aos toxicantes, observou-se que suas células apresentaram efeitos mutagênicos, tais como aberrações cromossômicas, mutações e a formação de micronúcleos (BOLS *et al.* 2005).

Os micronúcleos (MN) são compostos por pequenos fragmentos de cromatina, como resultado das quebras cromossômicas, após ações

genotóxicas, ou por cromossomos inteiros que não migraram durante a anáfase em resposta aos contaminantes presentes no ambiente (FENECH, 2000 e CAVAS *et al.*, 2003) (Fig. 1). Podem ser observados em diferentes tecidos ou órgãos dos peixes, tais como: hemácias, brânquias, rins, fígado, músculos e nadadeiras (EDWARDS, 2001; MARIA *et al.* 2003 e AMADO *et al.* 2006). Porém a detecção de micronúcleos em hemácias é considerada mais eficaz (FENECH, 2000).



Fonte: FENECH, 2000.

Figura 1. Ilustração da mitose em células sanguíneas resultando em micronúcleos (FENECH, 2000).

A ocorrência de micronúcleos nas hemácias dos peixes gera deficiência nas trocas gasosas, reduzindo o transporte de oxigênio até os tecidos e uma acidificação no tecido sanguíneo (NIKINMAA, 1992).

Durante a análise para detecção de micronúcleos alguns autores costumam observar as alterações morfológicas nucleares (AMN), e sugerem que também devem ser consideradas, pois podem estar associados aos processos mutagênicos geradores dos micronúcleos. Em peixes foram registradas algumas anomalias após a exposição a efluentes de refinaria de petróleo (SOUZA; FONTANELLI, 2006). Em ambientes considerados preservados, a presença de micronúcleos varia entre 0,6 a 0,8% em 1000 células (HOSE *et al.* 1987).

A formação de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares foi eficientemente testada em peixes com os seguintes contaminantes: fungicidas e herbicidas (GRISOLIA, *et al.* 2002); óleo cru e fenóis alcalinos (BOLOGNESI

et al. 2006 e BARSIENTE, *et al.* 2006); ciclofosfotamina e mitomicina C (PALHARES; GRISOLIA, 2002); cromo, zinco, cobre, chumbo, ferro e manganês (TALAPRATA; BANERJEI, 2007 ; CESTARI, *et al.* 2004; RAMSDORF, *et al.* 2009; FERRARO, *et al.* 2004); mercúrio (GUILHERME, *et al.* 2008); hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (MARIA *et al.* 2003); frações solúveis do óleo diesel (VANZELLA, *et al.* 2007); pesticida organofosfatado (ALI, *et al.* 2008); cloreto de cádmio e nitrato de mercúrio (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000 e SANCHES- GALAN *et al.* 2001); sulfato de cobre e sulfato de zinco (SANCHES- GALAN *et al.* 2001), e esgoto doméstico (GRISOLIA; STARLING, 2001 e GRISOLIA, *et al.* 2009).

No presente estudo, os baiacus *Spherooides testudineus* e *S. greeleyi* (Fig. 2) foram escolhidos como espécies-alvo devido a sua ampla distribuição e abundância nos estuários, gamboas e praias adjacentes ao Complexo Estuarino de Paranaguá (CORRÊA, 1987; CORRÊA 2001; FAVARO, *et al.* 2009; IGNACIO; SPACH 2009).

No litoral do Paraná, os seguintes aspectos já foram investigados em *S. testudineus* e *S. greeleyi*: ecologia trófica (CHIAVERINI, 2008), crescimento (POSSATO, 2006) e peso (FERRONATO, 2006), reprodução (ROCHA, *et al.* 2002 e SCHULTZ, *et al.* 2002), capacidade osmorreguladora (PRODOCIMO & FREIRE, 2001; PRODOCIMO & FREIRE, 2006a; PRODOCIMO; FREIRE, 2006b e PRODOCIMO, *et al.* 2008), citogenética molecular (NOLETO, *et al.* 2007 e NOLETO, *et al.* 2009). A toxicidade dos tecidos do *S. testudineus* foi avaliada por CORRÊA, *et al.* 1990 e os efeitos de concentrações sub-letais do hidrocarbonetos poliaromáticos (benzeno, tolueno e xileno) em marcadores histológicos (RIBEIRO, 2007). Porém a ocorrência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares nestas espécies ainda são desconhecidas no litoral do Paraná.

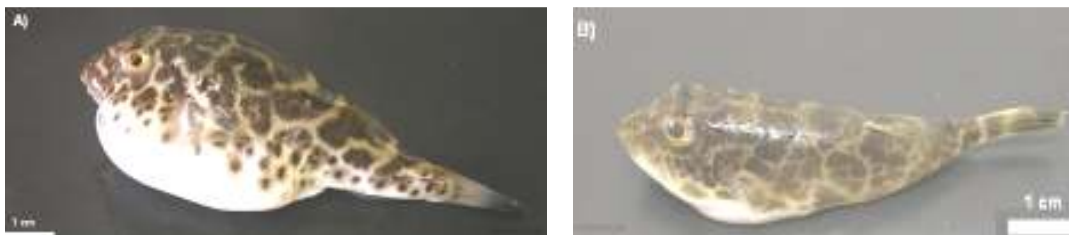


Figura 2. A) *Spherooides testudineus* e B) *Spherooides greeleyi* (fotos do autor).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar e quantificar a ocorrência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares nas hemácias de indivíduos das espécies *Spherooides testudineus* (Linnaeus, 1758) e *Spherooides greeleyi* (Gilbert, 1900) e quando possível correlacionar com as variáveis biométricas e parâmetros ambientais.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar a ocorrência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em contagens de 1000 células sanguíneas para cada exemplar de *Spherooides testudineus* e *Spherooides greeleyi*;
- Comparar a ocorrência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares entre espécies (residente e visitante), classes de tamanho, sexos, fases de maturação gonadal e estações do ano;
- Observar possíveis relações entre a ocorrência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares com o índice hepatossomático, e/ou com fatores ambientais (salinidade, temperatura e pH).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O Complexo Estuarino de Paranaguá, delimitado pelas coordenadas 25° 15'-25° 35'S e 48° 20'- 48 45'W (Fig. 3), com 601 km² de extensão, corresponde ao maior complexo estuarino da costa sul do Brasil (BIGARELLA 1978). Possui dois eixos principais de orientação: o eixo norte-sul que compreende as Baías de Guaraqueçaba e Laranjeiras com respectivamente, 13 e 30 km de extensão, e o leste-oeste formado pelas Baías de Paranaguá e

Antonina, com extensão estimada de 50 km e largura máxima de 7 km (KNOPPERS *et al.* 1987).

As vias de interligação mais importantes do estuário com a plataforma continental são o Canal da Galheta, constantemente dragado para o acesso dos navios ao porto de Paranaguá, e o Canal Sueste formado pela união dos canais Norte e Sueste provenientes do mar aberto (KNOPPERS *et al.* 1987).

Estudos pretéritos dividiram a Baía de Paranaguá em dois setores, sendo o setor oriental situado entre as barras de acesso e a cidade de Paranaguá considerado euhalino ou polihalino é uma extensão do ambiente nerítico adjacente. E o setor ocidental mais interno com características mesohalinas e oligohalinas, sem estratificação vertical no inverno e estratificação parcial à elevada dependendo da precipitação no verão, que compreende a área, sob forte influência antrópica, que se estende da cidade de Paranaguá até a região denominada de Baía de Antonina (Fig.3) (BIGARELLA 1978 e KNOPPERS *et al.* 1987).

A área de estudo está localizada na Gamboa do Perequê pertencente ao Parque Natural Municipal do Manguezal do Rio Perequê, no Balneário de Pontal do Sul (25°34'25" S e 48°21'08" W) (Fig.3). O Parque apresenta uma área de 21,89 ha circundada por 184 construções entre empresas, comércios, instituições públicas e residências de moradores e veranistas (SOARES, 2002).

A Gamboa do Perequê possui 2,6 km de extensão desembocando no Canal do Departamento Nacional de Obras e Saneamento (DNOS) (Fig. 4 B), drenando as áreas adjacentes do manguezal que está colonizado por *Laguncularia racemosa*, *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* (LANA *et al.* 1989).

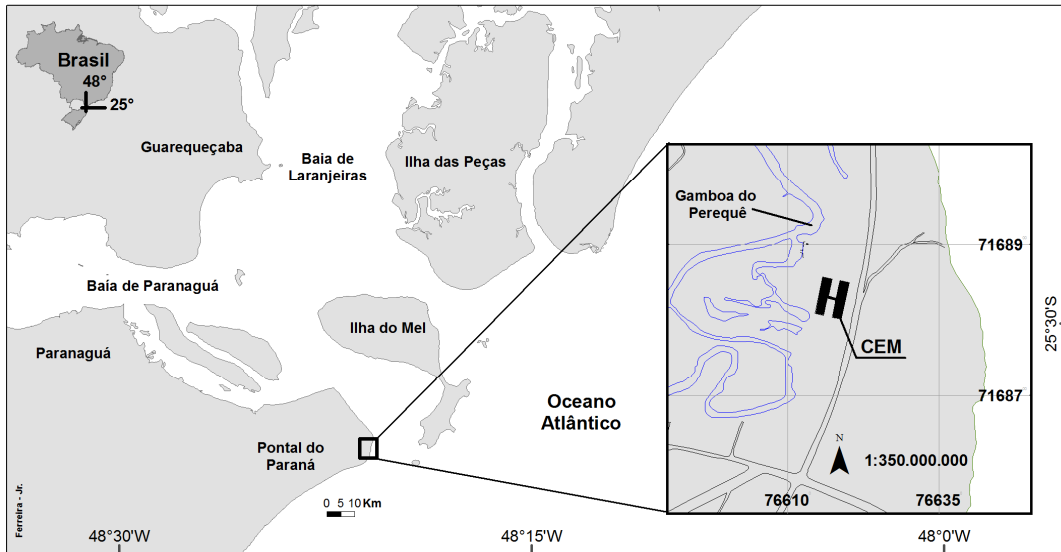


Figura 3. Mapa do Complexo Estuarino de Paranaguá, mostrando no detalhe a Gamboa do Perequê e o Centro de Estudos do Mar (CEM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O regime de maré na gamboa é semi-diurno, com tempo de enchente de 5,2 h e 7,2 h de vazante, que apresenta maior intensidade de corrente ($0,30$ a $0,45 \text{ ms}^{-1}$) em função do contorno do canal. A influência da maré interfere na profundidade, na salinidade, na temperatura e no material particulado em suspensão que variam respectivamente entre 50 e 200 cm, 10 a 30, 18 a 20° C e 6 a 28 mg/L (MARONE et al., 1997).

O fluxo de água doce na Gamboa apresenta uma sazonalidade marcante. No verão, devido a chuvas intensas, exporta água doce oriunda da drenagem dos solos circundantes para o mar adjacente, e no inverno sofre influencia do lençol freático que fica mais próximo da superfície (MARONE et al., 1997).



Figura 4. A) Desembocadura do Canal do DNOS e B) Desembocadura do Rio Perequê.

A Gamboa já foi estudada segundo os aspectos: ictiológicos (BARLETTA *et al.*, 1990, DELICADO 2003; SILVA, 2004; POSSATTO, 2006; FERRONATO, 2006; PESSERL, 2007 e CHIAVERINI 2008), bentônicos (LANA *et al.*, 1989; BLANKENSTEYN, 1994, NETTO; LANA, 1994; SERRAFINI, 2001), planctológicos (KOLM; ANDREATTA, 2003; SIQUEIRA *et al.*, 2009), hidrológicos (MARONE; CAMARGO, 1994; MARONE *et al.*, 1997) e ornitológicos (RECHETELO, 2009).

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas mensalmente entre julho de 2009 e junho de 2010. As amostragens foram realizadas com auxílio de uma rede “Fyke”, com 30 m de comprimento por 1,5 m de largura e 8 e 10 mm entre nós opostos no saco e nos braços, respectivamente (Fig 5).



Figura 5. Ilustração e foto da rede “Fyke” fixada na gamboa.

A rede foi montada sempre na maré vazante de quadratura nas coordenadas geográficas gerais 25°34'22.9" S e 48°21'0,6" W. A rede permaneceu imersa por 12 horas, com despescas a cada 4 horas, sendo 3 amostras por coleta totalizando 36 no período amostrado.

No início de cada despescas foram observados os parâmetros abióticos (transparência da água - através da leitura do disco de Secchi, a temperatura do ar e da água com - termômetro químico, escala 1/100°C). O registro da salinidade e do pH foi realizado no laboratório com auxílio, respectivamente, de refratômetro (ATAGO, escala 1/40‰) e pHmetro digital (Digimed).

3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após as despesas, os peixes foram transportados para o Laboratório de Ictiologia do Centro de Estudos do Mar, onde foram acondicionados em um aquário, permanecendo por no máximo 30 minutos em água da gamboa sob aeração constante.

Para a realização dos esfregaços, foi coletada uma gota de sangue de cada peixe com seringas previamente preparadas com EDTA 0,3 mM. Após o esfregaço, as lâminas permaneceram secando em temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, foram fixadas por 20 minutos com metanol (100%), lavadas com água destilada e coradas com Giemsa 5% por 40 minutos (GRISOLIA, 2002; VANZELLA *et al.* 2007).

Para cada lâmina, foram contadas 1000 células com o auxílio do microscópio ótico utilizando óleo de imersão no aumento de 100 vezes (AL-SABTI *et al.* 1995), quantificando-se os micronúcleos e as alterações morfológicas nucleares. Os micronúcleos foram classificados conforme CAVAS *et al.* (2003b) e as alterações morfológicas nucleares segundo CAVAS *et al.* (2003a) (Fig 6).

Para a determinação da frequência de ocorrência dos micronúcleos (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN), foram calculada a frequência percentual de ocorrência.

Os exemplares, após a punção cardíaca, foram acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados com hora e data da coleta, e congelados.

Todos os exemplares foram identificados até nível específico conforme Menezes & Figueiredo (1980), mensurados (comprimento total – CT e padrão – CP, em cm), pesados (peso do corpo – Pc, em g) e separados por classe de tamanho. Após a dissecação foi realizada a identificação macroscópica do sexo e do estágio de maturação gonadal conforme Vazzoler (1996). Foram pesados (g), ainda, o fígado (Pf) e as gônadas (Pg) e os resultados foram utilizados para calcular a Relação Gonadossomática, conforme descrito por Vazzoler (1996), e o Índice Hepatossomático, segundo Le Cren (1951).

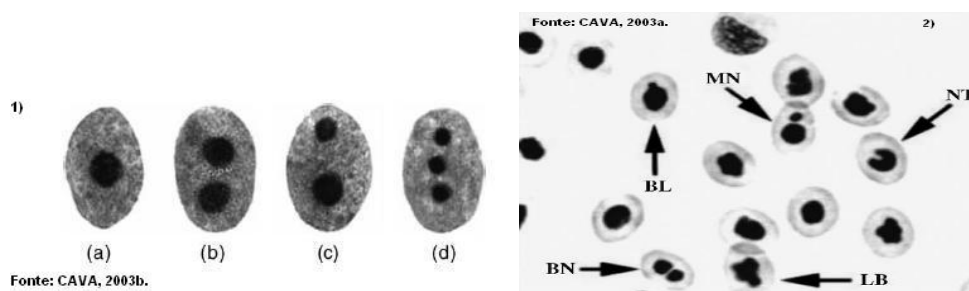


Figura 6. 1) Tipos de núcleos a) Célula Mononucleada, b) Micronúcleo Homórfico, c) Micronúcleo Heteromórfico e d) Célula Tri-nucleada; 2) Tipos de alterações morfológicas nucleares MN) Micronúcleo, NT) com entalhe (Notched), BL) Bolha “Blebbbed”, LB) Lobado (Lobed) e BN) Binucleado.

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística utilizada nas comparações biométricas (variáveis paramétricas) entre as estações e espécies foi a análise de variância (ANOVA). Na avaliação da interação entre micronúcleos e as alterações morfológicas nucleares e os parâmetros ambientais, espécies e biometria dos indivíduos, foi utilizado à matriz de correlação para as variáveis paramétricas. Para as não paramétricas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e Mann - Whitney. Os processos analíticos foram realizados no programa Statistica 7.0 (Statsoft, Inc. 2004).

4. RESULTADOS

4.1 INFLUÊNCIA ANTRÓPICA

Durante o percurso da Gamboa, com auxílio de canoa em maré de quadratura, foram observados 18 pontos despejando efluentes diretamente na gamboa (Fig. 7).



Figura 7. Fotos de alguns pontos de escoamento de efluentes domésticos diretamente na Gamboa (do autor).

4.2 PARÂMETROS AMBIENTAIS

A temperatura do ar apresentou maiores valores no verão com média (\pm desvio padrão) de $28,57\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($s = \pm 4,89$), com máxima e mínima respectivamente de 24°C e $38\text{ }^{\circ}\text{C}$. No inverno a média foi de $19,33^{\circ}\text{C}$ ($s = \pm 2,50$). A temperatura da água apresentou o mesmo padrão observado para a do ar (Fig. 8).

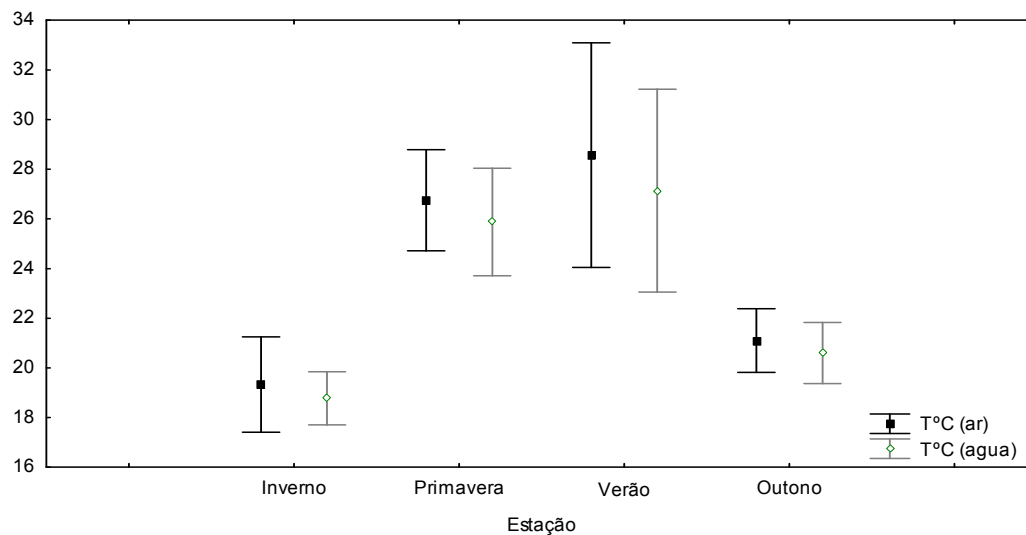


Figura 8. Temperaturas médias do ar e da água.

Foram observados maiores valores de salinidade na primavera com a média de $18,5$ ($s = \pm 3,70$) e os menores no verão cuja média foi de $11,14$ ($s = \pm$

7,33). A maior média de pH foi registrada na primavera 7,26 ($s= \pm 0,24$), entretanto a menor foi observada no inverno com 6,80 ($s= \pm 0,18$) (Fig. 9).

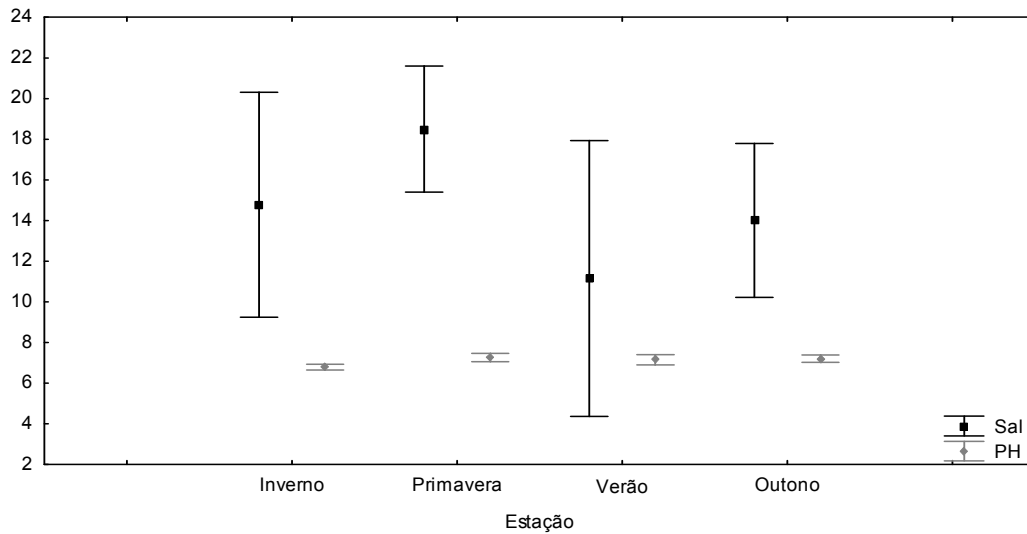


Figura 9. Médias e desvios padrões de salinidade e pH por épocas do ano observadas na Gamboa do Perequê.

A maior profundidade média foi 1,19 ($s= \pm 0,28$) cm observada no outono e a menor foi observada na primavera com 0,99 ($s= \pm 0,25$) cm. A transparência média da água apresentou maior valor no inverno com 0,82 ($s= \pm 0,10$) e a menor no outono com 0,43 ($s= \pm 0,24$) cm (Fig. 10).

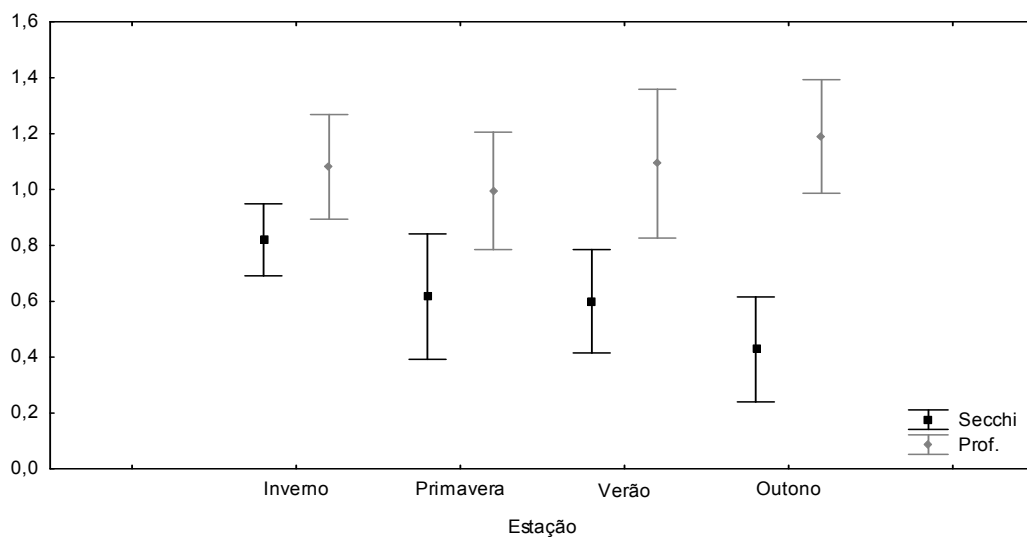


Figura 10. Médias e desvios padrões de profundidade e transparência observados na Gamboa do Perequê.

4.3 BIOMETRIA E PESAGEM de *Sphoeroides testudineus* e *S. greeleyi*.

Foi coletado um total de 256 exemplares, dos quais 235 eram *Sphoeroides testudineus* e 21 *Sphoeroides greeleyi*. Na Tabela 1 as médias de Comprimento Total (CT), Comprimento Padrão (CP) e peso do corpo para as duas espécies nas diferentes estações do ano.

TABELA1. Médias e desvios padrões de CT (cm), CP (cm) e peso do corpo (Pc) (g), observados nas diferentes estações do ano para *S. testudineus* e *S. greeleyi* na Gamboa do Perequê.

<i>S. testudineus</i>				
Época	Inverno	Primavera	Verão	Outono
(n)	(59)	(92)	(35)	(49)
CT	7,33 (±1,14)	8,18 (±1,90)	5,96 (± 2,8)	8,82 (± 3,09)
CP	5,30(± 0,87)	6,50 (±1,6)	4,77(± 2,3)	7,28(± 2,58)
Pc	8,29(± 3,91)	12,90(± 10,6)	5,89(± 8,24)	15,82(± 21,22)
<i>S. greeleyi</i>				
Época	Inverno	Primavera	Outono	
(n)	(12)	(1)	(8)	
CT	9,57(± 1,34)	9,1 (n.a.)	8,03(± 0,70)	
CP	7,04(± 1,03)	7,3(n.a.)	6,64(± 0,61)	
Pc	18,92(± 0,65)	13,03(n.a.)	6,80(± 2,02)	

Os maiores exemplares de *S. testudineus* ocorreram no outono, concordando com as maiores médias de peso do corpo (Pc) (Fig.11).

A Tabela 2 resume os resultados da ANOVA das variáveis biométricas e gravimétricas das espécies e estações do ano. Foram significativas ($\alpha = 0,05$) as diferenças observadas entre todas as médias das variáveis de *S.*

testudineus. Para *S. greeleyi* somente a média do CP não diferiu significativamente nas diferentes épocas do ano, sendo excluída da análise a primavera.

TABELA 2. Valores de F e p da ANOVA resultante da comparação das médias de comprimento total (CT), comprimento padrão (CP) e peso do corpo (Pc) pelas estações do ano. Valores de p inferiores a 0,05 significativos.

Estações	<i>S. testudineus</i>		<i>S. greeleyi</i>	
	F	p	F	p
CT	13,29	0,000*	4,36	0,008*
CP	18,05	0,000*	0,59	0,333
Pc	6,20	0,000*	7,45	0,001*

Na Figura 11, estão representadas as médias de CT (cm), CP (cm) e peso(g) com intervalo de confiança de 95%. Os exemplares de *S. testudineus* apresentaram comprimentos (CT e CP) e peso significativamente maiores na primavera e outono. Por sua vez *S. greeleyi*, dentre as estações em que foi capturado, apresentou maior comprimento (CT) e peso no inverno (Fig.11).

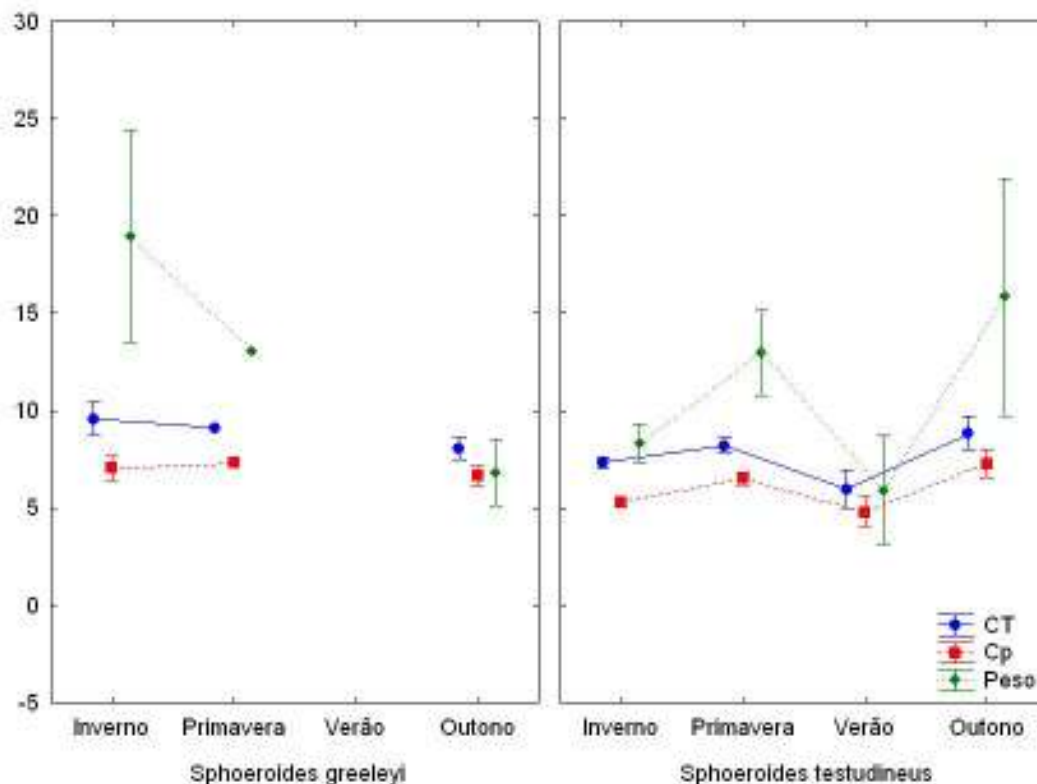


Figura 11. Médias e intervalo de confiança (ic) de 95% das estimativas para as variáveis biométricas, comprimento total (CT em cm), comprimento padrão (CP em cm) e peso (em g) de *S. testudineus* e *S. greeleyi*

4.4 ESTRUTURA SEXUAL DE *Sphaeroides testudineus* e *S. greeleyi*.

Na tabela 3 as frequências de machos e fêmeas, juntamente com as proporções, nas diferentes estações do ano analisadas excluindo os exemplares de sexo indeterminado.

TABELA 3. Frequência de machos e fêmeas de *S. testudineus* e *S. greeleyi* capturados por diferentes épocas do ano na Gamboa do Perequê, sendo “x” o número de exemplares machos e fêmeas excluindo os exemplares de sexo indeterminado.

Espécies	<i>S. testudineus</i>			<i>S. greeleyi</i>		
	x	Macho	Fêmea	Prop. F/M	Macho	Fêmea

Inverno	45	6	39	1:0,15	6	6	1:1
Primavera	60	44	16	1:2,75	0	1	1:0
Verão	2	2	0	0:3	0	0	n.a.
Outono	35	4	10	1:0,4	1	7	1:0,14

Na primavera ocorreu uma maior frequência de machos para *S. testudineus* e no inverno para o *S. greeleyi*, sendo para o *S. testudineus* uma maior ocorrência de fêmeas durante o inverno diferindo do *S. greeleyi* que as fêmeas foram mais abundantes no outono.

Os exemplares de sexo indeterminado para o *S. testudineus* foram mais abundantes no outono sendo representada por 35 indivíduos, contudo para o *S. greeleyi* não foi capturado indivíduos de sexo indeterminado.

As diferenças observadas nas frequências de exemplares machos, fêmeas e indeterminados por estação do ano foram significativas para *S. testudineus* ($\chi^2=54,75$; $p=0,000$) e para o *S. greeleyi* foi retirada a primavera da análise devido ao reduzido número de exemplares ($\chi^2= 0,00$; $p=1$).

A maturação gonadal de ambas as espécies pelas estações está descrita na tabela 4.

TABELA 4. Estágios de maturação gonadal de *Sphoeroides testudineus* e *S. greeleyi* em cada estação do ano (onde A imaturos, B em maturação, C maduro, D desovado e E em descanso).

		<i>S. testudineus</i>			
<i>Estação do ano</i>		<i>Inverno</i>	<i>Primavera</i>	<i>Verão</i>	<i>Outono</i>
<i>Estágio de maturação</i>					
A		14	14	0	1
B		26	35	0	11
C		2	9	3	1
D		2	1	0	1
E		1	1	0	0
		<i>S. greeleyi</i>			
<i>Estação do ano</i>		<i>Inverno</i>	<i>Primavera</i>	<i>Verão</i>	<i>Outono</i>
<i>Estágio de maturação</i>					
A		0	0	0	0
B		6	0	0	8

C	5	1	0	0
D	1	0	0	0
E	0	0	0	0

As diferenças observadas nas freqüências dos estágios de maturação gonadal por estações do ano foram significativas para *S. testudineus* ($\chi^2=25,88$; $p=0,000$) e *S. greeleyi* ($\chi^2=5,71$; $p=0,016$) foi retirada da análise a primavera. O maior número de exemplares em maturação (B) ocorreu no inverno e na primavera para *S. testudineus* e no outono para *S. greeleyi*.

4.5 ÍNDICE GONADO E HEPATOSSOMÁTICO DOS *Sphoeroides testudineus* e *S. greeleyi*.

A tabela 5 sumariza as médias e desvios padrões das estimativas dos índices gonadossomático e hepatossomáticos. O índice gonadossomático para *S. testudineus* apresentou maior média na primavera com 0,54 ($\pm 0,14$) ocorrendo o mesmo para *S. greeleyi* no outono com $10,63 \pm 0,16$. O índice hepatossomático *S. testudineus* foi maior no outono 4,13 ($\pm 2,45$), entretanto para *S. greeleyi* a maior média ocorreu no inverno com 7,9 ($\pm 2,22$) (Fig.12).

As diferenças observadas nos IGS e IHS por estações do ano foram significativas respectivamente para o *S. testudineus* ($F=3,97$; $p=0,008$) e ($F=14,12$; $p=0,000$) e para a realização da ANOVA foi excluída a primavera do *S. greeleyi* ($F=6,21$; $p=0,022$) e ($F=17,68$; $p=0,000$).

TABELA 5. Médias e desvios padrões dos Índices gonadal (IGS) e hepatossomático (IHS) para o *S. testudineus* e *S. greeleyi* nas estações do ano, onde “x” equivale ao número de exemplares.

Época (x)	<i>S. testudineus</i>			
	Inverno (59)	Primavera (92)	Verão (35)	Outono (49)

IGS	0,12 ($\pm 0,15$)	0,54 ($\pm 0,14$)	0,04 ($\pm 0,10$)	0,17 ($\pm 0,18$)
IHS	3,89 ($\pm 0,95$)	3,64 ($\pm 2,21$)	1,62 ($\pm 1,25$)	4,13 ($\pm 2,45$)
<i>S. greeleyi</i>				
Época (x)	Inverno (12)	Primavera (1)	Outono (8)	
IGS	1,31 ($\pm 0,75$)	4,05 ($\pm 0,0$)	10,63 ($\pm 0,16$)	
IHS	7,9 ($\pm 2,22$)	3,79 ($\pm 0,0$)	4,27 ($\pm 1,20$)	

Devido à significância da ANOVA foi realizado o teste LSD para o IGS de *S. testudineus* onde a primavera foi a responsável pela variação (primavera/inverno $p=0,006$, primavera/verão $p=0,007$ e primavera/outono $p=0,024$). Já para o IHS o verão foi a causa da variação (verão/inverno $p=0,000$, primavera/verão $p=0,000$ e verão/outono $p=0,000$).

Para o IGS dos *S. greeleyi*, todas as interações entre estações foram significantes, porém para o IHS foi significativa outono/inverno ($p=0,000$).

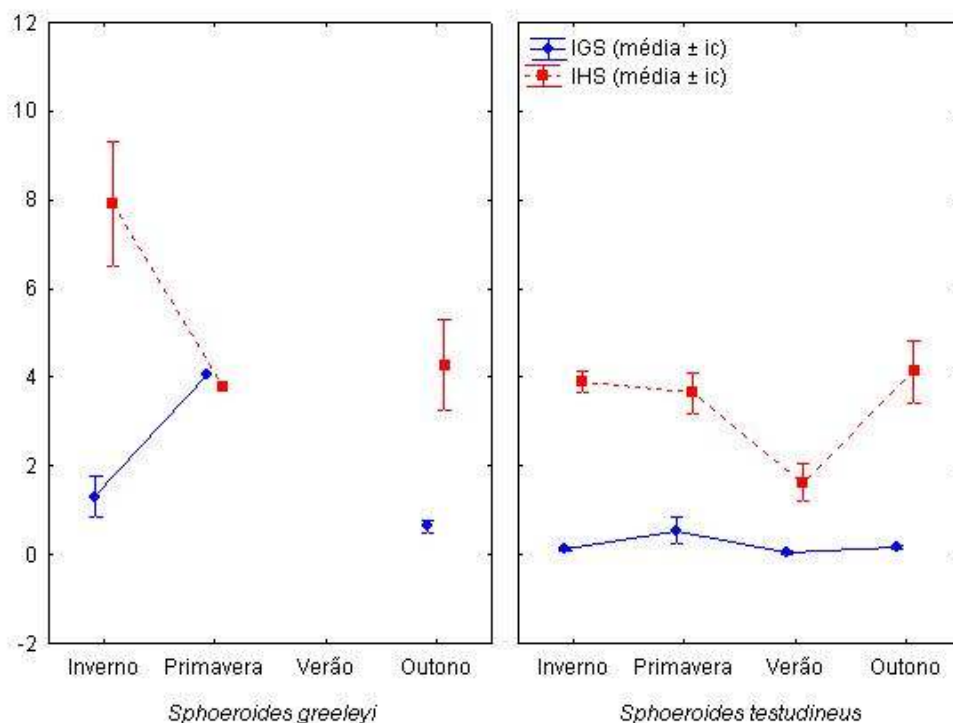


Figura 12. Médias de índice gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) de *S. testudineus* e *S. greeleyi* nas diferentes estações do ano.

4.6 MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLOGICAS NUCLEARES DOS ERITROCITOS EM *Spherooides testudineus* e *S. greeleyi*.

Foram contadas 256.000 células, das quais 235.000 eram de *Spherooides testudineus* e 21.000 de *Spherooides greeleyi*.

Foram significativamente diferentes somente as frequências de MN e AMN nas diferentes estações do ano para os *S. testudineus* o que não ocorreu para o *S. greeleyi* (Tab.6). Em *S. testudineus*, a maior frequência de MN foi observada no outono com valores médios de 0,04 (\pm 0,082)% e a menor no verão com valores médios de 0,01 (\pm 0,02)%. O mesmo padrão foi observado para as AMN as quais apresentaram maiores médias no outono 9,15 (\pm 7,22)% e menores no verão com 3,84 (\pm 3,73)%.

S. greeleyi apresentou as maiores médias de MN no inverno 0,04 (\pm 0,11)% não ocorrendo na primavera, já as AMN tiveram maiores médias no outono 10,51 (\pm 6,04) % como representado na tabela 6 e na figura 13.

TABELA 6. Média e desvio padrão dos micronúcleos e alterações morfológicas nucleares para os *S. testudineus* e *S. greeleyi* nas estações do ano, onde “x” equivale ao número de micronúcleos (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN).

	<i>S. testudineus</i>			
	(x)	MN (%)	(n)	AMN(%)
Inverno	10	0,02(\pm 0,06)	387	6,43 (\pm 5,71)
Primavera	16	0,02(\pm 0,05)	7158	7,78 (\pm 6,81)
Verão	2	0,01(\pm 0,02)	1239	3,84 (\pm 3,73)
Outono	21	0,04(\pm 0,08)	4089	9,15 (\pm 7,22)
	<i>S. greeleyi</i>			
	(x)	MN(%)	(n)	AMN(%)

Inverno	5	0,04 (± 0,11)	267	2,38 (± 2,21)
Primavera	0	n.a	56	5,60 (± 0,0)
Outono	3	0,03 (± 0,07)	1049	10,51(± 6,04)

A comparação interespecífica das diferenças observadas nas frequências de MN (Mann - Whitney U= 2315; p=0,431) e AMN (Mann - Whitney U= 2075; p=0,227) não foi significativa. Na tabela 7 os resultados do teste de Kruskal-Wallis das comparações intra-específica das possíveis associações com as frequências de MN e AMN.

TABELA 7. Valores de H e p de Kruskal-Wallis resultantes da comparação intraespecífica das frequências de MN e AMN por estações do ano, sexo e maturação gonadal. Valores de p inferiores a 0,05 significativos

	<i>S. testudineus</i>				<i>S. greeleyi</i>			
	MN		AMN		MN		AMN	
	H	p	H	p	H	p	H	p
Estações	10,38	0,02*	18,34	0,00*	0,39	0,83	11,31	0,00*
Sexo	1,03	0,60	3,77	0,15	0,24	0,62	3,07	0,08
Maturação	4,21	0,38	9,04	0,06	0,24	0,89	0,00	1,00

Para a identificação de uma possível associação das variáveis biométricas com os MN e as AMN foi obtida uma matriz de correlação linear de Pearson para cada espécie, sendo a mesma correlação realizada entre os MN e AMN e os parâmetros ambientais como demonstrado na tabela 8.

Tabela 8. Matriz de correlação linear de Pearson das variáveis biométricas e ambientais estando correlacionadas com os MN e as AMN, considerando valores significativos menores que 0,05 *.

<i>Variáveis biométricas</i>	<i>S. testudineus</i>					
	MN			AMN		
	r	r ²	p	r	r ²	p

CT	0,12	0,014	0,060	0,37	0,013	0,000*
CP	0,14	0,019	0,030*	0,37	0,013	0,000*
Pc	0,16	0,02	0,010*	0,38	0,14	0,000*
IGS	0,08	0,06	0,209	0,17	0,03	0,007*
IHS	-0,04	0,017	0,520	0,17	0,03	0,006*
Parâmetros Ambientais						
Temperatura água	- 0,14	0,020	0,026*	-0,10	0,011	0,108
Salinidade	0,11	0,013	0,07	0,24	0,06	0,0001*
pH	0,09	0,008	0,15	0,09	0,009	0,14
<i>S. greeleyi</i>						
<i>Variáveis biométricas</i>	<i>MN</i>			<i>AMN</i>		
	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i>
CT	-0,09	0,009	0,68	-0,39	0,15	0,08
CP	-0,13	0,017	0,57	-0,16	0,027	0,48
Pc	-0,06	0,004	0,77	-0,47	0,22	0,036*
IGS	0,108	0,011	0,64	-0,44	0,197	0,049*
IHS	-0,18	0,03	0,43	-0,32	0,106	0,16
Parâmetros Ambientais						
Temperatura água	-0,18	0,03	0,43	0,49	0,24	0,025*
Salinidade	0,046	0,002	0,84	0,47	0,22	0,035*
pH	-0,04	0,002	0,84	0,7	0,5	0,0004*

A partir da correlação de Pearson (tabela 8) pode-se observar valores significativos para o *S. testudineus* entre a correlação de AMN e todas as variáveis biométricas apesar dos baixos valores de r^2 , ocorreu também significância entre a salinidade e AMN. Contudo a significância da correlação entre as variáveis biométricas e o MN só foi detectada para o CP e o PC ocorrendo também com a temperatura da água.

A correlação realizada entre as variáveis biométricas e o MN para o *S. greeleyi* não apresentou significância em nenhuma combinação. Porém entre as variáveis biométricas e as AMN não foram significantes apenas CT e CP, o mesmo foi realizado com os parâmetros ambientais e as AMN os quais todas as combinações foram significativas.

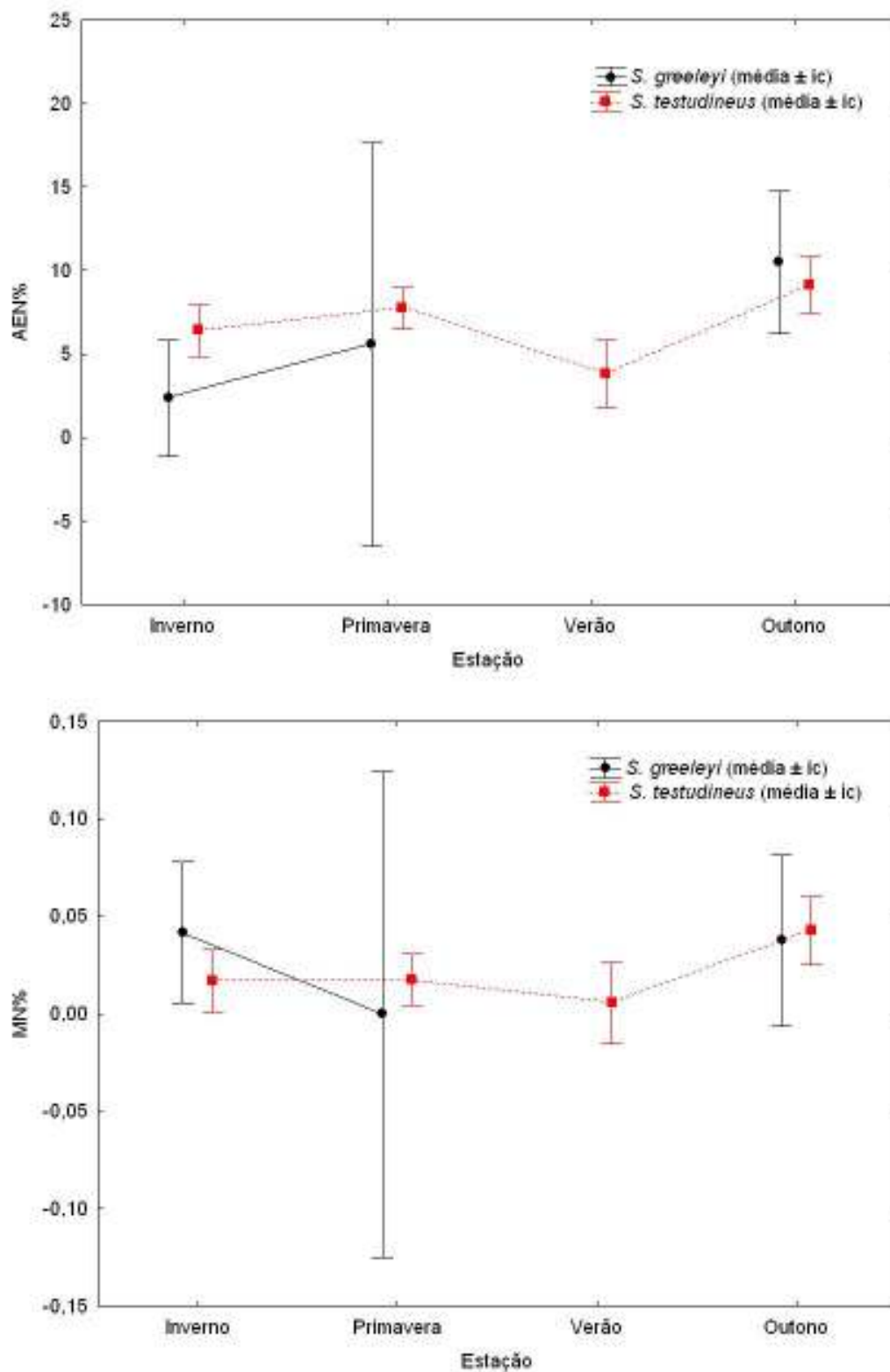


Figura 13. Médias e intervalo de confiança (95%) das estimativas de micronúcleos (MN em %) e alterações morfológicas nucleares (AMN em %)

observadas em células sanguíneas de *S. testudineus* e *S. greeleyi* em diferentes estações do ano.

5. DISCUSSÃO

SIQUEIRA, *et al.* (2009) observaram elevadas taxas de coliformes fecais no verão de 2004 na gamboa do Perequê, os quais podem ser originados de descarte de efluentes doméstico sem tratamento na gamboa. A descrição dos efluentes doméstico realizada por RAJAN *et al.* (1995) detecta a presença de metais pesados neste tipo de efluente, sendo os metais pesados responsáveis pela formação de MN e AMN pisceos (CESTARI, *et al.* 2004).

Segundo POSSATO (2006), *S. testudineus* utiliza a Gamboa do Perequê como área de crescimento, devido a isso no presente trabalho foi capturada uma maior quantidade de indivíduos entre 6 e 8 cm de comprimento total e reduzido número de exemplares maiores que 14 cm de comprimento total. Já *S. greeleyi* foi considerado por FERRONATO (2006) não residente da Gamboa do Perequê, utilizando esporadicamente a área, o que pode justificar o reduzido número nas capturas.

O comportamento de *S. testudineus* foi analisado por MACDONALD *et al.* (2009) em manguezais hondurenhos através do censo visual o qual determinou que o baiacu pintado permanece 61% do tempo descansando no sedimento, 32% nadando e 7% se alimentando. A partir deste trabalho pode-se supor que a maior frequência de MN e AMN nessa espécie em relação ao *S. greeleyi* se deve a baixa mobilidade do *S. testudineus* demonstrando uma íntima relação com o sedimento, o qual aprisiona contaminante (ONOFRE, *et al.* 2007). Outro fator relevante é o número de indivíduos capturados do *S. greeleyi* que pode ter sido determinante para a referida diferença na frequência de MN e AMN entre as espécies.

A capacidade osmorreguladora de *S. testudineus* e *S. greeleyi* determina o tempo que cada espécie consegue se manter em ambientes hiperhalinos ou hipohalinos. *S. testudineus* apresenta melhor osmorregulação, suportando as variações da salinidade, porém *S. greeleyi* mostra-se mais sensível a essas variações migrando para ambientes mais salinos na baixa-mar (PRODOCIMO e FREIRE, 2006; PRODOCIMO, *et al.* 2008). Devido à osmorregulação, *S.*

testudineus esteve presente por mais tempo na gamboa do Perequê e ficou mais exposto à contaminação do ambiente pelos efluentes domésticos despejados que podem estar influenciando no aparecimento de MN e AMN.

O período reprodutivo de ambas as espécies foi verificado para a Gamboa do Baguaçu próximo a Paranaguá onde o *S. testudineus* se reproduz entre setembro e janeiro (ROCHA, *et al.* 2002), já para o *S. greeleyi* o mesmo ocorre entre setembro e dezembro (SCHULTZ, *et al.* 2002). Na Gamboa do Perequê, foi identificado o período reprodutivo pelo maior Índice gonadossomático na primavera para o *S. testudineus* e no outono para o *S. greeleyi*.

VAZZOLER (1996) relata a transferência das reservas energéticas acumulada no fígado e nos músculos para suprir o desenvolvimento das gônadas que culminará na desova. Devido a isso, o menor valor de IHS tenderá a coincidir com os maiores IGS o que foi encontrado no presente trabalho apenas para o *S. greeleyi* na primavera. Contudo, nada se pode afirmar sobre a reprodução desta espécie na área em função do reduzido número de exemplares capturados.

O fígado é o responsável pelo metabolismo dos contaminantes no organismo dos peixes, alguns contaminantes não são biotransformados pelo fígado gerando um acúmulo de energia no fígado na tentativa de metabolizar esse xenobiótico (OOST, *et al.* 2003). Caso, esse acúmulo de energia reflita no IHS, podemos dizer que no outono ocorreram maiores concentrações de contaminante na Gamboa devido a maiores médias do IHS nesse período coincidindo com a maior frequência de AMN para ambas as espécies.

Segundo PELLACANI (*et al.*, 2006), a redução da temperatura reflete na capacidade dos peixes de sintetizar as proteínas reduzindo o sistema de reparos no DNA. Devido essa conclusão pode-se supor que as maiores frequências de MN no inverno para o *S. greeleyi* e no outono para o *S. testudineus* pode ter sido causada pela deficiência dos organismos em reparar os danos no DNA.

No presente trabalho não foi constatada relação entre o sexo dos exemplares e a quantidade de MN e AMN, porém ela foi identificada na espécie *Pseudopleuronectes americanus*, cujos machos apresentaram elevadas taxas de MN em relação às fêmeas sendo mais evidente essa correlação na primavera e no inverno (HUGHES and HEBERT, 1991). MALLICK e KHUDA-

BUKSHH (2003) descreveram a ocorrência de MN e AMN em três estuários da Índia coletando sete espécies diferentes de peixes estuarinos, sendo que todas as espécies demonstraram frequência similar de MN e AMN em ambos os sexos.

Segundo CHIAVERINI (2008), *Sphoeroides testudineus* e *S. greeleyi* podem ser considerados animais carnívoros e de hábitos bentofágicos, alimentando-se principalmente de crustáceos e moluscos que sabidamente são bioacumuladores de metais pesados. GRISOLIA *et al.* (2009) observaram, na traíra (*Hoplias malabaricus*) e no tucunaré (*Cichla temesis*), que são considerados piscívoros, elevadas taxas de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares. As taxas de MN e AMN podem ser influenciadas pelo nível trófico do organismo teste, sendo mais elevadas em níveis tróficos superiores por consequência da bioacumulação ao longo da cadeia trófica.

A ocorrência de MN para o *S. testudineus* foi maior no outono diferindo do *S. greeleyi* que demonstrou elevadas taxas no inverno, levando em consideração o reduzido número de indivíduos. AMADO *et al.* (2006) observaram que a presença de MN na espécie *Micropogonias furnieri*, em um local poluído da Lagoa dos Patos, foi maior no inverno em relação ao mesmo local no verão. Entretanto CAVAS and ERGENE-GOZUKARA (2005) trabalhando com a espécie *Mugil cephalus* em ambiente estuarino poluído da Turquia encontrou maior frequência de MN nos meses junho, julho e agosto em comparação às outras estações.

As menores ocorrências de MN para o *S. testudineus* no verão pode ter sido causada pela elevada pluviosidade nesta época reduzindo a influência do aporte de efluente doméstico na gamboa.

A partir do presente estudo pode-se concluir que as espécies *S. testudineus* e *S. greeleyi* são bons bioindicadores em ambientes estuarinos, desde que ambos sejam capturados na mesma proporção para facilitar uma comparação entre as taxas de frequências de MN e AMN entre as espécies.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a avaliação de uma possível poluição na Gamboa do Perequê é necessária a análise de MN e AMN juntamente com análises químicas que indiquem a presença de contaminantes nocivos a biota.

Com o presente trabalho não é possível caracterizar uma diferença de frequência de MN e AMN dentro das espécies devido ao reduzido número de captura dos *S. greeleyi*.

Outro fator importante seria a submissão dos *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi* a uma calibração em laboratório dos possíveis níveis de MN e AMN perante diferentes contaminantes. Somente após esse procedimento, acredita-se seria possível afirmar que os resultados do presente trabalho equivalem à influência antrópica ou são naturais para as espécies.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, D.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, S.; KUMAR, R. AND B. KUSHWAHA. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere*, vol. 71, p. 1823–1831, 2008.
- AL-SABTI, K. & METCALFE, D. C. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, vol. 343, p. 121 – 135. 1995.
- AMADO, L.L. ; DA ROSA, C. E.; LEITE, A. M.; MORAES, L.; PIRES, W. V.; PINHO, G. L. L.; MARTINS, C. M. G.; ROBALDO, R. B.; NERY, L. E. M.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, P. E.; GERACITANO, L. A. Biomarkers in croakers (*Micropogonias furnieri*) (Teleostei:Scianidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos lagoon estuary: Evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 52 p.199-206, 2006.
- ARKHIPCHUK, V.V. & GARANKO, N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fishfin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 62, p. 42–52. 2005.
- AYLLOHN, F. & GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and Other Nuclear Lesions as Genotoxicity Indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 49, p. 221-225, 2001.
- BARLETTA, M.; SUNYE, P.S.; DUTKA-GRANELLI, J.A.R. & ABILHÔA, V. Variação nictimeral e estacional da Gamboa do Perequê (Pontal do sul, Paraná, Brasil). Relatório final CONCITEC, p. 19, 1990.
- BARSIENE, J.; DEDONYT, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKENAITE, L AND ODD KETIL ANDERSEN. Investigation of MN and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology* vol. 785, p. 599-610, 2006.
- BIGARELLA, J.J.; BECKER, R.D.; MATOS, D.J.; WERNER, A. A Serra do Mar e a porção oriental do Estado do Paraná – um problema de segurança ambiental e nacional (contribuição à Geografia, Geologia e Ecologia Regional). Curitiba, Governo do Estado do Paraná, Secretaria do Estado do Planejamento/Associação de Defesa e Educação Ambiental (ADEA), p.248,1978.
- BLANKENSTEYN, A. Estrutura e análise experimental do funcionamento das associações da macrofauna bêntica do manguezal e marisma da Gamboa do Perequê, Pontal do Sul, PR. Curitiba, (Tese de Doutorado. Departamento de Zoologia, UFPR), p.169, 1994.
- BOLOGNESI, C.; PERRONE, C.; ROGGEIERI, P.; PAMPAMIN, D.M.; SCIUTTO, A. Assessmente of micronuclei induction in peripheral erythrocytes

of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology* vol. 78, p. 93-98, 2006.

BOLS, N.C.; DAYEH, V.R. ; LEE, L.E.J. and SCHIRMER, K. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 6, p. 53, 2005.

CARVALHO, E. G.; Seibert, C., S.; Coelho, M. S.; Marques, E. E. Parâmetros hematológicos de espécies nativas do rio Tocantins, *Auchenipterus nuchalis*, *Psectrogaster amazonica* e *Squaliforma emarginata* (Teleostei, Ostariophysi). *Acta Scientiarum. Biological Sciences* vol. 31, n. 2, p. 173-177, 2009.

CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, vol. 538, p. 81–91 2003 a.

CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutation Research*, vol. 534, p. 93–99 2003 b.

CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronucleus Test in Fish Cells: A Bioassay for In Situ Monitoring of Genotoxic Pollution in the Marine Environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 46, p.64-70, 2005.

CESTARI, M. M. ; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; COSTA, J. R. M. A; PELLETIER, E.; FERRARO, M.V.M. ; MANTOVANI, M. S. and FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 27, p. 270-274, 2004.

CHIAVERINI, A.P. Ecologia trófica de *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758) e *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert, 1900) da Gamboa do Perequê, Pontal do Sul, Paraná, Brasil. Dissertação de Mestrado. – Curitiba – PR – 54p. 2008.

CORRÊA, M. F. M. Ictiofauna da Baía de Paranaguá e Adjacências (Litoral do Estado do Paraná – Brasil). Levantamento e Produtividade. Tese (Mestrado em Zoologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba p. 265-269, 1987.

CORRÊA, M. F. M.; SILVA, L. R. da; KONOLSAISEN, J.F.; ASSANUMA, M. H.; ABILHOA, V. Determinação da toxicidade oral do baiacu pintado, *Sphoeroides testudineus* (Osteichthyes-Tetraodontiformes) e sintomatologia da intoxicação em camundongos (*Mus musculus*) e cobaias(*Cavia porcellus*) . *Arq. Biol. Technol.*, , v. 35, n. 3, p. 431-447, 1990.

CORRÊA, M. F. M. Ictiofauna da Baía de Guaraqueçaba (Paraná, Brasil). Composição, estrutura e distribuição espacial, variabilidade temporal, e

importância como recurso. Tese (Doutorado em Zoologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba p. 30, 2001.

DELICADO, M. DE F. dos R. Ictiofauna da Gamboa do Perequê. Monografia de Bacharelado, Universidade Federal do Paraná. p. 46, 2003.

EDWARDS, J.W. Metal levels in seston and marine fish flesh near industrial and metropolitan centres in south Australia. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 42 p. 389-396, 2001.

FÁVARO, L. F.; OLIVEIRA, E. C.; VENTURA, A. O. B. and VERANI, N. F. Environmental influences on the spatial and temporal distribution of the puffer fish *Sphoeroides greeleyi* and *Sphoeroides testudineus* in a Brazilian subtropical estuary. *Neotropical Ichthyology*, vol. 7, p. 275-282, 2009.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, vol. 455, p. 81–95, 2000.

FERRONATO, S. S. Dinâmica de crescimento e peso de *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert, 1900) da Gamboa do Perequê (Pontal do Paraná, Paraná, Brasil) Monografia de Bacharelado, curso de Oceanografia da Universidade Federal do Paraná. 32 p., 2006.

FERRARO, M.V. M. ; FENOCCHIO, A. S. ; MANTOVANI, M. S.; . RIBEIRO, C. DE O and CESTARI, M.M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 1, 103-107 (2004)

GRISOLIA, K. C. and Starling, F. L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research*, vol. 491,p. 39–44, 2001.

GRISOLIA, K. C. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research*, vol. 518, p. 145–150, 2002.

GRISOLIA, K. C., RIVERO, C.L.G.; STARLING, F. L.R.M.; DA SILVA I. C.R.; BARBOSA, A.C. AND DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 32, p. 138-143, 2009.

GUILHERME, S.; VALEGA, M.; PEREIRA, M.E.; SANTOS, M.A. and PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , vol. 70, p. 411–421, 2008.

HOSE, J.E.; CROSS, J.N.; SMITH, S. G. and DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off southern California. *Marine Environmental Research*, vol. 22, p. 167-176, 1987.

HUGHES, J. B. and HEBERT, A. T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): Result of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound. Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 20, p. 474-479, 1991

IGNÁCIO, J. M. & SPACH, H. L. Variação entre o dia e a noite nas características da ictiofauna do infralitoral raso do Maciel, Baía de Paranaguá, Paraná. Revista Brasileira de Zoociências, vol. 11, p. 25- 37, 2009.

KOLM, H. E. & ANDRETTA, L. Bacterioplankton in different tides of the Perequê tidal creek, Pontal do Sul, Paraná, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, Brasil, v. 34, p. 97-103, 2003.

KNOPPERS, B. A., BRANDINI, F. P. & THAMM, C. A. Ecological studies in the Bay of Paranaguá. II Some physical and chemical characteristics. Nerítica, Pontal do Sul, v. 2, n. 1, p. 1-36, 1987.

LAEGDSGAARD, P. and JOHNSON, C. Why do juvenile fish utilise mangrove habitats? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, vol. 257 p. 229–253, 2001.

LANA, P. da C.; ALMEIDA, M.V.O.; FREITAS, C.A.F.; COUTO, E. da C.G.; CONTI, L.M.P.; GONZALEZ-PERONTI, A.L.; GILLES, A.G.; LOPES, M.J. de S.; SILVA, M.H.C. da; & PEDROSO, L.A. Estrutura espacial de estruturas macrobênticas sublitorais da Gamboa Perequê (Pontal do Sul, Paraná). Nerítica, vol.4, p. 119-136, 1989.

LE CREN, E. D. The length – weight relationship and season cicle in gonad weight and codition in the perch (*Perca fluviatilis*). Freshwater Biological Association p. 201 – 219, 1951 .

MacDonald, J.A.; Shahrestani, S. and Weis, J.S. Behavior and space utilization of two common fishes within Caribbean mangroves: implications for the protective function of mangrove habitats. Estuarine, Coastal and Shelf Science, vol. 84, p. 195–201, 2009.

MALLICK, P. and KHUDA-BUKHS, A. R. Nuclear anomalies and blood protein variations in fish of the hooghly-matlah river system, India, as an indicator of genotoxicity in water. Bull. Environ. Contam. Toxicol. vol. 70, p. 1071–1082, 2003.

MALLIN, M. A. and LWITES, A. J. The importance of tidal creek ecosystems. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, vol. 298 p. 145-149, 2004.

MCLUSKY, D. S. and ELLIOT, M. 2004. The estuarine ecosystem. Ed. Oxford

MARIA, V.L.; CORREIA, A.C. AND SANTOS, M.A. Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla anguilla* L.) affther short-term exposure to

harbour waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 29 p. 923-929, 2003.

MARONE, E.; MANTOVANELLI, A.; KLENGENFUSS, M. S.; LAUPERT, L. F. C. & PRATA JR., V. P. Transporte de água, sal e material particulado em suspensão e calor na Gamboa do Perequê num evento de maré de sizígia. VII Congresso Latino-Americano sobre Ciências do Mar. Santos, São Paulo. Publicação ACIESP 2: 134-136, 1997.

MARONE, E. & CAMARGO, R. de A maré do Rio Perequê, PR: características e tempos de inundação. III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira. Serra Negra, 1994.

MENEZES N.A. & FIGUEIREDO J.L. Manual de peixe marinhos do sudeste do Brasil Teleostei V. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo p. 71- 75, 2000.

NAGLEKERKEN, I. *Ecological Connectivity among tropical coastal ecosystems*. Ed. Springer. 2009.

NETTO, S.A. & LANA, P.C. Effects of sediment disturbance on the structure of benthic fauna in a subtropical tidal creek of southeastern Brazil. *Marine Ecology Progress Series*, vol. 106, p. 239-247, 1994.

NIKINMAA, M. How does environmental pollution affect red cell function in fish? *Aquatic Toxicology*, 22, 227- 238, 1992.

NOLETO, R.B.; VICARI, M. R.; CIPRIANO, R. R.; ARTONI, R. F. and CESTARI, M. M. Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). *Genetica*, vol. 130, p. 133–138, 2007.

NOLETO, R.B.; Guimarães, F. de S. F.; Paludo, K.S.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F. and CESTARI, M. M. Genome Size Evaluation in Tetraodontiform Fishes from the Neotropical Region. *Mar Biotechnol SHORT COMMUNICATION* 2009.

ONOFRE, E. R. C; CELINO, J. J.; NANO, R. M. W & QUEIROZ, A. F. S. Biodisponibilidade de metais traços nos sedimentos de manguezais da porção norte da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.2, nº2, p.65-82,2007.

OOST, R. V. D ; BEYER, J. and VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 13, p. 57 - 149, 2003.

PALHARES, D and GRISOLIA, K. C. Comparison between MN frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetic and molecular biology*, vol. 25, p. 281-284, 2002.

PELLACANI, C.; BUSCHINI, A.; FURLINI, M.; POLI, P. and ROSSI, C. A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquatic Toxicology*, vol. 77, p. 1–10, 2006.

PESSERL, B. H., Seletividade de captura de redes de emalhe em um ambiente de gamboa. Dissertação Mestrado em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. p. 46,2007.

POSSATTO, F. E., Dinâmica de crescimento e peso de *Sphoeroides testudineus* (Actinopterygii, Tetraodontidae) na Gamboa do Perequê (PR Brasil). Monografia de Bacharelado, curso de Oceanografia da Universidade Federal do Paraná, p. 33,2006.

PRODOCIMO, V. & FREIRE, C. A. Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 262, p. 243–253, 2001.

PRODOCIMO, V. & FREIRE, C. The Na⁺, K⁺, 2Cl