



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PPG - BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

SOLANGE FRAZÃO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE AMBIENTAL DAS ÁGUAS SOB
INFLUÊNCIA DO COMPLEXO PORTUÁRIO DO ITAQUI, MARANHÃO, BRASIL



São Luis, MA

2016

SOLANGE FRAZÃO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE AMBIENTAL DAS ÁGUAS SOB
INFLUÊNCIA DO COMPLEXO PORTUÁRIO DO ITAQUI, MARANHÃO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Silma Regina F. Pereira

Co-orientador: Prof^º. Dr. Ricardo Luvizotto Santos

São Luis, MA

2016

Almeida, Solange Frazão de.

Avaliação da mutagenicidade ambiental das águas sob influência do Complexo Portuário do Itaqui, Maranhão, Brasil / Solange Frazão de Almeida. — São Luís, 2016.

33 f.

Orientador: Silma Regina F. Pereira

Co-orientador: Ricardo Luvizotto Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, 2016.

1. Mutagenicidade ambiental - Águas. 2. Toxicogenética. 3. Complexo Portuário do Itaqui. 4. Teste de Micronúcleo. I. Título.

SOLANGE FRAZÃO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE AMBIENTAL DAS ÁGUAS SOB
INFLUÊNCIA DO COMPLEXO PORTUÁRIO DO ITAQUI, MARANHÃO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira – Orientadora
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof^o. Dr. Ricardo Luvizotto Santos – Co-orientador
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof^o. Dr. Luis Fernando Carvalho Costa – Avaliador Interno
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof^a. Dra. Débora Martins Silva Santos – Avaliador externo
Universidade Estadual do Maranhão (UFMA)

Aprovada em: 25/ 02/ 2016

Local de Defesa: Sala de tutoria do Centro Pedagógico Paulo Freire

APOIO**FONTE FINANCIADORA**

DEDICATÓRIA

A Deus, que é onipresente, onipotente e onisciente.

A minha família, minha base, minha fortaleza.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre se fez presente em todos os momentos da minha vida, e nesse não foi diferente, foi nele que eu busquei forças em todos os momentos difíceis dessa caminhada.

À minha mãe, Sandra, minha guerreira, minha rocha, meu alicerce. Obrigada por se fazer sempre presente mesmo estando distante fisicamente, por me dar forças, apoiar, incentivar e pelo seu amor incondicional. A você dedico todo o meu amor.

Ao meu pai, Hélio, pela força, suporte e amor.

Aos meus irmãos, Leandro e Elessandro que mesmo indiretamente me ajudaram com o apoio familiar que é essencial.

Ao João Bosco, que se fez presente me dando apoio e carinho sempre que precisava, pelas ajudas nas coletas e experimentos, que mesmo sem saber como fazer se propôs a aprender para me ajudar. Amo você!

À minha orientadora, Prof. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira, pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho, que mesmo sem me conhecer me aceitou como orientanda, pelo acompanhamento e contribuição ao meu trabalho e por todos os ensinamentos. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Carvalho Costa, que me acompanha desde a graduação e que me incentivou no ingresso ao mestrado. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pelo companheirismo e pelos “puxões de orelha” nas horas necessárias. A você tenho uma enorme gratidão.

Ao Prof. Dr. Ricardo Livizotto Santos, que também sem me conhecer se disponibilizou a me ajudar me dando todo apoio nas coletas, no financeiro e até tirando um pouco do seu tempo que é corrido para ir me deixar e buscar nas coletas sempre que eu precisava, pelos ensinamentos e por estar sempre contribuindo com o meu trabalho. À você o meu muito obrigada!

À banca, Prof. Dra. Débora Martins Silva Santos e mais uma vez ao Prof. Dr. Luis Fernando Carvalho Costa, por aceitarem estar na minha banca e por suas contribuições.

Ao Prof. Dr. Marco Valério Jansen Cutrim, pelo fornecimento dos dados de análises químicas do meu trabalho e por sua ajuda.

À querida Martinha, que se fez presente no meu trabalho contribuindo com sua ajuda desde os primeiros dias de laboratório, que se disponibilizou a me ajudar e me

ensinar os testes do meu trabalho que até então eram novos para mim, pelo companheirismo nas coletas em meio ao sol ardente e às águas salgadas, mas sempre com um sorriso no rosto, por todas as horas de brincadeiras, risadas e principalmente por sua amizade. Muito obrigada Martinha!

Aos amigos do LABGEM, Vanessa, Carol, Patrícia, Willian, Lays, Luis, Vera, Pâmella, e a todos os outros, pela amizade que foi fundamental para que essa caminhada se tornasse mais fácil, obrigada pelas horas de conversa, pelas gargalhadas, pelo incentivo e por estarem sempre por perto, quero vocês pra vida toda.

À Santinha, nossa mãezona no laboratório, obrigada por tudo!

Às amiga de turma Mayara e Simone, por estarem sempre presente desde o início, por compartilhar nossas angustias e vitórias, pelas conversas, pelo incentivo, pelas risadas, que esta amizade seja daqui pra vida.

À Universidade Federal do Maranhão - UFMA, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação – PPGBC.

A CAPES e FAPEMA, pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry – O pequeno príncipe)

SUMÁRIO

RESUMO	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	III
APRESENTAÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2
<p>ÁGUAS ESTUARINAS EM REGIÃO PORTUÁRIA CAUSAM DANOS GENÉTICOS EM <i>Sciades herzbergii</i> (SILURIFORMES, ARIIDAE): IMPLICAÇÕES E IMPACTO PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL</p>	
ABSTRACT	4
RESUMO	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1. Área de estudo	8
2.2. Obtenção dos animais	9
2.3. Parâmetros físico-químicos	10
2.4. Análises químicas	10
2.5. Ensaio do Cometa	10
2.6. Teste do Micronúcleo	11
2.7 Análise estatística	12
3. RESULTADOS	12
3.1. Parâmetros físico-químicos	12

3.2 Análises químicas	13
3.3. Ensaio do Cometa	15
3.4. Teste do Micronúcleo	16
4. DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMO

O potencial genotóxico e mutagênico das águas do entorno do Complexo Portuário do Itaqui foi avaliado usando-se peixes (*Sciades herzbergii*) nativos da região, de modo a compreender melhor o impacto de ações antrópicas nesse ecossistema aquático. Para isso, foram coletados 20 animais na localidade do Complexo Portuário e 20 animais na localidade de referência (Pau Deitado), ambos situados na Ilha do Maranhão (Brasil), no período chuvoso (maio e junho) e de estiagem (novembro e dezembro), de 2015. Foram realizados o Ensaio do Cometa e o teste do Micronúcleo para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico, respectivamente. As análises químicas da água na região portuária no período chuvoso revelaram valores acima do permitido pela legislação ambiental brasileira para Cl, P, Zn, e B, (Mn com valores próximos ao máximo permitido), sendo que as análises químicas de sedimento revelaram a presença de metais e compostos orgânicos. A análise toxicogenética revelou maior frequência de lesões genômicas e mutações nos animais coletados no entorno da região portuária em ambos os períodos quando comparados ao local de referência ($p < 0,05$). Houve também diferença significativa entre os períodos chuvoso e de estiagem nos dois testes. Dessa forma, sugere-se que os contaminantes presentes no entorno do Complexo Portuário do Itaqui são capazes de causar danos genéticos nos indivíduos a eles expostos. A espécie *Sciades herzbergii* mostrou-se um bioindicador sensível para estudos de genética toxicológica ambiental com aplicabilidade em trabalhos de monitoramento de recursos hídricos.

Palavras-chave: Toxicogenética, Teste do Micronúcleo, Ensaio Cometa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização da área de estudo. L1 = Local de referência na localidade Pau Deitado (Ilha do Maranhão, Brasil); L2 = Complexo Portuário do Itaqui (Ilha do Maranhão, Brasil).

Figura 2. Frequência de eritrócitos micronucleados em *Sciades herzbergii* (L1 n=20 e L2 n=20; 1.000 eritrócitos analisados por animal) no período chuvoso (A) e seco (B). L1: local de referência; L2: Complexo Portuário do Itaqui. *: Diferença significativa pelo teste Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-Sum Test) quando comparado ao local de referência ($p < 0,05$) (A), diferença significativa por ANOVA seguido de Tukey, quando comparado ao local de referência ($p < 0,05$) (B).

Figura 3: Frequência de eritrócitos micronucleados em *Sciades herzbergii* nos períodos chuvoso e seco. L1: localidade de referência – Pau Deitado (A); L2: Complexo Portuário (B). *: Diferença significativa por ANOVA seguido de Tukey ($p < 0,05$) (A); Diferença significativa pelo teste Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-Sum Test) ($p < 0,05$) (B) entre os períodos para a mesma área.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos nas localidades de Referência e do Complexo Portuário do Itaqui, nos períodos chuvoso (Julho de 2015) e seco (Novembro e Dezembro de 2015).

Tabela 2. Análise química da água do entorno do Complexo Portuário do Itaqui – MA apresentando alguns compostos relacionados a atividades portuárias, referente ao período chuvoso e seco (junho e dezembro/2015).

Tabela 3. Frequência de classes de nucleóides e escores de danos no DNA observados em eritrócitos de *Sciades herzbergii* em cada período e entre os períodos (chuvoso e seco).na localidade de referência (n=20) e no Complexo Portuário do Itaqui, Ilha do Maranhão, Brasil (n=20) nos períodos chuvoso e seco no ano de 2015.

APRESENTAÇÃO

O ecossistema e a biota aquática são constantemente expostos a um grande número de substâncias tóxicas a partir de várias fontes de emissão (Bogoni *et al*, 2014), tais como contaminantes antropogênicos provenientes de efluentes não tratados e/ou fluxo de poluentes orgânicos (Pelletier *et al.*, 2006). A poluição no ambiente aquático provoca danos nos vários organismos, em nível de população e ecossistema, assim como na função dos órgãos, estágios reprodutivos e diversidade biológica (Arslan, *et al*, 2010).

Desenvolver estudos para avaliar a qualidade da água dos ecossistemas aquáticos é de fundamental importância para a manutenção da biota associada a estes ambientes, bem como o bem estar das populações humanas que vivem ao redor dessas águas. O desenvolvimento de testes biológicos tem sido uma ferramenta importante para avaliação da qualidade das águas receptoras de efluentes (Martins e Costa, 2015).

As análises de alterações no DNA em organismos aquáticos tem demonstrado ser um método altamente adequado para avaliar efeito genotóxico de ambientes, sendo capaz de detectar a exposição a baixas concentrações de contaminantes em uma ampla gama de espécies (Scalon, *et al*, 2010). Dentre os organismos estudados, os peixes têm sido muito utilizados para avaliação de agentes genotóxicos físicos e químicos, pelo fato de serem capazes de bioacumulação devido à exposição a diversas substâncias químicas, diretamente através da água ou indiretamente via cadeia alimentar, e também porque sua resposta aos xenobióticos ser semelhante à dos mamíferos (Arslan, *et al*, 2010).

A presença de substâncias genotóxicas no ambiente pode ser avaliada através de biomarcadores como o ensaio do cometa, que encontrou ampla aplicação como um método simples e sensível para avaliar danos no DNA de peixes expostos a vários xenobióticos no ambiente aquático (Dhawan *et al*, 2009;. Frenzilli *et al.*, 2009), e pelo teste do micronúcleo que é aplicado para testar a mutagenicidade, pois é capaz de detectar a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos através da identificação de micronúcleos gerados por agentes capazes de causar quebras cromossômicas ou de interferir na segregação dos cromossomos durante o processo de divisão celular (Martins *et al.*, 2010).

O complexo portuário do Itaquí está classificado entre os maiores portos do litoral brasileiro, no qual aportam inúmeros navios de grande calado, transportando os mais

diversificados produtos industrializados, dentre os quais, subprodutos extraídos do petróleo, além de uma grande quantidade de minério (ferro, alumina, bauxita e manganês), alumínio, ferro gusa, fertilizantes, malte, soja, soda cáustica, carvão/coque, entre outros (Alcântara e Santos, 2005; Acosta *et al.*, 2011). Embora seja conhecida a ocorrência de despejo de efluentes e resíduos provenientes de residências e indústrias na região do Porto do Itaqui, pouco se sabe sobre o efeito das atividades do porto sobre a biota aquática do seu entorno.

Através de todas essas informações, o propósito deste estudo foi avaliar o potencial genotóxico e mutagênico das águas do entorno do Porto do Itaqui em peixes nativos da região, de modo a compreender melhor o impacto de ações antrópicas nesse ecossistema aquático. Os resultados deste trabalho estão contidos no artigo **ÁGUAS ESTUARINAS EM REGIÃO PORTUÁRIA CAUSAM DANOS GENÉTICOS EM *Sciades herzbergii* (SILURIFORMES, ARIIDAE): IMPLICAÇÕES E IMPACTO PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL**, a ser submetido a revista *Aquatic Toxicology* (Qualis A1).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, C. M. M., Silva, A. M. V. A., Lima, M. L. P., 2011. Aplicação de análise envoltória de dados (DEA) para medir eficiência em portos brasileiros. *Revista de Literatura dos Transportes*, vol. 5, n. 4.

Alcântara, E. H., Santos, M. C. F. V., 2005. Mapeamento de Áreas de Sensibilidade Ambiental ao Derrame de Óleo na Região Portuária do Itaquí, São Luís, MA-Brasil. *Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Goiânia, Brasil, INPE, p. 3605-3617. 16-21 Abril.

Arslan, O. C., Parlak, H., Katalay, S., Boyacioglu, M., Karaaslan, M. A., Guner, H., 2010. Detection micronuclei frequency in some aquatic organisms for monitoring pollution of Izmir Bay (Western Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment*, 165, 55–66.

Bogoni, J. A., Armiliato, N., Araldi-Favassa, C. T., Techio, V. H., 2014. Genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (*Twospot Astyanax*) Exposed to the Waters of Engano River (Brazil) as Determined by Micronucleus Tests in Erythrocytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66: 411-449.

Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, vol. 25, p. 5-32.

Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B. P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, vol. 681, p. 80-92.

Martins, L., Paz, A. V., Brentano, D. B., 2010. Avaliação da geração de micronúcleo em juvenis de *Centropomus parallelus* (Robalo-peva) expostos a diferentes concentrações salinas. *RTC, Florianópolis, SC*, v.02, n° 01, p.13-16.

Martins, M., Costa, P.M., 2015. The comet assay in Environmental Risk Assessment of marine pollutants: applications, assets and handicaps of surveying genotoxicity in non-model organisms. *Mutagenesis*, 30(1): 89-106.

Pelletier, E., Sargian, P., Payet, J., Demers, S., 2006. Ecotoxicological effects of combined UVB and organic contaminants in coastal waters: a review. *Photochem. Photobiol.*, v. 82, n. 4, p. 981-993.

Scalon, M. C. S., Rechenmacher, C., Siebel, A. M., Kayser, M. L., Rodrigues, M. T., Maluf, S. W., Rodrigues, M. A. S., Silva, I. B., 2010. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. *Braz. J. Biol.*, vol 70, no. 4 (suppl.), p. 1217-1222.

ÁGUAS ESTUARINAS EM REGIÃO PORTUÁRIA CAUSAM DANOS GENÉTICOS EM *Sciades herzbergii* (SILURIFORMES, ARIIDAE): IMPLICAÇÕES E IMPACTO PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL.

Solange Frazão de Almeida^a; Marta Regina de Castro Belfort^b; Marco Valério Jansen Cutrim^c; Luis Fernando Carvalho Costa^b; Ricardo Luvizotto-Santos^c; Silma Regina Ferreira Pereira^b

^a - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses s/n, 65080040, São Luís, Maranhão, Brasil. solangefrazaol4@hotmail.com.

^b - Laboratório de Genética e Biologia Molecular – LABGEM, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses s/n, 65080040, São Luís, Maranhão, Brasil. marta.belfort@hahoo.com; lfecce@yahoo.com.br; silmaregina@yahoo.com.br.

^c -Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses s/n, 65080040, São Luís, Maranhão, Brasil. luvizottosantos@ufma.br; cutrim@ufma.br.

ABSTRACT

The Port Complex of Itaqui is considered one of the largest in the Brazilian coast. They dock numerous large draft ships, carrying the most diverse industrial products extracted from petroleum products, in addition to a large amount of ore. While it is known to occur discharge of effluents and waste from the harbor, houses and industry in the area of the Port of Itaqui, little is known about the effects on aquatic biota from their surroundings. The aim of this study was to evaluate the genotoxic and mutagenic potential of the surrounding waters of the Port of Itaqui in native *Sciades herzbergii* fish, in order to better understand the impact of human activities on this aquatic ecosystem. Twenty animals were collected from the site of Port Complex and 20 animals from the locality of reference (Pau Deitado) in each period (wet and dry), both located in Maranhão Island, Brazil, in May and July, November and December 2015. The animals collected were submitted to the comet assay and micronucleus test to assess the genotoxic and mutagenic potential respectively. The chemical water analysis showed values above those allowed by

environmental regulations for Cl, P, Zn, and B (Mn to values close to the maximum allowed), and the chemical analyses pellet showed the presence of metals and organic compounds. Toxicogenetic analysis revealed higher frequency of genomic damage and mutations in animals collected in the vicinity of the port in both seasons when compared to those of the reference site ($p < 0,05$). Besides, the score of DNA damage in the port area was significantly higher during the dry season. Thus, it is suggested that contaminants in the vicinity of the Port Complex of Itaqui are capable of causing genetic damage in individuals exposed to them, also *Sciades herzbergii* species proved to be a sensitive bio-indicator for environmental toxicological genetic studies with applicability in monitoring water resources works.

Keywords: Toxicogenetics, mutagenicity, micronucleus test, comet assay

RESUMO

O Complexo Portuário do Itaqui é considerado um dos maiores do litoral brasileiro. Nele aportam inúmeros navios de grande calado, transportando os mais diversificados produtos industrializados, subprodutos extraídos do petróleo, além de uma grande quantidade de minérios. Embora seja conhecida a ocorrência de despejo de efluentes e resíduos provenientes do porto, de residências e indústrias na região do Porto do Itaqui, pouco se sabe sobre seus efeitos sobre a biota aquática do seu entorno. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genotóxico e mutagênico das águas do entorno do Porto do Itaqui utilizando como bioindicador o peixe nativo *Sciades herzbergii*, de modo a compreender melhor o impacto de ações antrópicas nesse ecossistema aquático. Foram coletados 20 animais na localidade do Complexo Portuário do Itaqui e 20 animais na localidade de referência (Pau Deitado), ambos situados na Ilha do Maranhão (Brasil), no período chuvoso (maio e junho) e de estiagem (novembro e dezembro), de 2015. Foram realizados o Ensaio do Cometa e o teste do Micronúcleo para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico, respectivamente. As análises químicas da água na região portuária, no período chuvoso, revelaram valores acima do permitido pela legislação ambiental brasileira para Cl, P, Zn, e B, (Mn com valores próximos ao máximo permitido), sendo que as análises químicas de sedimento revelaram a presença de metais e compostos orgânicos abaixo do permitido pela legislação. A análise toxicogenética revelou maior frequência de lesões genômicas e mutações nos animais coletados no entorno da região portuária em ambos os períodos, quando comparados ao local de

referência ($p < 0,05$). Além disso, o escore de danos ao DNA na região portuária foi significativamente maior no período seco. Sugere-se que os contaminantes presentes no entorno do Complexo Portuário do Itaquí são capazes de causar danos genéticos nos indivíduos a eles expostos, sendo que a espécie *Sciades herzbergii* mostrou-se um bioindicador sensível para estudos de genética toxicológica ambiental com aplicabilidade em trabalhos de monitoramento de recursos hídricos.

Palavras-chave: Toxicogenética, Mutagenicidade, Teste do Micronúcleo, Ensaio Cometa

1. INTRODUÇÃO

Os testes biológicos têm sido uma ferramenta importante para avaliação da qualidade das águas receptoras de diferentes fontes de poluição (Tagliari *et al.*, 2004; Amado *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2013). Por haver uma crescente preocupação sobre a presença de genotoxinas em corpos hídricos, biomarcadores sensíveis vem sendo muito utilizados. Estes podem ser definidos como uma alteração na resposta biológica, que vão desde o nível molecular até alterações comportamentais, que pode ser relacionada à exposição ou efeitos de contaminantes ambientais (Depledge *et al.*, 1995). Podem ser derivados de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em organismos sob exposição aos xenobióticos, integrando as respostas biológicas à contaminação (Ribeiro *et al.*, 2013).

O nível de lesões no material genético de organismos aquáticos expostos às amostras de recursos hídricos de interesse é utilizado como parâmetro de genotoxicidade (Martins e Costa, 2015). A análise de alterações de DNA em organismos aquáticos tem demonstrado ser um método altamente adequado para avaliar a contaminação genotóxica de ambientes, sendo capaz de detectar a exposição a baixas concentrações de contaminantes em uma ampla gama de espécies (Scalon, *et al.*, 2010).

Os agentes genotóxicos causam danos ao DNA e, caso não ocorra o reparo dessas lesões, pode ser iniciada uma cascata de consequências danosas às células, órgãos, ao indivíduo e até na população e comunidade (Amado *et al.* 2006; Rivero, 2007), bem como danos à reprodução, e diversidade biológica (Arslan *et al.* 2010).

Danos ao DNA por xenobióticos podem acontecer por diferentes mecanismos, dentre os quais a formação de adutos de DNA e/ou oxidação de bases nitrogenadas (Monserrat, *et al.*, 2007). Estudos revelam que um grande número de produtos químicos que contaminam o meio ambiente tem efeitos carcinogênicos ou mutagênicos (Arslan *et al.* 2010).

A principal rota desses xenobióticos nos organismos aquáticos, como peixes, é através da água e ingestão de alimentos (Arslan, *et al.*, 2010), visto que estes organismos tendem a acumular metais pesados e contaminantes orgânicos em seus tecidos, mesmo quando a água possui níveis desses compostos abaixo da concentração máxima tolerada pela legislação, gerando riscos de contaminação dentro da cadeia trófica (Campos *et al.*, 2002). Os metais diferenciam-se dos compostos orgânicos tóxicos, por serem absolutamente não-degradáveis, de maneira que podem se acumular nos componentes do ambiente onde manifestam sua toxicidade (Bard e Zoski, 2002). O potencial do impacto ecológico de cada efeito nos indivíduos pode levar a danos nos vários organismos, em nível de população e ecossistema, assim como na função dos órgãos, estágios reprodutivos e diversidade biológica (Arslan, *et al.*, 2010).

O Complexo Portuário do Itaqui é considerado um dos maiores do litoral brasileiro, está localizado ao noroeste da Ilha do Maranhão, tendo como limite ao norte, manguezais e matas de terra firme, ao leste, e sudeste, manguezais, e, de noroeste ao sul, a baía de São Marcos. Nele aportam inúmeros navios de grande calado, transportando os mais diversificados produtos industrializados, dentre os quais, subprodutos extraídos do petróleo (gasolina, querosene e gás), além de uma grande quantidade de minério (ferro, alumina, bauxita e manganês), alumínio, ferro gusa, fertilizantes, malte, soja, soda cáustica, carvão/coque, entre outros (Alcântara e Santos, 2005; Acosta *et al.*, 2011). Embora seja conhecida a ocorrência de despejo de efluentes e resíduos provenientes do porto, de residências e indústrias na região, pouco se sabe sobre os seus efeitos sobre a biota aquática do seu entorno.

O monitoramento ambiental tem sido uma preocupação no Complexo Portuário do Itaqui (Alcântara e Santos, 2005; Novaes *et al.*, 2007), no entanto, há poucos relatos de estudos que visem detectar alterações genéticas em organismos expostos aos contaminantes presentes no ambiente. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genotóxico e mutagênico das águas do entorno do Porto do Itaqui em peixes

nativos da região, de modo a mensurar melhor o impacto de ações antrópicas nesse ecossistema aquático, reavaliando o impacto dos contaminantes presentes nesse ambiente estuarino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

Foram definidas duas localidades para análise. O local de referência (L1) 02°31'45.21"S, 44°5'11.87"O, na localidade Pau Deitado (Figura 1), localizado na Baía de São José no Município de Paço do Lumiar (MA), e caracterizado como um ambiente estuarino, apresentando uma extensa área de manguezais e substrato de vasa (Mattews *et. al.*, 1977). É considerado um local com menor impacto antrópico por ser mais distante dos centros urbanos e da área industrial da Ilha de São Luis. Além disso, os canais navegáveis não apresentam movimentação de navios de grande porte. A segunda localidade está na área de influência do Complexo Portuário do Itaqui, na Baía de São Marcos, São Luis (MA) (Figura 1), além de outros terminais portuários (Ponta da Madeira e o Terminal Portuário da ALUMAR), os quais também desenvolvem importantes atividades de transporte de minérios (Alcântara e Santos, 2005; Sousa, 2009). No Complexo Portuário do Itaqui foram definidos dois pontos de coleta. O primeiro no Igarapé Irinema Pequeno (02°34'50.3"S, 44°21'42.4"O) (L2.1) e o segundo no Igarapé Irinema Grande (02°34'57.4"S, 44°21'33.3"O) (L2.2), ambos localizados em áreas próximas a despejos de efluentes residenciais e industriais e intensa atividades portuárias.

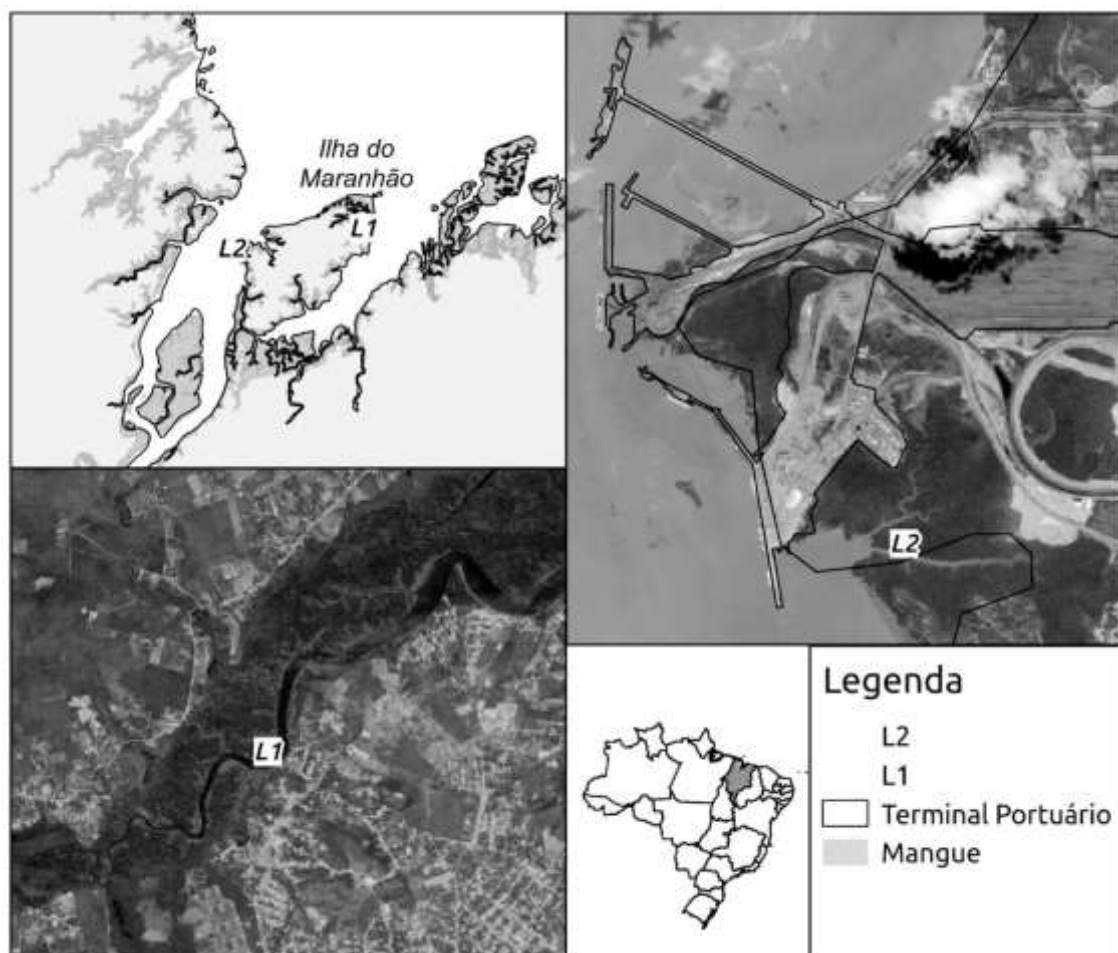


Figura 1. Localização da área de estudo. L1 = Local de referência na localidade Pau Deitado (Ilha do Maranhão); L2 = Complexo Portuário do Itaqui (Ilha do Maranhão). Foto: Diego Campos.

2.2. Obtenção dos animais

O peixe *Sciades herzbergii*, popularmente conhecido como bagre guribu, foi selecionado como organismo indicador de estresse ambiental em virtude de sua ampla distribuição na Ilha de São Luis, tolerância aos diferentes parâmetros ambientais, hábito bentônico e sedentário (Carvalho-Neta & Abreu-Silva 2010, Carvalho-Neta *et. al.*, 2014). É uma espécie estuarino-residente da família Ariidae, abundante no litoral maranhense, e apresenta importância comercial na pesca artesanal do estado (Ribeiro *et. al.*, 2011).

Para captura dos animais foram utilizadas redes com malha de 50mm e 25mm, 100m de comprimento e 2,5m de altura. Os animais capturados foram mantidos em armadilhas de modo a mantê-los no ambiente natural até sua completa remoção da água, para evitar o estresse dos animais. A licença de coleta e transporte do material biológico foi

aprovada pelo SISBIO (Nº 45384-1) antes do início das coletas. A taxonomia dos animais foi realizado pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Peixes – UFMA.

Foram coletados 20 espécimes em cada localidade no período chuvoso, entre os meses de maio e junho, totalizando 60 animais sendo 20 animais do local de referência (L1) e 40 animais da região portuária (L2.1 e L2.2 = 40). Análises preliminares demonstraram não haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os pontos de coleta no entorno do complexo portuário (L2). Desse modo, as análises estatísticas foram conduzidas considerando-se apenas o ponto mais próximo da região portuária (L2.1). No período seco (entre novembro e dezembro) foram coletados 20 espécimes em L1 e 10 espécimes do local L2, totalizando 30 animais nesse período.

Os peixes foram eutanasiados em gelo, sendo feita excisão na região próxima ao coração para punção de 20 μ l de sangue, utilizando-se pipeta com anticoagulante heparina. As amostras de sangue foram diluídas em 1 mL de soro bovino fetal, e armazenadas em gelo até o momento da realização dos testes laboratoriais.

2.3. Parâmetros físico-químicos

Foram medidos o pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade, para as duas localidade (L1 e L2) , nos dois períodos (chuvoso e seco) com o auxílio de um multiparâmetro (Hanna HI 9828), colocando-o na camada superficial da água a 20 cm de profundidade.

2.4. Análises químicas

A área portuária é monitorada através do convênio EMAP-FSADU-UFMA “Programa de Monitoramento Ambiental do Porto do Itaqui”, sendo que os dados relativos às análises químicas da água e dos sedimentos no mês de junho foram utilizados para a descrição dos contaminantes da área referente ao período chuvoso. As análises químicas da água no mês de novembro foram utilizadas para descrever os contaminantes referentes ao período seco. As análises foram feitas pela empresa Merieux NutriSciences (Piracicaba, São Paulo) seguindo metodologia descrita no *Standard Methods* (APHA, 2012) para as diferentes matrizes e grupos químicos.

2.5. Ensaio do Cometa

Realizou-se o Ensaio do Cometa (Singh *et al*,1988). Resumidamente, 10 µL de sangue foram diluídos em 1 mL de soro bovino fetal. Desta solução, 10 µL foram adicionados a 120 µL de agarose *low melting point*, e homogeneizados. A mistura foi depositada sobre uma lâmina previamente preparada com agarose de ponto de fusão normal (1,5%). As lâminas foram cobertas com lamínulas e refrigeradas por 20 minutos (4°C). A lamínula foi retirada e, a lâmina mergulhada em solução de lise gelada (2,5M NaCl; 100mM EDTA;10mM Tris pH com 10% de dimetilsufóxido e 1% de Triton X-100) e deixada a 4°C por uma hora. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 25 minutos em solução de eletroforese (200mM EDTA; 300mM NaOH; H2O destilada, pH >13) 4°C. A eletroforese durou 25 minutos a 25V e 300 mA. As lâminas foram neutralizadas em 5 mL de solução de neutralização (0,4M Tris/HCL pH 7,5) por 5 minutos. A neutralização foi repetida por mais duas vezes, e posteriormente, as lâminas foram fixadas em etanol 100% por 5 minutos.

As lâminas foram coradas com 30 µL de solução de brometo de etídio (30 µg/ml) e cobertas com lamínula. O material foi imediatamente analisado em microscópio de fluorescência (BX51/BX52-Olympus; filtro 516-560nm; barreira de filtro de 590nm, objetiva de 40x).

Foram analisados 100 nucleóides por animal. A avaliação foi feita seguindo o padrão de classificação dos trabalhos de Speit & Hartmann (1995) que considera 5 classes de acordo com o comprimento da cauda dos nucleóides. Classe 0: sem dano (<5%); Classe 1: baixo nível de danos (5-20%); Classe 2: médio nível de danos (20-40%); Classe 3: alto nível de danos (40-94%); e Classe 4: dano total (95%).

Com as frequências de cada classe, o escore de danos foi calculado multiplicando-se o número de nucleóides em cada classe pelo valor da respectiva classe. O escore final para cada grupo amostral foi obtido pela divisão entre o somatório dos valores de cada classe pelo número de nucleóides analisados.

Escore total = $(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) / \text{número de células.}$

2.6. Teste do Micronúcleo

Foi empregada a metodologia descrita por Schmid (1975) e Hooftman & Raat, (1982) para determinar a frequência de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico.

Resumidamente, a partir de uma gota de sangue foi feito esfregaço em lâmina de vidro que posteriormente, foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e coradas com corante Giemsa diluído em tampão fosfato (pH=8,6), na proporção de 1:10. As lâminas foram lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente e observadas em microscópio óptico em objetiva de imersão.

Foi determinada a frequência de eritrócitos micronucleados em 1000 células analisadas por animal, em teste cego, considerando-se apenas hemácias nucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras. Foram considerados como micronúcleos as partículas que, em relação ao núcleo principal, não excediam 1/3 do seu tamanho, que apresentavam-se nitidamente separados, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo (Carrasco *et al.* 1990).

2.7. Análises estatísticas

Para avaliar a normalidade na distribuição dos dados foi utilizado o teste Shapiro-Wilk e, quando os dados não apresentavam distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-Sum Test). Havendo normalidade na distribuição dos dados foi aplicado o teste paramétrico ANOVA seguido de Tukey. O valor de significância de p foi de 5% para a comparação entre as duas localidades, bem como entre os períodos de coleta. Todos os testes estatísticos foram conduzidos ao programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2005).

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros físico-químicos

Os valores de pH obtidos nas diferentes amostras das áreas, nos dois períodos (chuvoso e seco) foram levemente básicos, dentro do intervalo de 7,30 e 8,05. A salinidade no período seco teve um aumento considerável em ambos os locais de amostragem (L1 e L2). O oxigênio dissolvido apresentou pouca variação dentro dos seus respectivos períodos, revelando um ambiente bem oxigenado. A temperatura foi mais baixa no local de referência no período chuvoso em relação as outras amostragens, enquanto a condutividade para o local de referência também no período chuvoso foi mais baixa em relação ao entorno do Complexo portuário no mesmo período. Por outro lado no período seco, esta se mostrou com pouca variação (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos nas localidades de Referência e do Complexo Portuário do Itaqui, nos períodos chuvoso (Julho de 2015) e seco (Novembro e Dezembro de 2015).

Local/ Período	pH	Salinidade g/kg	Temperatura (°C)	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	Condutividade mS/cm
Chuvoso					
L1	7,47	8,44	24,97	6,24	14,54
L2	8,08	24,82	28,37	5,12	39,17
Seco					
L1	7,30	39,21	28,60	3,71	58,86
L2	7,70	37,36	29,31	4,41	56,40

L1: localidade de referência - Pau Deitado;

L2: Complexo Portuário (Igarapé Irinema Pequeno);

3.2. Análises químicas

As análises químicas da água na região portuária, no período chuvoso, revelou a presença de alguns compostos como o Cloro residual (Cl), Fósforo Total (P), Zinco (Zn), e Boro (B), com valores acima do permitido pela legislação ambiental brasileira para águas salobras classe I, segundo a Resolução CONAMA 357 (2005). A concentração de Manganês (Mn) ficou pouco abaixo do limite que é de 0,1 mg/L (Tabela 2). No entanto, no período seco, os compostos analisados se mostraram abaixo do valor permitido pela legislação (Tabela 3).

Tabela 2. Análise química da água do entorno do Complexo Portuário do Itaqui – MA apresentando alguns compostos relacionados a atividades portuárias, referente ao período chuvoso e seco (junho e dezembro/2015).

Parâmetros	Unidade	LQ/Faixa	Resultados analíticos (Chuvoso)	Resultados analíticos (Seco)	CONAMA 357/05 Água salobra
Cobre	mg/L	0,005	<0,005	<0,005	---
Cobre Dissolvido	mg/L	0,005	<0,005	<0,005	0,005
Ferro	mg/L	0,01	1,92	0,935	---
Ferro Dissolvido	mg/L	0,01	0,0186	0,0926	0,30
Manganês	mg/L	0,01	0,0985	0,0156	0,10
Níquel	mg/L	0,01	<0,01	<0,01	0,025
Alumínio Dissolvido	mg/L	0,01	<0,01	<0,01	0,10
Arsênio	mg/L	0,01	<0,01	<0,01	0,01
Boro	mg/L	0,01	2,82	n.e	0,50
Cádmio	mg/L	0,005	<0,005	<0,005	0,005
Chumbo	mg/L	0,01	<0,01	<0,01	0,01
Cloro residual	mg/L	0,01	0,47	n.e	0,01
Cromo	mg/L	0,01	<0,01	<0,01	0,05
Fósforo Total	mg/L	0,02	0,18	n.e	0,124
Mercúrio	mg/L	0,000075	<0,00008	<0,00007	0,0002
Zinco	ml/L	0,01	0,519	< 0,01	0,09

LQ/Faixa: limite de detecção do método;

n.e: Não encontrado

---: Não classificado pelo CONAMA;

CONAMA 357/05 Água salobra: condições de qualidade da água pelo CONAMA 357/05 artigo 21 de 17 de março de 2005 – padrão para água salobra de classe 1.

A análise química dos sedimentos no período chuvoso, apresentou valores quantificáveis dos compostos Arsênio, Chumbo, Cobre, Cromo, Níquel, Zinco, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Criseno, Acenafteno, Acenaftileno, Antraceno, Fenantreno, Fluorantreno, Fluoreno, 2-Metilnaftaleno, Naftaleno, Pireno, Somatório de HPA's e Fósforo. O período seco também apresentou valores quantificáveis dos compostos Arsênio, Cromo, Níquel e Zinco, cujos valores, em ambos os períodos, ficaram abaixo dos níveis estabelecidos pela legislação ambiental brasileira através da Resolução CONAMA 454 (2012).

3.3. Ensaio do Cometa

Em razão da proximidade entre os dois pontos de coleta na localidade do Complexo Portuário do Itaqui (L2.1 e L2.2), fez-se uma análise de comparação entre os escores de danos detectados em ambos os pontos, não tendo sido observada diferença significativa entre eles (Mann-Whitney, $p > 0,05$), e dessa forma, optou-se por utilizar apenas uma localidade (mais próxima ao porto, L2.1) para as análises.

A Tabela 3 apresenta as classes de nucleóides detectadas nas localidades L1 (referência) e L2 (complexo portuário), nos períodos chuvoso e seco. Observa-se que as classes de danos no local de referência são similares em ambos os períodos (chuvoso e seco), sendo que a classe zero é a mais frequente (77,3% e 85%, respectivamente), seguida pelas demais classes de maneira decrescente, de modo que as classes 3 e 4 foram incipientes, produzindo escores de danos (0,25 e 0,17) significativamente menores que aqueles obtidos na localidade do entorno do complexo portuário, tanto no período chuvoso quanto no período seco. Ressalta-se a baixa frequência de classe zero (9,6%) e aumento das classes 2, 3 e 4 (46,3%, 5,9% e 5,7%, respectivamente), no entorno do complexo portuário (período seco), comparado ao local de referência, no mesmo período. A frequência dessas classes de danos é refletida no maior nível de instabilidade genética observado no período seco comparado ao período chuvoso nos animais coletados nas águas próximas ao complexo portuário.

Tabela 3. Frequência de classes de nucleóides e escores de danos no DNA observados em eritrócitos de *Sciades herzbergii* em cada período e entre os períodos (chuvoso e seco) na localidade de referência (n=20) e no Complexo Portuário do Itaqui, Ilha do Maranhão, Brasil (n=20) nos períodos chuvoso e seco no ano de 2015.

Local/Período	Classes (%)					Escores
	0	1	2	3	4	Média±DP
Chuvoso						
L1	77,3	20,7	1,5	0,3	0,2	0,25±0,22 ^a
L2	62,0	35,7	2,1	0,2	0,0	0,40±0,25 ^b
						P=0,0257
Seco						
L1	85,0	13,4	1,2	0,3	0,1	0,17±0,19 ^a
L2	9,6	32,5	46,3	5,9	5,7	1,65±0,53 ^{b, c}
						P=0,0001

L1: localidade de referência – Pau Deitado; L2: Complexo Portuário do Itaqui.

Letras diferentes indicam diferença significativa (Mann-Whitney - Wilcoxon Rank-Sum Test, $p < 0,05$).

3.4. Teste do Micronúcleo

No período chuvoso, a frequência de células micronucleadas no local de referência (L1) variou de 5 a 19 micronúcleos por 1000 células analisadas ($13,0 \pm 4,2$), enquanto no Complexo Portuário do Itaqui (L2) variou de 13 a 65 micronúcleos ($29,1 \pm 11,2$). No período seco, foram detectados de 5 a 15 micronúcleos ($9,7 \pm 3,3$) no local de referência (L1), enquanto no Complexo Portuário (L2) houve uma variação de 16 a 25 micronúcleos ($20,1 \pm 2,8$). A localidade do entorno do Complexo Portuário apresentou maior frequência de células micronucleadas comparando ao local de referência ($p < 0,05$), tanto no período chuvoso quanto no período seco (Figura 3).

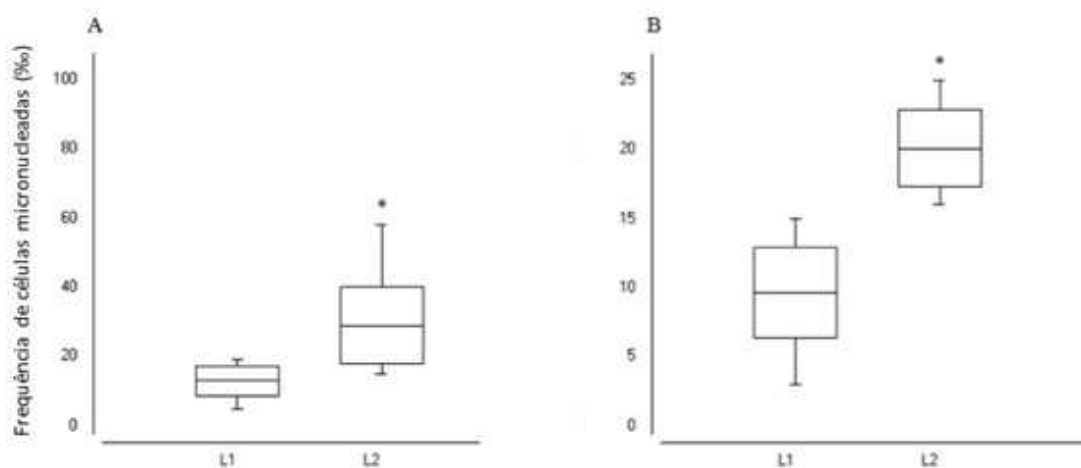


Figura 2. Frequência de eritrócitos micronucleados em *Sciades herzbergii* (L1 n=20 e L2 n=20; 1.000 eritrócitos analisados por animal) no período chuvoso (A) e seco (B). L1: local de referência; L2: Complexo Portuário do Itaqui. *: Diferença significativa pelo teste Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-Sum Test) quando comparado ao local de referência ($p < 0,05$) (A), diferença significativa por ANOVA seguido de Tukey, quando comparado ao local de referência ($p < 0,05$) (B).

As médias de eritrócitos micronucleados mostraram-se significativamente diferentes tanto no local de referência (L1) nos dois períodos (chuvoso e seco), bem como no local próximo ao porto (L2). A maior ocorrência de eritrócitos micronucleados foi observada no período chuvoso para as duas localidades (Figura 4).

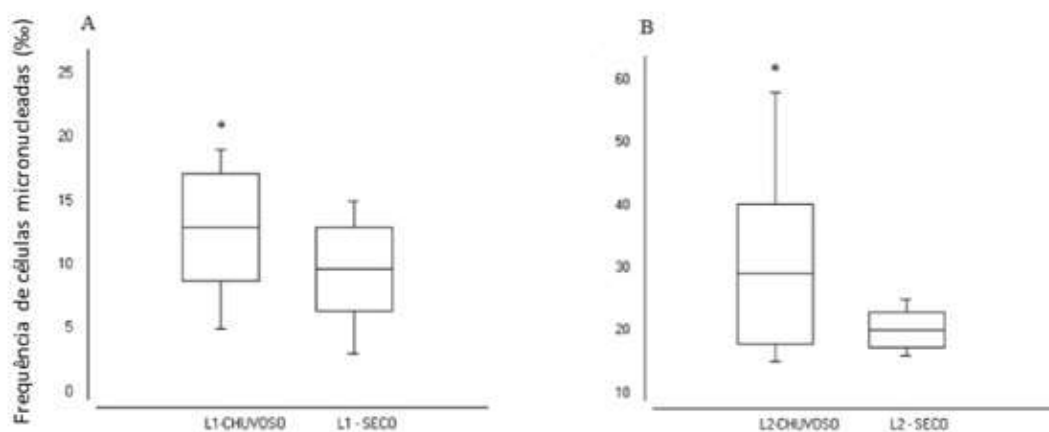


Figura 3. Frequência de eritrócitos micronucleados em *Sciades herzbergii* enos períodos chuvoso e seco. L1: localidade de referência – Pau Deitado (A); L2: Complexo Portuário (B). *: Diferença significativa por

ANOVA seguido de Tukey ($p < 0,05$) (A); Diferença significativa pelo teste Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-Sum Test) ($p < 0,05$) (B) entre os períodos para a mesma área.

4. DISCUSSÃO

O Ensaio do Cometa utilizado para medir lesões genômicas no bagre guribu (*Sciades herzbergii*) revelou maior escore de danos ao DNA nos animais coletados nas proximidades do Porto do Itaqui, em ambos os períodos, chuvoso e seco, sugerindo a presença de estressores na área portuária capazes de induzir danos genéticos nos animais expostos aquele ambiente. Esses achados são condizentes com a maior frequência de eritrócitos micronúcleados detectados nos peixes residentes na região portuária nos dois períodos (chuvoso e seco), sugerindo que os danos causados pelos estressores genotóxicos não estão sendo reparados eficientemente, resultando em mutações nos bagres.

Quando comparado os níveis de lesões genômicas entre os períodos para cada localidade, observou-se que a genotoxicidade foi maior no período seco na região portuária. Ressaltamos que neste mesmo período foi observado maior salinidade nesse local, o que pode ser um fator estressante ao animal e que também pode interferir diretamente na biodisponibilidade de alguns metais, o que também pode ser justificativa para a menor captura dos peixes nesse período. Oba, *et al.*, (2009) relatam que os animais aquáticos enfrentam uma série de mudanças rápidas ou extremas, como a concentração de oxigênio dissolvido, pH e salinidade, que podem ocasionar estresse e reduzir a habilidade na manutenção da homeostasia. Esses estressores tem sido relacionados a produção de espécies reativas de oxigênio que por sua vez, interagem com várias moléculas biológicas, dentre as quais o DNA, podendo causar instabilidade genômica.

Danos no DNA de animais expostos as águas do entorno do Porto do Itaqui também foram demonstrados no trabalho de Rocha-Junior (2015), que usou hemócitos de ostra do mangue (*Crassostrea rhizophorae*) na avaliação toxicogenética de estuários da Ilha de São Luis através do teste do cometa convencional e modificado (com utilização da enzima formamido primidina glicosilase (FPG) para avaliar estresse oxidativo). O teste convencional mostrou que as áreas do Itaqui e Rio Bacanga apresentaram níveis de danos significativamente maiores quando comparados à localidade de referência (Carimã, Raposa), tem sido observado maior nível de danos genéticos após digestão pela enzima FPG sugerindo que os danos genéticos são causados por oxidação das bases do DNA.

Em relação ao teste de mutagenicidade, detectou-se uma maior frequência de células micronucleadas no período chuvoso nas duas localidades. Nesse período, a salinidade estava abaixo de 30‰ (salobra), no entanto foi detectado níveis acima do limite para alguns contaminantes, os quais não estavam presentes no período seco. Dessa forma, sugere-se que a exposição a estes contaminantes esteja relacionada ao aumento de mutações observados nesse período.

O efeito genotóxico e mutagênico tem sido descritos em animais expostos a ambientes estuarinos com proximidade a descargas de efluentes agrícolas, domésticos e industriais, além de resíduos relacionados à atividades portuárias (Domingos *et al.*, 2009). Esses efeitos (genotóxicos e mutagênicos) também foi descrito por Ribeiro *et al.* (2013), em peixes expostos a contaminantes provenientes de uma explosão de navio petroleiro onde observou maior detecção tanto de HPAs (Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) quanto de danos genéticos nas proximidades do local da explosão. Da mesma forma, Bogoni *et al.*, (2014), estudando a qualidade da água do Rio Engano (SC) exposta a várias fontes de poluição constatou efeito mutagênico nos animais expostos às águas contaminadas.

Alguns metais são essenciais aos seres vivos, como o manganês, cobre, zinco, ferro, magnésio, cobalto, boro e molibdênio, os quais atuam em vários processos fisiológicos em baixas concentrações, mas em altas concentrações podem ser tóxicos (Skurihin, 1989). Por outro lado, outros metais, cuja função biológica ainda não é clara, apresentam toxicidade aos organismos, como o chumbo, níquel, mercúrio, cádmio e cromo (Greenpeace, 2006). Devido à sua estabilidade e persistência, a presença destes contaminantes na água constitui uma ameaça grave para a saúde dos organismos expostos (Barbosa *et al.*, 2010).

O potencial mutagênico de metais pesados presentes em ambientes aquáticos tem sido relatado por outros autores. Cavas *et al.*, (2005) relatam a indução de micronúcleo em peixes expostos a longo prazo ao cromo, cobre e cádmio. A presença de metais, bem como a indução de micronúcleos e outras anormalidades nucleares foi também mostrado por Yazici & Sisman (2014), ao avaliar o rio Karasu (Turquia), usando como bioindicador, duas espécies de peixes (*Capoeta capoeta* e *Leuciscus cephalus*). Por sua vez, Akhtar *et al.*, (2016), demonstraram que efluente industrial contendo altas concentrações de Zinco,

Cobre, Cromo, Ferro, Arsênio e Mercúrio é capaz de induzir danos ao DNA por estresse oxidativo e aumentar a frequência de mutações em ratos.

Utilizando a mesma espécie de peixe (*Sciades herzbergii*) utilizada em nosso trabalho, Carvalho-Neta & Abreu-Silva (2013) avaliaram a sua resposta biológica à presença de alguns contaminantes, como metais e HPAs, na análise de água e sedimento da Baía de São Marcos, tendo sido detectada a presença de Al, Cd, Pb, Cr, Fe, Hg, benzeno, fenóis totais, tributil-estanho e bifenilas policloradas em valores superiores ao limite aceitável pela legislação. As autoras detectaram aumento da atividade da enzima Glutathione S-Transferase e sugeriram que a contaminação presente no meio aquático induziu estresse oxidativo em fêmeas juvenis e maduras de peixes. Além disso, houve uma diminuição dos índices gonadossomáticos na região contaminada. Esses dados confirmam a contaminação química na região do Itaqui, e seu potencial prejuízo à biota aquática. Nossos achados corroboram esse cenário, uma vez que a análise química da água superficial obtida nas imediações do Complexo Portuário, durante o monitoramento da área no mês de junho de 2015 (período chuvoso), indicou que alguns elementos potencialmente tóxicos estavam em concentrações acima dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/05, como Cloro residual, Fósforo Total, Zinco, e Boro, ou próximas, como o Manganês (Mn).

As análises de sedimento no período chuvoso e seco apresentaram diferentes compostos orgânicos e inorgânicos, apesar de não terem ultrapassado os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 454/12. Assim, estes dados mostram que o Complexo Portuário do Itaqui é um ambiente contaminado por compostos químicos de origem antropogênica tais como Arsênio, Chumbo, Cobre, Cromo, Níquel, Zinco, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Criseno, Acenafteno, Acenaftileno, Antraceno, Fenantreno, Fluorantreno, Fluoreno, 2-Metilnaftaleno, Naftaleno, Pireno, Somatório de HPA's. Deve-se considerar também a possibilidade de efeitos combinados desses poluentes, mesmo que em baixas concentrações, como, por exemplo, o Cobre, que em animais interage com oligoelementos essenciais, tais como Ferro, Zinco e também com elementos não essenciais (Bagdonas e Vozyliene, 2006), o que pode explicar os danos genéticos observados neste estudo.

O efeito combinado de elementos e sua relação com mutagenicidade foi mostrado por Bagdonas e Vozyliene (2006), em um estudo onde investigaram efeitos tóxicos e

genotóxicos de Cobre, Zinco e sua mistura em trutas arco-íris, revelaram que os mais altos níveis de micronúcleos foram induzidos em peixes expostos a mistura de Cobre e Zinco, especialmente em grupos expostos a CL_{50} de 96 horas nas concentrações 0,25 mg/L e 0,0625 mg/L. Nenhuma alteração significativa na contagem de eritrócitos foi encontrada em peixes expostos, separadamente, ao Cobre e ao Zinco, no entanto, estes compostos combinado foram capazes de induzir mutações. O Cobre e o Zinco atuam como agentes aneugênicos, induzindo aneuploidia, resultando na formação de micronúcleos. Vale ressaltar, que no presente estudo, nas análises químicas da água no período chuvoso, o Zinco apresentou uma concentração de 0,519 mg/L, superando cerca de cinco vezes seu limite permissível (0,09 mg/L) para águas salobras de classe I (CONAMA 357/05), e também muito acima da maior concentração do estudo de Bagdonas e Vozyliene (2006) (0,25 mg/L). Isto poderia ser um dos fatores para o efeito mutagênico encontrado nos animais expostos as águas do entorno do Complexo Portuário do Itaqui. A legislação permite um valor de 0,09 mg/L de Zinco, no entanto, o estudo de Bagdonas e Vozyliene (2006) mostrou que mesmo na concentração de 0,0625 mg/L, quando combinado a outro elemento, como o Cobre, este pode causar efeito mutagênico nos animais. O Zn, apesar de ser essencial para o processo biológico, em altas concentrações é um composto tóxico ao organismo, pois pode se acumular no fígado, pâncreas, próstata, suco pancreático, líquido seminal (Houssay, 1969), e pode causar tumores nas gônadas (Sousa, 2009), afetando diretamente o organismo.

Sousa (2009), em uma análise química de metais traço (Cu, Pb, Zn, Cd, Ni, Fe, Al, Mn) na região da Baía de São Marcos, relatou que as concentrações de metais Cu, Pb, e Cd em água e sedimento apresentaram-se em níveis baixos, não ultrapassando os valores da legislação CONAMA, porém outros metais como o Zn em água e Al, Fe, e Mn em água e sedimento apresentaram-se em níveis elevados no período chuvoso, sugerindo uma grande disponibilidade desses elementos na baía de São Marcos. Portanto, nossos dados corroboram com todos os trabalhos que relatam a presença do Zinco, encontrado na localidade próxima ao Porto do Itaqui no período chuvoso.

A identidade química de muitas substâncias liberadas na natureza, bem como os seus metabólitos resultantes, ainda não está bem caracterizada, tornando-se necessário avaliar o potencial impacto causado pela exposição a estes agentes químicos sobre os organismos aquáticos e os consumidores de água (Van der Oost *et al.*, 2003).

As análises de água e sedimento são importantes para avaliar a contaminação de ambientes por metais pesados em sistemas fluviais, no entanto não fornecem dados reais sobre a disponibilidade dos elementos aos organismos aquáticos (Guimarães e Sígolo, 2008). Para isso, faz-se necessário correlacionar os poluentes químicos com bioindicadores, como por exemplo, a biota presente nesses ecossistemas. É importante ressaltar a necessidade de que a legislação inclua testes genotóxicos e mutagênicos para avaliar os limites permissíveis de contaminantes nos ecossistemas aquáticos, uma vez que esses testes são capazes de revelar ameaças que não podem ser detectados através de análises químicas ou físicas, e que estudos mostram que alguns contaminantes mesmo que em quantidades pequenas e seus efeitos combinados podem causar danos ao material genético podendo levar a mutações.

Pode-se inferir que o aumento da contaminação dos ecossistemas aquáticos é proveniente de vários fatores, como o excesso de descargas desses compostos nos efluentes, aumento da urbanização, expansão da atividade industrial e exploração de recursos naturais, bem como relacionado a atividades portuárias. Esses compostos, uma vez no ambiente aquático, podem transitar por diversos níveis da cadeia trófica, podendo atingir, inclusive, as populações humanas (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). Além disso, compostos mutagênicos e cancerígenos ambientais ocorrem frequentemente no ambiente aquático como misturas em vez dos compostos individuais para os quais as orientações são emitidas (Martins *et al*, 2015). Considerando-se, pois, que cerca de 80% dos agentes mutagênicos são carcinogênicos, faz-se imperativo que o monitoramento aquático seja expandido de modo a ser mensurado o risco genético de contaminantes na avaliação do risco ambiental de ecossistemas costeiros.

5. CONCLUSÃO

Os contaminantes presentes no entorno do Complexo Portuário do Itaquí são capazes de causar lesões genômicas e mutações em *Sciades herzbergii*. Esses dados mostram que as atividades humanas nessa região podem influenciar negativamente a biota aquática com risco de comprometimento dos níveis de organização superiores como populações e comunidades. Além disso, esse risco também pode estar ocorrendo para as populações humanas pela capacidade de bioacumulação de compostos causadores de danos genéticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, C. M. M., Silva, A. M. V. A., Lima, M. L. P., 2011. Aplicação de análise envoltória de dados (DEA) para medir eficiência em portos brasileiros. *Revista de Literatura dos Transportes*, vol. 5, n. 4.

Akhtar, M. F., Ashraf, M., Anjum, A. A., Javeed, A., Sharif, A., Saleem, A., Akhtar, B., 2016. Textile industrial effluent induces mutagenicity and oxidative DNA damage and exploits oxidative stress biomarkers in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 41: 180-6.

Alcântara, E. H., Santos, M. C. F. V., 2005. Mapeamento de Áreas de Sensibilidade Ambiental ao Derrame de Óleo na Região Portuária do Itaquí, São Luís, MA-Brasil. *Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Goiânia, Brasil, INPE, p. 3605-3617. Abril 16-21.

Al-Sabti, K., Metcalfe, C. D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343, 121–135.

Amado, L. L., 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., 2006. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin.* 199-206.

APHA, 2012. American Public Health Association. *Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater.* 22 ed. Washington.

Arslan, O. C., Parlak, H., Katalay, S., Boyacioglu, M., Karaaslan, M. A., Guner, H., 2010. Detection micronuclei frequency in some aquatic organisms for monitoring pollution of Izmir Bay (Western Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment*, 165, 55–66.

Ayres, M., Ayres-Jr, M., Ayres, D. L., Santos, A. A. S., 2005. *Bioestat: aplicações estatísticas na área das ciências biológicas e médicas.* Sociedade Civil Mamirauá, Belém.

Bagdonas, E., Vosyliene, M. Z., 2006. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biologija.* Nr. 1. P. 8-13.

Barbosa, J. S., Cabral, T. M., Ferreira, D. N., Agnez-Lima, S. R., Batistuzzo de Medeiros., 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (73) 320-325.

Bard, A. J., Zoski, C. G., 2002. Voltammetric Retrospective, *Anal. Chem*, 72, 364 A.

Bogoni, J. A., Armiliato, N., Araldi-Favassa, C. T., Techio, V. H. 2014. Genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Twospot *Astyanax*) exposed to the water of Engano River (Brazil) as determined by micronucleus test in erythrocytes. *Arch Environ. Contam. Toxicol.* 66:441-449.

Campos, M. L. A. M., Bendo, A., Viel, F. C., 2002. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para a determinação de metais traço em águas naturais. *Quim. Nova*, vol, 25, No. 5, 808-813.

Carvalho-Neta, R. N. F., Abreu-Silva, A. L., 2013. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 41 (2): 217-255.

Carvalho-Neta, R. N. F., Torres Junior, A. R., Silva, D., Cortez, C. M., 2014. A simple mathematical model based on biomarkers in stress-resistant catfish species, *Sciades herzbergii* (Pisces, Ariidae), in São Marcos Bay, Brazil. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 174 (7): 2380-91.

Carvalho-Neta, R.N.F., Abreu-Silva, A.L., 2010. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: an in situ study of an estuarine ecosystem (São Marcos' bay, Maranhão, Brazil). *Braz. J. Oceanogr.*, 58, 11-17.

Cavas, T., Garanko, N. N., Arkhipchuk, V. V., 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*. 43, 569-574.

CONAMA 357/05. Ministério do Meio Ambiente Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Brasília.

CONAMA 454/12. Ministério do Meio Ambiente Resolução CONAMA nº 454, de 01 de novembro de 2012. 2012. Dispõe sobre as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. Brasília.

Depledge, M.H., Aagaard, A., Györkös, R.. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 31, 19–27

Domingos, F. X. V., Assis, H. C. S., Silva, M. D., Damian, R. C., Almeida, A. I. M., Cestari, M. M., Randi, M. A. F., Ribeiro, C. A., 2009. Anthropic Impact Evaluation of Two Brazilian Estuaries Through Biomarkers in Fish. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 4, n. 1-3.

Guimarães, V, SÍngolo, J.B., 2008. Detecção de contaminantes em espécie bioindicadora (*Corbucula flumínea*). Rio Ribeira de Iguape – SP. *Química Nova*, Vol. 31, No. 7, 1696-1698.

Hooftman, R. N., Raat, W. K., 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research*, 104: 147-152.

Houssay, B. A., 1969. *Fisiologia Humana*. 4ª ed. Buenos Aires, El Ateneo, 1.318 p. il.

LABOHIDRO. 2003. Boletim do Laboidro, Zoneamento costeiro.

Martins, M., Costa, P.M., 2015. The comet assay in Environmental Risk Assessment of marine pollutants: applications, assets and handicaps of surveying genotoxicity in non-model organisms. *Mutagenesis*, 30(1): 89-106.

Martins, M., Santos, J. M., Diniz, M. S., Ferreira, A. M., Costa, M. H., Costa, P. M., 2015. Effects of carcinogenic versus non-carcinogenic AHR-active PAHs and their mixtures: lessons from ecological relevance. *Environmental Research*. Vol. 138, pag. 101-111.

Mattews, H. R., Correia, M. M. F., Sousa, N. R., 1977. Levantamento da Fauna Aquática da Ilha de São Luis (Estado do Maranhão, Brasil). I Molusca. *Bol. Lab. de Hidrobiol, São Luis*, 1(1) 9-22 Dez.

Miranda, L.B., 2002. *Princípios de Oceanografia Física de Estuários*. EdUSP, 411p.

Montserrat, J. M., Martinez, P. E., Geracitano, L. A., Lund Amado, L., Martins, C. M. G., Pinho, G. L. L., Chaves, I. S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp Biochem Physiol C* 146:221–234.

Novaes, R. C., Tarouco, J. E. F., Rangel, M. E. S., Dias, L. J. B. S., 2007. Análise da sensibilidade ambiental da parte ocidental da Ilha do Maranhão. *Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Florianópolis, Brasil, 21-26 Abril.

Oba, E. T., Mariano, W. S., Santos, L. R. B. S., 2009. Estresse em peixes cultivados: agravante e atenuante para o manejo rentável. *Embrapa Amapá*, Macapá. Cap. 8.

Ribeiro, C. A. O., Katsumiti, P., França, P., Maschio, J., Zandoná, E., Cestari, M. M., Vicari, T., Rocha, H., Assis, H. C. S., Filipak Neto, F., 2013. Biomarker responses in fish (*Atherinella brasiliensis*) of Paranaguá Bay, Southern Brazil, for assessment of pollutant effects. *Brazilian Journal of Oceanography*, 61(1): 1-11.

Ribeiro, E. B., Almeida, Z. S., Carvalho-Neta R. N. F., 2011. Hábito alimentar do bagre *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) da Ilha dos Caranguejos, Maranhão, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.6, p.1761-1765.

Rivero, C. L. G., 2007. Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do lago do Paranoá, Brasília-DF, Brasil. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina / Universidade de Brasília.

Rocha-Junior, C. L., 2015. Avaliação dos efeitos genotóxicos em hemócitos de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1928) submetidas à água de três ambientes estuarinos. Dissertação em Biodiversidade e Conservação. Universidade Federal do Maranhão.

Scalon, M. C. S., Rechenmacher, C., Siebel, A. M., Kayser, M. L., Rodrigues, M. T., Maluf, S. W., Rodrigues, M. A. S., Silva, I. B., 2010. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. *Braz. J. Biol*, vol 70, no. 4 (suppl.), p. 1217-1222.

Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutatio Research*, v. 31, p. 9-15.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Ccheider, E. L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, San Diego, v. 1, n. 175, p. 184-191.

Skurihin, I. M., 1989. *Methods of Analysis for Toxic Elements in Food Products*. 1. Mineralization Methods to determine heavy metal and arsenic According to the URSS Standart. *Journal Association of Analytical Chemistry*, v. 72, p294.

Sousa, J. K. C., 2009. *Avaliação de impactos ambientais causados por metais-traço em água, sedimento e material biológico na Baía de São Marcos, São Luis – Maranhão*. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal da Paraíba.

Tagliari, K. C., Cecchini, R., Rocha, J. A. V., Vargas, V. M. F., 2004. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutation Research* 561. 101-117.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.

Yazici, Z., Sisman, T., 2014. Genotoxic effects of water pollution on two fish species living in Karasu River, Erzurum, Turkey. *Environ Monit Assess.* 186:8007-8016.

Normas da Revista: Aquatic Toxicology

Requisitos de formatação

- Não há requisitos de formatação rigorosos, mas todos os manuscritos devem conter os elementos essenciais necessários para transmitir o seu manuscrito, por exemplo, Abstract, Keywords, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Conclusões, Arte e tabelas com legendas;
- Se o seu artigo inclui vídeos e / ou outro material suplementar, este deve ser incluído na sua apresentação inicial para fins de análise pelos pares;
- Divida o artigo em seções bem definidas;
- Verifique se o seu papel tem números de página;
- Figuras e tabelas embutidas no texto;
- Figuras e tabelas podem ser colocado ao lado do texto relevante no manuscrito ou no fundo (mas não no topo) do arquivo do manuscrito, quando todos estão incluídos em um único arquivo;

Versões da revista

- Independentemente do formato de arquivo da apresentação original, a revisão tem de nos fornecer um arquivo editável de todo o artigo;
- Mantenha o layout do texto o mais simples possível;

Estrutura do artigo

- Sessões numeradas:
- Divida o artigo em seções bem definidas e numeradas;
- Subseções devem ser numeradas 1,1 (então 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluída na numeração de seção);
- Introdução;

- Material e Métodos;
- Resultados;
- Discussão;
- Conclusão;
- Apêndices (se houver);

Informações essenciais da página de título

- Conciso e informativo. Títulos são frequentemente utilizados em sistemas de recuperação de informação. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível;
- Os nomes dos autores e afiliações. Indicar claramente o nome dado (s) e nome de família (s) de cada autor;
- Apresentar os endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo os nomes;
- Indicar todas as afiliações com uma carta sobrescrita em letras minúsculas logo após o nome do autor e em frente ao endereço apropriado;
- Fornecer o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de cada autor e-mail;
- Indicar claramente quem vai lidar com a correspondência em todas as fases de arbitragem e publicação, também pós-publicação;
- Certifique-se de que o endereço de e-mail está dado e que os detalhes de contato são mantidos atualizados pelo autor correspondente;
- Presente / endereço permanente. Se um autor se mudou desde o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava visitando na época, um "endereço Present" (ou "endereço Permanente ") pode ser indicada como uma nota de rodapé do nome desse autor. O endereço em que o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como o principal, o endereço de filiados. Algarismos arábicos sobrescrito são usados para tais notas de rodapé;

Resumo

- Máximo de 400 palavras;

Palavras-chave

- Máximo de 6 palavras- chave
- Usar ortografia americana
- Evitar termos gerais, plurais e diversos conceitos;

Obra de arte

Observações gerais

- Usar rotulação uniforme e dimensionamento da arte original;
- Fontes preferíveis: Arial (ou Helvetica), Times New Roman (ou Times). Symbol, Courier;
- Números de acordo com as ilustrações na sequência do texto;
- Usar uma convenção de nomeação lógica para os arquivos de arte;

Formatos

- Usar os seguintes formatos: EPS (ou PDF)

Legendas das figuras

- Um título breve (não na própria figura) e uma descrição da ilustração;
- Explicar todos os símbolos e abreviaturas;

Tabelas

- Texto evidente e não com imagem;
- Tabelas e números consecutivamente de acordo com seu aparecimento no texto;
- Colocar todas as notas da tabela abaixo do corpo da tabela;

Referências

- Todas as referências citadas no texto esteja presente na lista de referência (e vice-versa);
- Todas as referências citadas no resumo deve ser dada na íntegra;
- Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendadas na lista de referência, podendo ser mencionada no texto;
- Referências da web deve conter a data em que a referência foi acessado pela ultima vez;
- Referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referências) sob um título diferente, se desejado, ou pode ser incluído na lista de referências;

Estilo de referência

- autor único: o nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambiguidade) e do ano de publicação;
- Dois autores: ambos os nomes dos autores e o ano de publicação;
- Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de "*et al.*" e o ano de publicação;
- Citações podem ser feitas diretamente (ou parênteses);
- Grupos de referências devem ser listadas em ordem alfabética primeiro, em seguida, em ordem cronológica. Exemplos: 'como demonstrado (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan e Jones, 1999). Kramer et ai. (2010) têm mostrado recentemente ';
- Lista: As referências devem ser organizadas em ordem alfabética primeiro e depois ainda ordenadas cronologicamente, se necessário. Mais de uma referência do mesmo autor (es), no mesmo ano, devem ser identificados pelas letras 'a', 'b', 'c', etc., colocado após o ano de publicação;

Exemplos:

Referência a uma publicação da revista:

Van der Geer, J., Hanraads, JAJ, Lupton, RA, 2010. A arte de escrever um artigo científico. J. Sci. Commun. 163, 51-59.

Referência a um livro:

Strunk Jr., W., Branco, EB, 2000. *The Elements of Style*, quarta ed. Longman, New York.

Referência a um capítulo em um livro editado:

Mettam, GR, Adams, LB, 2009. Como preparar uma versão eletrônica do seu artigo, em: Jones, BS, Smith, RZ (Eds.), *Introdução à era eletrônica*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.