

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

Carolina Barbosa Cabral

Avaliação de Danos Genômicos em Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus*) Expostos a
Sedimentos Contaminados por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos no Estuário do
Rio Potengi (Natal/RN)

Recife
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

Carolina Barbosa Cabral

Avaliação de Danos Genômicos em Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus*) Expostos a Sedimentos Contaminados por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos no Estuário do Rio Potengi (Natal/RN)

Dissertação apresentada ao Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oceanografia.

Área de concentração: Oceanografia Abiótica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Eliete Zanardi-Lamardo

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Mônica Lúcia Adam

Recife
2017

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Rosineide Mesquita Gonçalves Luz / CRB4-1361 (BCTG)

- C117a Cabral, Carolina Barbosa.
Avaliação de danos genômicos em Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus*) expostos a sedimentos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no Estuário do Rio Potengi (Natal/RN) / Carolina Barbosa Cabral. – 2017.
78 f., il., gráfs., tabs.
- Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliete Zanardi-Lamardo.
Co-orientadora: Prof.^a Dr^a. Mônica Lúcia Adam.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CTG. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2017.
Inclui Referências e Apêndice.
1. Oceanografia. 2. Dano genômico. 3. Teste de micronúcleo.
4. Ensaio cometa. 5. GC-MS. I. Zanardi-Lamardo, Eliete (Orientadora). II. Adam, Mônica Lúcia (Co-orientadora). III. Título.

551.46 CDD (22. Ed.)

UFPE/BCTG/2017- 238

Avaliação de Danos Genômicos em Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus*)
Expostos a Sedimentos Contaminados por Hidrocarbonetos Policíclicos
Aromáticos no Estuário do Rio Potengi (Natal/RN)

Dissertação apresentada ao Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oceanografia.

Área de concentração: Oceanografia Abiótica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Eliete Zanardi-Lamardo

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Mônica Lúcia Adam

Carolina Barbosa Cabral

Defendida e aprovada em 25 de Abril de 2017

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Eliete Zanardi Lamardo (Orientadora) – Presidente
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Márcia Caruso Bicego (Titular externo)
Universidade de São Paulo

Prof. Paulo Sérgio Martins de Carvalho (Titular externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rodrigo Adam Torres (Suplente externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Lília Souza Santos (Suplente interno)
Universidade Federal de Pernambuco

*À minha família e amigos por todo
apoio proporcionado durante o
período do mestrado*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a força superior que nos rege, pela oportunidade da realização pessoal, por colocar pessoas tão especiais no meu caminho, que me auxiliam e estão presentes nos momentos que mais preciso.

À minha orientadora Eliete Zanardi Lamardo que também faz função de amiga, mãe e psicóloga. Obrigada por todos ensinamentos, cobranças, companheirismo e, principalmente, por sempre acreditar e me estimular a superar os desafios. Sou uma pessoa muito mais realizada depois que o OrganoMAR abriu as portas para mim, e eu devo muito do meu amadurecimento a você. Espero levar essa amizade pra vida.

À minha co-orientadora Mônica Lúcia Adam, que me deu a oportunidade dessa parceria, engrandecendo meu trabalho com a parte genética. Obrigada pela confiança e auxílio.

Ao professor Gilvan Takeshi Yogui sempre disposto a ajudar e contribuir a qualquer um que bate em sua porta.

Ao Anderson Rodrigues do Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (LAGEA), por todo carinho, ajuda e simpatia; mesmo quando estava super atarefado nunca deixou de contribuir sempre com um sorriso no rosto.

Ao professor Natan Pereira, por toda disponibilidade e atenção na produção do mapa.

À equipe OrganoMAR, que me falta palavras do quanto vocês foram importantes pra mim, se tornaram parte da minha família, dividindo não só as tarefas do laboratório. Foram um grande apoio nas dificuldades além vida acadêmica. Muitas vezes meus dias ficaram mais leves só de estar perto de vocês, e me sentir a vontade pra poder rir, chorar, ser eu mesma e me sentir apoiada. Obrigada a todos pelo convívio! Cada um com sua particularidade completava um pouco o que somos no conjunto. Aos que continuam... Obrigada Gabi pelas conversas, conselhos e companhia nos últimos dias de mestrado. Doctor Bruno Varela, uma das pessoas mais doces que conheço nessa vida, meu vizinho de bancada! Obrigada por toda ajuda, você é uma pessoa muito especial, e eu ainda pretendo te aperrear muito!!

Aos egressos, minha saudade de todos os dias! Daniele Miranda obrigada por todo apoio, por todas risadas e conversas sinceras. Mesmo com a distância a união só aumentou, e eu sou muito feliz por isso. Jéssica Resende (Jeca!) seu jeitinho doidinha é o maior encanto, obrigada por todos os momentos vividos naquele laboratório. Josineide fancy!!! Um dia eu chego lá! Obrigada por todos os conselhos. Débora Bezerra obrigada pelo apoio, pelos conhecimentos e por todos os bons momentos compartilhados.

À Daniele Maciel, que Deus colocou no meu caminho, com tanta experiência e filosofia de vida em comum. Se um dia eu tiver um pedacinho do amor que você tem no coração, eu já vou ter aprendido bastante coisa nessa vida. Obrigada por se doar tanto às pessoas ao seu redor, seja no lado profissional ou pessoal. Quero você pra sempre na minha vida.

Ao meu tripé, meu corporativismo, companheiras, amigas! Amanda Vieira-Campos e Roxanny Helen, são tantos momentos vividos. Vocês são um grande presente que o OrganoMAR me deu. Eu sei o quanto posso contar com vocês, e espero que vocês se sintam da mesma forma em relação a mim. Espero que esses últimos anos sejam só uma parte do muito que a gente ainda tem pra viver juntas! Obrigada por tudo!

Ao Luiz Gustavo de Oliveira por toda ajuda nas coletas e apoio durante o mestrado, sua participação foi fundamental no andamento do trabalho.

Ao meu pai, Gilvandro Cabral, pelo apoio e encorajamento. Por acreditar em mim e mostrar o valor das minhas escolhas quando as vezes eu mesma não as enxergava. Obrigada por estar cada vez mais presente na minha vida.

A minha mãe, Maria Helena Barros, que é minha base e meu apoio. Obrigada por toda dedicação e amor.

Aos meus irmãos Gilvandro Junior e Gabriel Barbosa, por todo companheirismo! Deus não podia ter escolhido pessoas melhores para me acompanhar nessa jornada que é a vida.

O resultado deste trabalho vai além de um processo de análises e pesquisas, leva um pouco das experiências e suporte de cada um citado acima e de tantas outras pessoas que cruzaram meu caminho e deixaram um pouco de si. Obrigada a todos!

*“Age, em favor dessa ou daquela
causa, e essa mesma causa, pelas
forças que a representam, agirá em
teu próprio favor”
(Emmanuel)*

Resumo

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos prioritários em estudos ambientais devido a sua toxicidade para os sistemas biológicos. Estes são conhecidos precursores de efeitos carcinogênicos e mutagênicos para animais e humanos. O estuário do Rio Potengi/Jundiaí é o mais importante do Rio Grande do Norte e, além de servir como berçário para diversos organismos, este abriga o Porto de Natal, terminal pesqueiro, indústrias, etc., cujas atividades podem estar ameaçando a saúde deste ecossistema. Visando investigar danos genômicos em caranguejo e associar a contaminação do sedimento por HPAs no estuário do Rio Potengi - Natal (RN), foram coletados caranguejos-uçá (*Ucides cordatus*) e sedimentos da sua loca em 4 diferentes estações ao longo do estuário. A contaminação dos sedimentos por HPA foi avaliada em paralelo aos efeitos genotóxicos nestes caranguejos. As concentrações de HPAs foram determinadas através do método de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massas, e as alterações genéticas foram avaliadas pelo teste de micronúcleo (macrolesões) e ensaio cometa (microlesões). As concentrações dos HPAs totais variaram de 3,25 ng g⁻¹ a 1065 ng g⁻¹, sendo uma estação classificada como pouco contaminada, e as demais como moderadamente contaminadas. Alguns compostos apresentaram concentrações acima do nível limiar de efeito adotado pela Agência Ambiental do Canadá, sugerindo que ocasionalmente podem causar efeitos tóxicos aos organismos locais. A frequência de micronúcleos nos Caranguejos-Uçá foi significativamente maior que no controle (*U. cordatus* coletados na Estação Ecológica da Juréia), e correlacionaram positivamente com os HPAs, sugerindo que estes sejam potenciais agentes causadores desta genotoxicidade. Os resultados do ensaio cometa não apresentaram correlação com os HPAs e nem com a frequência de micronúcleos, sugerindo que outras variáveis ambientais e/ou compostos lançados no ambiente sejam os principais responsáveis pelas microlesões observadas. Este estudo mostra que a poluição crônica por HPAs no estuário do Rio Potengi/Jundiaí está contribuindo com danos genômicos nos *U. cordatus*, podendo ameaçar a conservação destes organismos, que já estão na lista de espécies sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração. A abordagem utilizada neste trabalho foi eficaz na avaliação da saúde do caranguejo-Uçá, porém estudos complementares utilizando outras classes de contaminantes e outros tipos de medidas biológicas são necessárias.

Palavras-chave: Dano genômico. Teste de micronúcleo. Ensaio cometa. GC-MS.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are priority organic compounds in environmental studies due to their toxic potential to biological systems. They are known carcinogenic and mutagenic precursors to animals and humans. The Potengi/Jundiaí is the most important estuary in Rio Grande do Norte and, besides serving as a nursery for various organisms, it houses the Port of Natal, fishing terminals, industries, etc., that may be threatening the health of this ecosystem. This study aimed to investigate genomic damages on crabs and test the correlation with PAH contamination in sediments from Potengi estuary, in Natal (RN). Uçá-crabs (*Ucides cordatus*) and sediments from their burrow were collected in 4 different stations along of estuary. PAHs concentrations were determined by gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, and the genetic alterations were evaluated by micronucleus test (macrolesions) and comet assay (microlesions). Total PAHs ranged from 3.25 ng g⁻¹ to 1065 ng g⁻¹. One station was classified as low contaminated, and the others as moderately contaminated. Some compounds showed concentrations above threshold effects level, proposed by Environment Agency of Canada, suggesting that occasionally they may cause toxic effects to local organisms. Micronuclei frequency in Uçá crabs was significantly higher than the control site (*U. cordatus* collected at Juréia - Itatins Ecological Station), and a positive correlation with PAHs was observed, pointing out these compounds as important stressors to the genotoxic effects observed. There was no correlation between comet assay and PAH or micronuclei frequency, indicating that some other environmental variables and/or compounds are the major responsible for the observed microlesions. This study showed that PAHs chronically introduced in the Potengi/Jundiaí estuary may threaten the conservation of *U. cordatus*, which is already listed as an overexploited species or under threat of overexploitation. The methodology used was efficient in the evaluation of these crabs' health, but complementary studies investigating other classes of contaminants and others biological measures are necessary.

Key-words: Genomic damage Micronuclei test. Comet assay. GC-MS.

Lista de Ilustrações

Introdução

Figura 1. Estrutura química e potencial efeito tóxico dos 16 HPAs prioritários em estudos ambientais (EPA, 1987).....	20
Figura 2. Esquema da formação de câncer pela exposição à carcinógenos.	22
Figura 3. Processo de formação do micronúcleo (MN).	25
Figura 4. Partes do núcleo (núcleo e cauda do cometa), formados a partir do processo de eletroforese.....	26
Figura 5. Zoneamento Ambiental de Natal.	28

Manuscrito

Figure 1. Sediments and crabs sampling sites in mangroves at Potengi/Jundiaí estuary: stations A, B, C and D. November, 2015. The Ecological Station of Juréia is indicated in the upper left figure.....	36
Figure 2. Trend line showing the relation among PAHs (ng g^{-1}) and micronuclei frequency.....	45
Figure 3. Pictures of the 5 level-damage imagens (comet tail) observed at Uçá crabs hemolymph from Potengi/Jundiaí estuary, November 2015.....	46
Figure 4. Ordination results of the principal component analysis (PCA) based on micronucleus frequency (MN), damage index, crabs weight, PAHs concentrations, organic matter (%) and fines (%).....	48

Lista de Tabelas

Manuscrito

Table 1. Coordinates of stations collection from Potengi/Jundiaí estuary (Natal/RN) and Juréia (J).....	35
Table 2. PAH concentration (ng g^{-1}) range and median in sediment samples from Potengi/Jundiaí estuary, and TEL/PEL proposed values.....	41
Table 3. Total PAHs concentrations in mangrove sediments worldwide.....	42
Table 4. Damage Index (DI) calculated for Uçá crabs from Potengi/Jundiaí estuary (Natal/RN)	47
Table 5. Ordination results of the principal component analysis (PCA) with loads of each compound and micronucleus frequency.....	49

Supplementary Material

Table 1. PAHs concentration (ng g^{-1}), percentage of organic matter and fines in sediments, and mean $\pm$ standard deviation of micronuclei (MN $\pm$ SD) in organisms collected from Potengi/Jundiaí estuary and Juréia.	62
---	----

Apêndice

Tabela 1. Coordenadas das estações de coleta de sedimento e caranguejo no Estuário do Rio Potengi. 24 e 25 de novembro/2015.....	73
---	----

Lista de Abreviações e Siglas

Aen	Acenaphthene
An	Anthracene
Ayl	Acenaphthylene
BaA	Benz[a]anthracene
BaP	Benzo[a]pyrene
BbF	Benzo[b]fluoranthene
BghiP	Benzo[ghi]perylene
BkF	Benzo[k]fluoranthene
Ch	Chrysene
DF	Damage Frequence
DI	Damage Index
DhA	Dibenz[a,h]anthracene
EI	Eletrons Ionization
EPZ	Evironmental Protection Zoning
F	Fluorene
Fl	Fluoranthene
GC-MS	Gas Chromatograph - Mass Spectrometer
HA	Hidrocarbonetos Alifáticos
HC	Hidrocarbonetos
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HMW	High Molecular Weight
IP	Indeno[1,2,3-cd]pyrene
J	Juréia
JIES	Juréia - Itatins Ecological Station
KOW	Octanol/Water partition coefficients
LM	Low Melting
LMW	Low Molecular Weight
LQ	Limite de Quantificação
OM	Organic Matter
MN	Micronuclei
MNF	Micronuclei Frequence
N	Naphthalene

ND	Não Detectado
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PCA	Principal Component Analysis
PEL	Probable Effect Level
Pn	Phenanthrene
Py	Pyrene
SIM	Selected Ion Monitoring
St	Station
SRM	Reference Material
TEL	Threshold Effect Level
USEPA	United State Environmental Protection Agency
ZPA	Zoneamento de Proteção Ambiental

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	POLUIÇÃO EM ÁGUAS COSTEIRAS	18
2.2	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs).....	18
2.3	GENOTOXICIDADE	21
2.4	TESTE DE MICRONÚCLEO	23
2.5	ENSAIO COMETA ALCALINO	25
2.6	ORGANISMO TESTE	26
2.7	ESTUÁRIO DO RIO POTENGI.....	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
	MANUSCRITO	30
	ABSTRACT	31
1	INTRODUCTION	32
2	MATERIALS AND METHODS	34
2.1	STUDY AREA	34
2.2	SAMPLING.....	34
2.3	SEDIMENT ANALYSIS	36
2.3.1	Organic matter and Grain size analysis	36
2.3.2	PAH extraction in sediment.....	37
2.4	BIOLOGICAL ANALYSIS	38
2.4.2	Comet assay alkaline	38
2.4.3	Micronuclei test.....	38
2.6	STATISTICAL ANALYSIS	39
3	RESULTS AND DISCUSSION	39
3.1	SEDIMENT ANALYSIS	39
3.3	ADVERSE BIOLOGICAL EFFECTS.....	42
3.4	GENOTOXIC EFFECTS ON UCIDES CORDATUS	43
3.4.1	Principal genotoxic compounds.....	48
4	CONCLUSION	51
5	REFERENCES	52
	SUPPLEMENTARY MATERIALS	62
6	CONCLUSÃO GERAL	63

REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE: MATERIAIS E MÉTODOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Muitos centros urbanos se instalaram em zonas costeiras devido à facilidade de acesso a outros estados e continentes, garantindo a viabilidade de importação e exportação do material produzido e/ou extraído (ANTAQ, 2008; LI *et al.*, 2016). A acessibilidade local atraiu indústrias, proporcionou empregos e o desenvolvimento das cidades, porém, muitas vezes este crescimento aconteceu de forma desordenada e com precariedade de infraestrutura. A oferta de alimento proveniente das águas costeiras também são fatores preponderantes para a sobrevivência da sociedade, uma vez que a população ribeirinha retira do ambiente o seu próprio sustento, de forma direta ou indireta, através da pesca comercial ou de subsistência. Além disso, a beleza local atrai turistas e serve como opção de lazer, através passeios com balsas, jetskis e outros esportes aquáticos.

Estuários são regiões costeiras muito interessantes do ponto de vista ecológico, social, econômico e turístico, pelos muitos atrativos e/ou facilidades que oferecem. Por definição, são ambientes transicionais entre o rio e o mar, onde há mistura das águas doce e salgada e recebem a influência de fatores bióticos e abióticos dos dois ecossistemas (FRANÇA & CABRAL, 2016; FLORES *et al.*, 2017). Os estuários são as áreas mais produtivas do ambiente marinho e servem como berçário e habitat para diversas espécies marinhas e estuarinas (CONSTANZA *et al.*, 1997; FLORES *et al.*, 2017). Espécies migratórias utilizam estuários para reprodução, desenvolvimento e abrigo. Organismos estuarinos são tolerantes a variação de salinidade e episódios de inundações, como é o caso dos mangues e espécies associadas (ADAMS *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, os estuários têm recebido especial atenção dos órgãos governamentais e pesquisadores ambientalistas, pela preocupação crescente que estas pressões antrópicas provenientes das atividades urbanas, industriais e turísticas podem causar (ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2000). Algumas atividades podem alterar gradativamente a qualidade do ambiente terrestre e aquático, sem que a população perceba esta degeneração. Entre os vetores mais comuns podemos citar os efluentes industriais e domésticos, lançados de forma direta ou indireta nos rios, sem nenhum tratamento prévio ou tratados de forma inadequada. Estes dejetos podem conter elevada carga de contaminantes inorgânicos e orgânicos, tais como o petróleo e seus derivados, superando a capacidade de “autodepuração” dos corpos d’água (BÍCEGO *et al.*, 2008; ANDRADE, 2010). Outro importante contribuidor para a degradação dos ambientes

aquáticos são as atividades portuárias e/ou náuticas através do derrame e queima dos combustíveis fósseis (NRC, 2003).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) fazem parte da composição do petróleo e derivados e são lançados também através da queima incompleta da matéria orgânica, podendo ser capaz de interagir com diferentes matrizes ambientais. Estes são conhecidos pelo seu potencial tóxico à biota local e, dentre os efeitos prováveis, se destacam a carcinogenia e mutagenicidade em sistemas biológicos, alterações no sistema endócrino e mudanças comportamentais (WHO, 1983; SAMANTA *et al.*, 2002; HARTMANN *et al.*, 2005; TORREIRO-MELO, *et al* 2015). Os HPAs podem afetar direta ou indiretamente a molécula de DNA, levando a mutações genéticas (NETTO *et al.*, 2000). Essas anomalias podem levar à morbidade, à perda reprodutiva e à mortalidade dos organismos (FREIRE *et al.*, 2008; TORREIRO-MELO, *et al* 2015), resultando numa redução da população/qualidade do pescado, gerando um desequilíbrio ecológico e, conseqüentemente, provocando alterações socioeconômicas através da perda de rendas.

Na região Nordeste é muito comum o consumo de peixes e crustáceos e, dentre eles, algumas espécies se destacam, como é o caso do Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus*). Devido à coleta desenfreada, sua exploração está sob controle do governo federal (IBAMA, 1989 e 1998). O manguezal, que é o habitat do *U. cordatus*, é considerado uma área de proteção permanente. Os órgãos ambientais brasileiros têm se empenhado em fazer cumprir estas leis referentes à defesa dos recursos marinhos. Em janeiro de 2014, estabelecimentos no litoral do Rio Grande do Norte, que não respeitaram o período de defeso do *Ucides cordatus*, receberam multas que geraram um total de R\$10.800,00, além da apreensão de 1.014 organismos (IBAMA, 2014). Entretanto, só a proteção do organismo não é suficiente para garantir sua integridade, sendo necessário também a preservação e o monitoramento do ambiente onde vivem.

Diante de tal preocupação, este projeto analisou um fator biótico e um compartimento abiótico para caracterizar as condições ambientais do mangue do Rio Potengi (RN). Foi investigada a presença e concentrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos do mangue, avaliando a possível associação entre os contaminantes aos efeitos genotóxicos observados em Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus*).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 POLUIÇÃO EM ÁGUAS COSTEIRAS

As regiões litorâneas tendem a serem as mais populosas, principalmente nas capitais e no entorno dos maiores portos do país (ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2000). A demanda de mão de obra devido o adensamento de empresas e instalação de portos, o turismo (oferta de emprego) e a disponibilidade de alimento, são os principais fatores que justificam a grande quantidade de pessoas que ocupam essas áreas. As zonas costeiras do Brasil mais densamente ocupadas são as Regiões Sudeste e Nordeste (IBGE, 2004). No entanto, esta ocupação aconteceu de forma desordenada e sem um planejamento ambiental.

A intensa urbanização associada à carência de saneamento básico pode levar a situações caóticas ambientais, com implicações sobre a qualidade da água no litoral, afetando a pesca, áreas de restinga e manguezais. A descarga de efluentes, derramamento de óleo e dragagens dos portos também são importantes vias da contaminação costeira (TOMMASI, 1989; NRC, 2003). Estudos ambientais mostram que a descarga de efluentes e resíduos sólidos nos corpos d'água atingem ecossistemas e organismos marinhos em diversas escalas. Estes efeitos podem ser lesões causadas pela ingestão de materiais plásticos, como observado em estômagos de tartarugas-verdes, nas praias do Rio de Janeiro (AWABDI *et al.*, 2013); modificações no DNA, registrado em mexilhões marinhos na costa oriental do mediterrâneo (KASIOTIS *et al.*, 2015) e em Caranguejos Uçá coletados na Baía de Guanabara (NUDI *et al.*, 2010).

Infelizmente, o potencial tóxico da descarga de efluentes não é só observado em ambientes de alto adensamento populacional. Um estudo feito na Antártica, uma região afastada de grandes centros populacionais, obteve registro de danos genéticos em crustáceos coletados nas proximidades da Estação de Pesquisa Brasileira "Comandante Ferraz", numa área sob a influência de lançamentos de esgoto, tanques de combustíveis e vazamento de óleo (ROCHA *et al.*, 2015). Segundo estes autores, os danos possivelmente estão associados a compostos orgânicos, e dentre eles, os HPAs.

2.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)

Os hidrocarbonetos são moléculas formadas por átomos de carbono e hidrogênio. Estes se originam pela decomposição da matéria orgânica em condições de

anoxia, alta pressão e alta temperatura, como acontece na formação do petróleo. Além disto, também são formados durante a queima incompleta da matéria orgânica, pela biossíntese de algas, bactérias e plantas terrestres e/ou por diagênese (transformação bioquímica da matéria orgânica) (VOLKMAN *et al.*, 1992; CANUTO, 2002; BÍCEGO *et al.*, 2008). Os HCs se dividem em dois grandes grupos: alifáticos e aromáticos, diferenciando-se de acordo com sua estrutura química.

Os hidrocarbonetos alifáticos (HAs) são formados por estruturas lineares, ramificadas ou cíclicas. Podem ter ligações simples, duplas ou triplas, mas não apresentam anel benzênico na sua composição (BÍCEGO *et al.*, 2008). Os hidrocarbonetos aromáticos são caracterizados pela presença de um ou vários anéis benzênicos conjugados, sendo denominados como hidrocarbonetos mono ou policíclicos aromáticos (HPAs).

Os HPAs possuem baixa solubilidade em água e altos valores de log de Kow (coeficiente de partição octanol-água), entre 3,37 e 6,75 (CARUSO & ALABURDA, 2008; BARROSO, 2010). O Kow é uma medida de afinidade que classifica os compostos em hidrofílicos ou lipofílicos, sendo que quanto maior o valor, maior a afinidade com lipídios. Devido ao caráter hidrofóbico e lipofílico, os HPAs tendem a se adsorver em material particulado (biótico ou abiótico), tendo como destino final os sedimentos (AGOSTINHO & FLUES, 2006). Os HPAs depositados podem sofrer processo de ressuspensão para a coluna d'água, através das correntes estuarinas ou serem ingeridos por organismos.

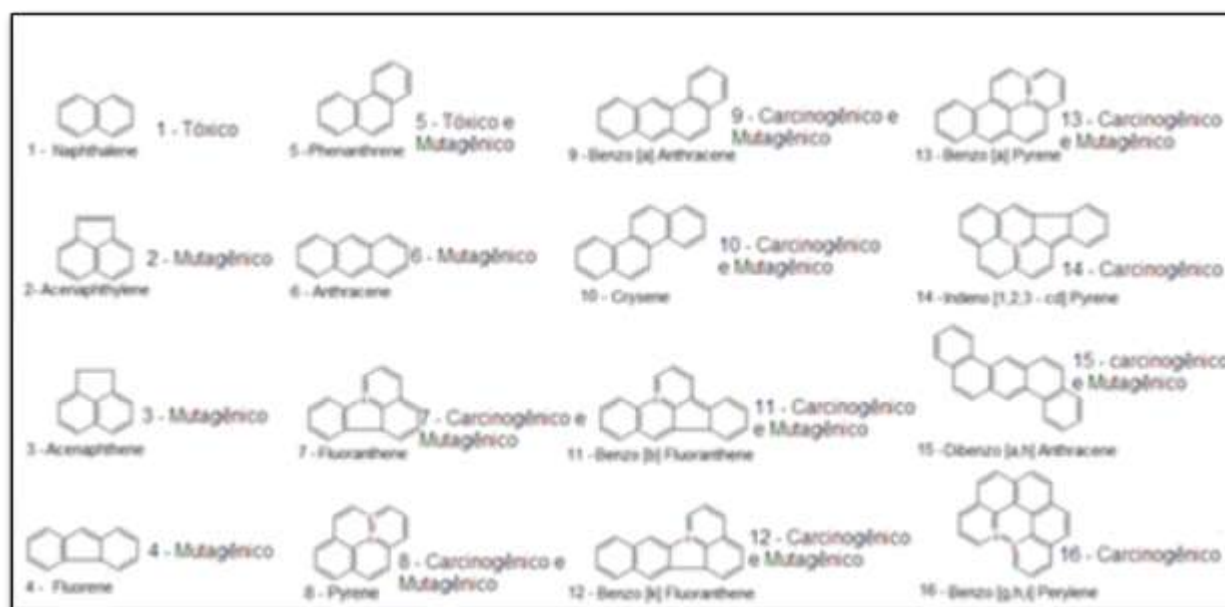
Os HPAs estão presentes na composição dos combustíveis fósseis como petróleo, gás natural e carvão, e também nos biocombustíveis como ceras, solventes, e óleos, amplamente utilizados para geração de energia (IRWIN *et al.*, 1997, NRC, 2003). Por esta razão, a análise de HPAs em diferentes matrizes é uma importante ferramenta para indicar a influência das atividades antrópicas no ecossistema.

Os HPAs têm sido alvo de muitos estudos ambientais devido, principalmente, ao seu potencial tóxico (CARRERAS *et al.*, 2013; BARHOUMI *et al.*, 2016; CAI *et al.*, 2016). Estes compostos causam alterações comportamentais e físicas, como diminuição da velocidade e da resistência natatória e diminuição da acuidade visual em juvenis do peixe *Poecilia vivipara* (MELO, 2011), alterações nas trajetórias da natação espontânea, que se restringiram a uma área menor após exposição à compostos aromáticos (TORREIRO-MELO *et al.*, 2015) e decréscimo da fecundidade total do copépoda *Tisbe*

biminiensis (Copepoda, Harpacticoida) exposta a sedimentos contaminados com HPAs (TORREIRO-MELO, 2010).

A USEPA (United States Environmental Protection Agency), considerando a toxicidade de alguns HPAs, principalmente os que são conhecidamente precursores de efeitos carcinogênicos e mutagênicos, propôs uma lista de 16 que deveriam constar em programas de monitoramento e passaram a ser considerados prioritários (Figura 01).

Figura 1. Estrutura química e potencial efeito tóxico dos 16 HPAs prioritários em estudos ambientais (EPA, 1987).



Fonte: Adaptado de FRONZA, 2006.

Inúmeros estudos investigam a presença dos HPAs em diversas matrizes ambientais (MACIEL *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2016; CAI *et al.*, 2016; DUDHAGARA *et al.*, 2016), mas não fornecem evidências diretas dos efeitos que possam estar causando aos organismos. Em laboratório, vários experimentos são realizados com o intuito de conhecer, isoladamente, e sob condições controladas, os potenciais efeitos que determinados compostos causam (CEREZO & AUGUSTÍ, 2015; ERTL *et al.*, 2016; PAUL-PONT *et al.*, 2016). Recentemente, o número de estudos que buscam, em organismos retirados do próprio ambiente, respostas de exposição a estes contaminantes, tem crescido (NUDI *et al.*, 2007; 2010; FREIRE *et al.*, 2008; ADAM *et al.*, 2010). A complexidade do estudo dos efeitos tóxicos de contaminantes nos organismos presentes no ambiente natural está na grande quantidade de fatores que influenciam no resultado e interpretação dos dados. Uma série de parâmetros físicos e

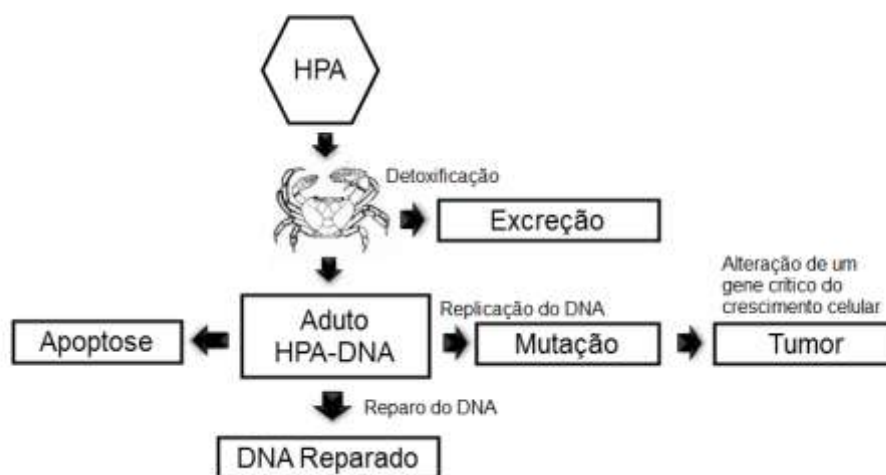
químicos, tais como a presença de outros contaminantes e a fisiologia do próprio caranguejo podem alterar os resultados, mas este tipo de resposta pode gerar conclusões expressivas sobre a condição do ambiente e a saúde do organismo. Tais resultados norteiam os tomadores de decisões e órgãos ambientais sobre as melhores ações mitigadoras a serem implantadas, a fim de promover a manutenção da fauna, garantir a qualidade e quantidade do pescado, proteger o meio ambiente e, conseqüentemente, a saúde humana. Diante da importância que o litoral brasileiro possui nos âmbitos ambiental e comercial, é pertinente e necessário avaliar a qualidade dos ambientes estuarinos, visando não só compartimentos abióticos, como água e sedimento, mas principalmente dos animais que ali habitam.

2.3 GENOTOXICIDADE

Mutações são alterações que ocorrem no material genético capazes de serem transmitidas para os descendentes (OGA *et al.*, 2008). As mutações podem ocorrer naturalmente e são essenciais para a manutenção das espécies, já que estas são a fonte de variabilidade genética e a forma de adaptação dos organismos às mudanças ambientais. Porém, algumas modificações genéticas são induzidas por substâncias presentes no meio ambiente (agentes genotóxicos) ou agentes estressores, como alterações na temperatura ou fadiga (ADAM *et al.*, 2010). Estas alterações podem interferir na fertilidade, reprodução, morbidade e mortalidade dos organismos, alterando o balanço dos ecossistemas (MARNETT & PLASTARAS, 2001). Agentes genotóxicos possuem a capacidade de interagir com o DNA, proporcionando alterações estruturais e funcionais (OGA *et al.*, 2008). Os compostos químicos podem causar mutações de diferentes formas. Por exemplo, as moléculas análogas a bases nitrogenadas podem causar erros no pareamento; outras substâncias agem diretamente no DNA, como o ácido nitroso que causa a desaminação oxidativa de bases nitrogenadas; agentes intercalantes se posicionam na parte interna da dupla hélice modificando a informação genética ou lesionando a molécula de DNA (p.ex., agentes alquilantes adicionam grupo alquila ao material genético). Os HPAs estão inseridos dentre os principais compostos carcinogênicos e fazem parte deste grupo de intercalantes (OGA *et al.*, 2008). Os compostos mutagênicos estão presentes em diversas matrizes do ambiente (água, solo e ar), e são provenientes principalmente de alterações ambientais causadas por atividades antrópicas, como pela introdução de contaminantes (BÜCKER *et al.*, 2006).

Os HPAs, no organismo, tendem a ser metabolizados para facilitar sua excreção, mas, ao serem modificados por enzimas catalizadoras, estes podem ficar reativos. Dentre os processos de ativação dos HPAs, o mais conhecido é a oxidação enzimática (STANSBURY, FLESHER & GRUPTA, 1994; HARVEY, 1996; NETTO, 2000, BERNARDO *et al.*, 2016). As famílias de proteínas catalisadoras que se destacam na biotransformação do HPA são as P450, que promovem reações como oxidação, redução e hidrólise (MUTTI & BERGAMASCHI, 1996; ANGERER *et al.*, 1997). As enzimas agem na região angular da molécula de HPA (devido à elevada densidade eletrônica) formando produtos reativos, capazes de se ligar às bases nitrogenadas (MUTTI & BERGAMASCHI, 1996; ANGERER *et al.*, 1997; DUTRA, 2007; NETTO *et al.*, 2000). Dentre as diversas consequências da interação destes compostos com o DNA, estão inclusos os processos mutagênicos, desenvolvimento de cânceres e fragmentação do DNA (URIBE-HERNANDEZ & PEREZ-ZAPATA, 2005). Exemplificando, se esta mutação que altera genes críticos que atuam no crescimento celular não for reparada, e a célula passar por ciclos celulares consecutivos, ocorrerá a formação do tumor (NETTO *et al.*, 2000) (Figura 02).

Figura 2. Esquema da formação de câncer pela exposição à carcinógenos.



Fonte: Autoria própria.

O potencial genotóxico de alguns HPAs vem sendo bastante estudado, como é o caso do Benzo[a]pireno (BaP) (CARUSO & ALABURDA, 2008). O produto da metabolização do BaP é o BaP diol epóxido, que possui a capacidade de se ligar ao DNA, e apresenta maior afinidade com células epiteliais de animais e humanos do que o seu precursor (OGA *et al.*, 2008). Este processo pode gerar mutações ou até mesmo, o

câncer. Estudo laboratorial mostrou a capacidade do aduto HPA-DNA causar a perda de funções de proteínas hepáticas em fígados de rato (ARLT *et al.*, 2012) e um estudo de campo identificou uma ineficiência da função de reparo do DNA de motoristas de ônibus expostos a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos do ambiente (CEBULSKA-WASILEWSKA *et al.*, 2007). Apesar de alguns HPAs serem conhecidos pelo seu potencial carcinogênico e mutagênico para organismos e até mesmo para humanos, há uma ineficiência na implantação de ações necessárias para o controle dos problemas ambientais causados por estes compostos (CONAMA, 2000).

Uma forma interessante de avaliar os impactos destes contaminantes é medir, *in situ*, os efeitos deletérios que essas substâncias estão causando sobre organismos. O teste de micronúcleo, pela sua facilidade metodológica e baixo custo, tem sido utilizado para avaliar macrolesões genéticas, funcionando como um potente biomarcador de efeito, que reflete a interação de substâncias químicas com as moléculas de DNA (AMORIM, 2003; VIARENGO *et al.*, 2007). O ensaio cometa também está na lista das ferramentas utilizadas para avaliar o potencial genotóxico de compostos encontrados no meio ambiente. Este é um método que avalia microlesões no DNA, e pode detectar desde pequenas quebras da fita de DNA até a apoptose celular (LEE & STEINERT, 2003; AUGUSTYNIAK *et al.*, 2014). A aplicação conjunta do teste de micronúcleo (macrolesão) e do ensaio cometa (microlesão) permite uma avaliação mais completa do nível de estresse do local.

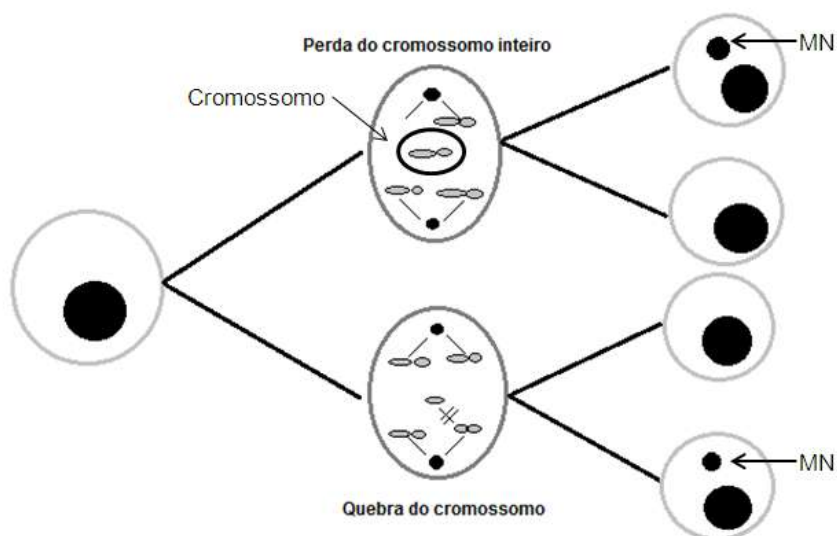
2.4 TESTE DE MICRONÚCLEO

O teste de micronúcleo é um método que avalia macrolesões no material genético. Macrolesões são mutações que atingem porções maiores do DNA, como perda de parte do cromossomo (OGA *et al.*, 2008). Os micronúcleos (MN) são núcleos semelhantes ao núcleo principal, porém formados por fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo principal devido a erros anafásicos no que se referem ao fuso mitótico e, portanto, são observados somente após um ciclo completo de divisão celular (Figura 3) (FENECH *et al.*, 1997; BONASSI *et al.*, 2007). Os MN podem ser formados através do estresse oxidativo, gerado pelo desequilíbrio de compostos oxidantes; através da geração de radicais livres resultantes do metabolismo do oxigênio (BARBOSA *et al.*, 2010); defeitos genéticos nos pontos de checagem do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA (OGA *et al.*, 2008); exposição à clastógenos, que são agentes capazes de causar a quebra cromossômica,

e/ou aneugênicos, agentes que interferem no fuso mitótico (COELHO *et al.*, 2007); e por deficiências em nutrientes necessários no metabolismo do DNA (MACGREGOR, 1990; UMEGAKI *et al.*, 2000; CROTT *et al.*, 2001; RAJAGOPALAN *et al.*, 2004; FENECH *et al.*, 2005). Portanto, a exposição a agentes mutagênicos pode levar à formação de micronúcleos através de quebras cromossômicas, aneuploidias (variação no número de pares dos cromossomos) e expressão gênica alterada, caracterizando, assim, um fenótipo de instabilidade cromossômica/genômica (FENECH, 2002; BONASSI *et al.*, 2007; TEIXEIRA, 2007).

As células podem conter mais de um micronúcleo, que são identificados por algumas características: estrutura da cromatina similar e intensidade da cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal, possuir borda evidente sugerindo membrana celular, ter formato arredondado, localização intracitoplasmática, diâmetro menor que 1/5 do núcleo principal (TOLBERT, SHY & ALLEN, 1992). Esta técnica tem sido usada para testes genotóxicos de células expostas a contaminantes, servindo também como biomarcador da genotoxicidade de ambientes poluídos em diferentes partes do mundo. Peixes de rios e estuários contaminados apresentaram um aumento na frequência de micronúcleo (ADAM *et al.*, 2010; ARSLAN *et al.*, 2015; GUTIÉRREZ *et al.*, 2015), assim como observado em Caranguejo-Uçá em mangues de São Paulo e Rio de Janeiro (NUDI *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2016). No mangue de Cubatão/São Paulo, a frequência de micronúcleo do *U. cordatus* foi 2,6 vezes maior que o controle (PINHEIRO *et al.*, 2013).

Figura 3. Processo de formação do micronúcleo (MN).

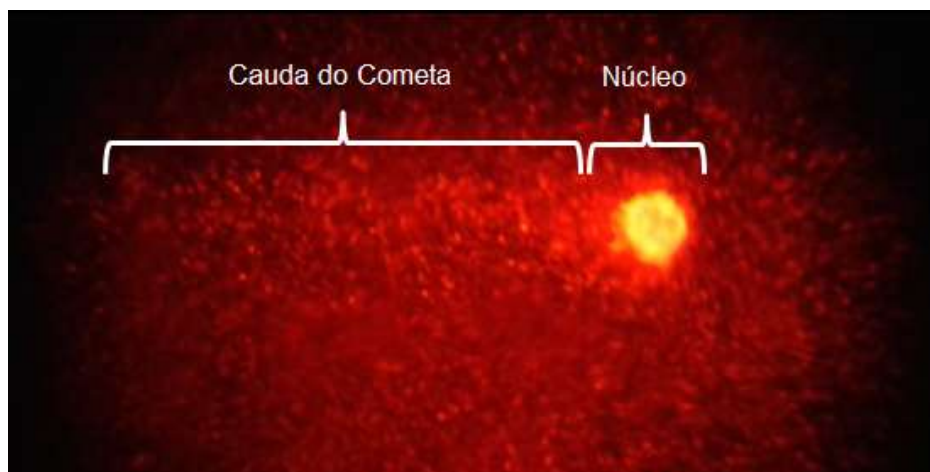


Fonte: Adaptado de CABRAL, 2014

2.5 ENSAIO COMETA ALCALINO

O ensaio cometa é um método genotóxico que possui capacidade de avaliar microlesões no DNA de células individuais, pois possibilita detectar quebras da fita em diferentes níveis (BELPAEME *et al.*, 1998). Esta técnica consiste na eletroforese do DNA em gel, através do uso de solução alcalina (SINGH *et al.*, 1988). As células são inseridas em gel de agarose, dispostas em fina camada sobre lâminas histológicas. Estas lâminas são expostas a soluções para o rompimento das membranas celulares, deixando expostas as proteínas nucleares. Este material genético é submetido à eletroforese, para que os fragmentos de DNA migrem do núcleo no sentido do anodo. Quanto maior a quebra do cromossomo, maior será a fragmentação do DNA, gerando um espalhamento, parecido com uma cauda, chamada de “cauda do cometa” (Figura 04) (PAOLO, 2006). A identificação do grau de degradação do DNA é classificada visualmente em diferentes níveis de dano, de acordo com o comprimento da cauda do cometa (BRIANEZI, CAMARGO & MIOT, 2009).

Figura 4. Partes do núcleo (núcleo e cauda do cometa), formados a partir do processo de eletroforese.



Fonte: Autoria própria.

Esta análise é aplicada nas áreas da genética médica, toxicológica, ecotoxicológica e biomonitoramento ambiental (COTELLE & FÉRARD, 1999; SILVA, 2007; DAVANSO *et al.*, 2013; ARALDI *et al.*, 2015). O grau de dano encontrado na célula *in vivo* ou cultivada *in vitro* pode ser associado às características de suas respectivas matrizes (água, solo e ar). Por isto, esta técnica é capaz de detectar efeitos genotóxicos causados por agentes químicos e físicos (COTELLE & FÉRARD, 1999). Células de linguados (*Paralichthys olivaceus*) foram expostas a extratos sedimentares da Baía de Gwangyang (Coréia do Sul), e a diferentes concentrações de contaminantes isolados (benzo[a]pireno, antraceno, fluoranteno, pireno e fenantreno) (WOO *et al.*, 2006). As concentrações de HPAs foram determinadas nestes sedimentos, e os resultados mostraram que os danos no DNA aumentavam proporcionalmente com as concentrações. Também pôde ser observado, neste estudo, que os diferentes HPAs causam diferentes níveis de danos.

2.6 ORGANISMO TESTE

O *Ucides cordatus*, conhecido como Caranguejo-Uçá, habita regiões de manguezais e se encontram amplamente distribuídos na costa da Flórida, Golfo do México, Antilhas, Guianas e em toda costa brasileira (COELHO & RAMOS, 1972; CEPENE, 2000). Apresentam comportamento territorialista e constroem galerias em solos de mangue, onde permanecem a maior parte do tempo. Porém, é possível ver mais de um caranguejo por toca em época de acasalamento (IVO & GESTEIRA, 2015). Os

caranguejos buscam alimentos em períodos de maré mais baixa, e levam estes alimentos para dentro da loca para o consumo. Uma análise do conteúdo estomacal de *U. cordatus* mostrou a predominância de matéria vegetal, seguida de matéria orgânica misturada a sedimento e, por último, matéria animal (BRANCO, 1993). Estes hábitos mostram a importância da qualidade destes ambientes para os Caranguejos – Uçá.

Os *U. cordatus* possuem importantes funções nas regiões de manguezais, pois atuam na ciclagem dos nutrientes através da formação dos detritos vegetais, e manutenção de nitrogênio e fósforo desses ambientes através do hábito de cavar galerias e levar serapilheira para parte interna da loca (CHRISTOFOLETTI, 2005). Este crustáceo é muito popular no Brasil graças ao destaque na culinária de regiões costeiras. A coleta de caranguejo é uma importante via econômica e social, já que gera empregos diretos e indiretos, e é o sustento de muitos catadores e comerciantes (ALVES & NISHIDA, 2003). Os próprios catadores relatam a diminuição destes organismos e atribuem ao grande consumo da espécie, sendo, muitas vezes, necessário buscá-los em regiões mais distantes, onde ainda são encontrados em abundância. O *U. cordatus* está na Lista Nacional das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Sobreexplotados ou Ameaçadas de Sobreexploração (Anexo II da Instrução Normativa nº5 de 21 de maio de 2004 – Ministério do Meio Ambiente). Por esta razão, foram decretadas leis e normas que determinam padrões de captura e consumo, podendo ser aplicadas multas para quem não cumpri-las (MMA, 2004). O Caranguejo-Uçá não pode ser pescado nem comercializado em período de "andada", que ocorre durante a lua cheia e lua nova nos meses de janeiro, fevereiro e março (IBAMA, 2015). A "andada" corresponde ao período reprodutivo dos caranguejos, os quais saem de suas locas e andam pela superfície do mangue, onde se acasalam e liberam ovos. Neste período, além de ficarem na superfície, os caranguejos perdem o instinto de defesa e fuga, ficando mais suscetíveis à caça (ALVES & NISHIDA, 2002). Também é regulamentado o tamanho mínimo da carapaça que pode ser capturado, sendo proibida a coleta de organismos com carapaça menor que 6 centímetros (IBAMA, 2008).

2.7 ESTUÁRIO DO RIO POTENGI

O estuário do Rio Potengi fica no estado do Rio Grande do Norte, na cidade de Natal. Devido à importância ambiental e social, este estuário faz parte do Zoneamento Ambiental (ZPA) de Natal, que visa a proteção, manutenção e recuperação do local (Lei nº 082 de 21 de junho de 2007). O ZPA-08 inclui o estuário do Rio Potengi e a área de

manguezal adjacente (Figura 05). Essa área é definida como: “Ecossistema Litorâneo de grande importância ambiental e socioeconômico para a cidade, por ser fonte de alimentos e local de reprodução de espécies de fauna marinha, refúgio natural de peixes e crustáceos, propiciador da indústria de pesca e atividades de aquacultura, portuária e de recreação, como também de alimento para as populações ribeirinhas” (Prefeitura de Natal, 2008). Uma grande quantidade de larvas de peixes e crustáceos tem sido observada nesta região, incluindo espécies de valor econômico como: Caranguejos e camarões, tainhas, Carapebas, Serras, Camurins, Meros, Bagres e Pescadas (QUEIROZ, 2011).

Esta área é caracterizada pelo alto índice de urbanização e intensa exploração dos recursos naturais, principalmente através da pesca artesanal e coleta de crustáceos (BERLAMINDO, 2014). As atividades antrópicas realizadas nesta região têm alterado a saúde dos ecossistemas. Ostras coletadas no mangue do Rio Potengi apresentaram contaminação por metais, principalmente zinco, cobre e chumbo, que foram associados à descarga de esgotos urbanos e industriais (SILVA *et al.*, 2001). Sedimentos coletados no canal apresentaram concentrações elevadas de alguns HPAs, com alta probabilidade de causar efeitos à biota local (QUEIROZ, 2011).

Figura 5. Zoneamento Ambiental de Natal. Fonte: Prefeitura de Natal, 2008



Fonte: Prefeitura de Natal, 2008

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esta dissertação teve por objetivo geral avaliar danos genômicos em caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus*) expostos a sedimentos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no estuário do Rio Potengi - Natal (RN) .

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de macrolesões genéticas em hemócitos de *U. cordatus*, através da análise da frequência de células micronucleadas;
- Investigar a presença de microlesões no DNA de *U. cordatus* através do ensaio cometa alcalino;
- Determinar as concentrações e distribuição dos HPAs nos sedimentos coletados nas locas do *U. cordatus*;
- Investigar a possível correlação entre as alterações genéticas e a presença de HPAs nos sedimentos da loca do caranguejo.

MANUSCRITO

Os resultados deste estudo serão apresentados na forma de um artigo científico, escrito segundo as exigências do periódico “Environmental Pollution” com fator de impacto de 4.8, para o qual será submetido. No final deste trabalho estão apresentadas algumas conclusões gerais sobre os resultados obtidos durante a pesquisa.

Are PAHs correlated to genotoxicity on crabs from an urbanized tropical estuary?

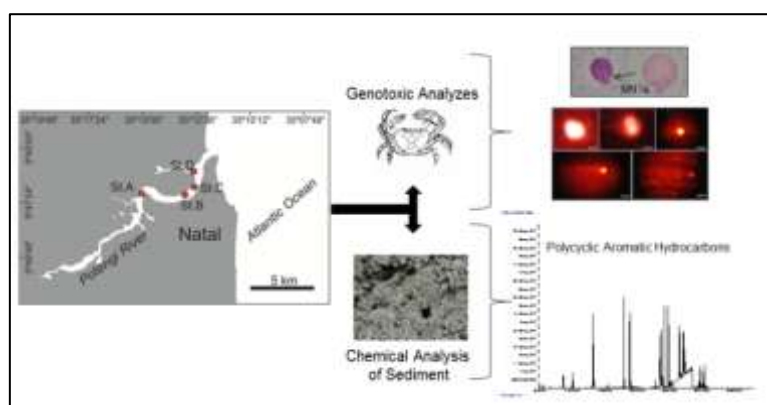
Cabral, C.B.^a; Adam, M.L.^b; Pinheiro, M.A.A.^c; Souza, C.A.^c; Zanardi-Lamardo, E.^{a*}

^aDepartamento de Oceanografia, Laboratório OrganoMAR, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Arquitetura, s/n, 50740-550 Cidade Universitária, Recife, Brazil.

^bDepartamento de Zoologia, Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental -LAGEA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^cLaboratório de Biologia de Crustáceos-Praça Infante D. Henrique, UNESP-Univ Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista (CLP), s/n, Pq Bitaru, 11330-900 São Vicente, São Paulo, Brazil

Graphical Abstract:



ABSTRACT:

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are commonly found in air, water, sediment and organisms. Some of them are known as carcinogenic and mutagenic precursors for biological systems. The objective of this study was to investigate the genotoxicity effects on *Ucides cordatus* (Uçá crabs) and PAH contamination in their burrow sediment. Organisms and sediments were sampled in four stations at a tropical estuary under anthropic pressure. DNA damages were evaluated through comet assay and micronuclei test and PAHs in sediment were analyzed by GC-MS. Total PAHs concentrations ranged between 3.25 ng g⁻¹ to 1065 ng g⁻¹. One station was low contaminated and all others were classified as moderately contaminated. DNA damage (macrolesions) in all crabs was higher than the control station, and they were positively correlated to PAHs, suggesting these compounds as important stressors. Once this area is protected by government regulations and *Ucides cordatus* is threatened with extinction, further studies are required integrating contaminants and their effects on biota.

Keywords: DNA damage, comet assay, micronuclei, *Ucides cordatus*

1 INTRODUCTION

Intense urbanization and industrial complexes installation are frequently observed in the surroundings of estuarine environments. Many activities very often use these systems as final receptor for their wastes. These effluents comprise various contaminants, such as metals, pesticides, drugs, oils and derivatives, among others, that could threaten the environment (Motelay-Massei *et al.*, 2004; Maciel *et al.*, 2015; Meador *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016b). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) make up a significant fraction of oil and have been reported in several matrices and distinct areas, like observed in arctic and antarctic sea (Boitsov *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2010). They may be naturally produced by slow maturation of organic matter, diagenesis, biosynthesis, or formed during incomplete combustion of organic matter (Soclo *et al.*, 2000; Yunker and Macdonald, 2003). Some anthropogenic processes may also contribute with PAHs to the environment through fossil fuels and biofuels combustion, industrial and domestic effluents, intentional biomass burning, port activities, oil spills, etc (Soclo *et al.*, 2000; Yunker and Macdonald, 2003; Carreras *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2016). PAHs may reach the aquatic systems direct or indirectly by leaching or atmospheric deposition (Duodu *et al.*, 2016), in their original form or even after being photo-oxidized (Zhang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016). In water, their low solubility favor their adsorption to suspended particulate matter with subsequent deposition to the sediment.

The main concern about PAHs and their metabolites in environments is their high potential toxic to biological systems (USEPA, 1987; Shi *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2009; Abdel-Shafy and Mansour, 2016), including behavioral, physiological, and morphological changes, alteration on birth and mortality ratio, DNA damages, among others (Kurihara *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2011; Torreiro-Melo *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016).

PAH activation can occur through several pathways, external or internally by organisms, both forming carcinogenic products. In organisms, the best known process is enzymatic oxidation activation. The cytochrome P450 provides the enzymatic oxidation process of PAHs (Cebulska-Wasilewska *et al.*, 2007; Ertl *et al.*, 2016). The enzymes act in the angular region of PAH molecule (due to high electron density) forming reactive products (epoxides, phenols, etc.), which are able to bind the nitrogenous bases, resulting in DNA adducts (Bernardo *et al.*, 2016). The results are mutagenic processes, tumor growth and DNA fragmentation (Bernardo *et al.*, 2016).

Organisms' responses to xenobiotics in the environment have been used as environmental impact biomarkers and effects can be diagnosed at different levels by genetic, cellular, morphological and behavioral biomarkers, among others (Flora *et al.*, 1991). Mutagenic effects detection in marine organisms is an important tool to identify the exposure of these organisms to carcinogenic compounds. Cytogenetic analysis assesses DNA damage caused by exposure to clastogenic and aneugenic compounds (Mitchelmore and Chipman, 1998; Bolognesi and Degan, 2001).

Comet assay has been widely used in ecotoxicological studies, due to its ability to assess DNA microlesions in individual cells, identifying tape breakage at different levels (Araldi *et al.*, 2015). In this technique, cytoplasmic and nuclear protein components are removed, and the genetic material undergoes electrophoresis, so that DNA fragments migrate from the nucleus towards the anode. The higher the breakage, the smaller are the fragments, resulting in larger "comet tail". The DNA degradation degree is visually rated according to the length of comet tail (Lee and Steinert, 2003; Brianezi *et al.*, 2009; Sponchiago *et al.*, 2016). Macrolesions of DNA are frequently assessed by micronucleus tests, which detect breakage of larger genetic material. Micronuclei are similar to the main nucleus, formed by a chromosome fragment, and only created after a complete cycle of cell division (Fenech *et al.*, 1997; Bonassi *et al.*, 2007; Adam *et al.*, 2013; Arantes *et al.*, 2016). They can be formed through oxidative stress generated by the imbalance of oxidant compounds, genetic defects at checkpoints of the cell cycle and / or DNA repair genes, exposure to clastogens and / or aneugens.

Benthic organisms are widely used as sentinels of coastal environments quality, integrating pollutants and organism's health (Flora *et al.*, 1991; Walker and Savva, 2001; Rodrigues and Pardal, 2014). The organism test used in the present study was *Ucides cordatus*, also known as Uçá-Crab (Linnaeus, 1763) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). The *U. cordatus* occurs from coast of Florida (USA), Gulf of Mexico, West Indies, Guyana, throughout the Brazilian coast (CEPENE, 2000; Nordhaus *et al.*, 2006). This organism has a socio-economic importance because supports many collectors and dealers. In last decade, the uncontrolled consumption put it in the National List of Aquatic Invertebrates Species and Overexploited Fish or Threatened of Overexploitation (MMA - Anexo II da Instrução Normativa nº 5 de 21 de maio de 2004). Laws and regulations were decreed establishing capture and consumption patterns, and fining who does not comply the rules (MPP, 2009). Aiming to investigate genomic damage on Uçá crabs (*Ucides cordatus*) from Potengi estuary exposed to

contaminated sediments by PAHs. this study analyzed the 16 priority PAHs (USEPA) in burrow sediment of *Ucides cordatus*. DNA damages were investigated by alkaline comet assay and micronuclei test.

1 MATERIALS AND METHODS

2.1 STUDY AREA

Potengi/Jundiaí estuary encompasses the largest mangrove area (863 ha) of the Rio Grande do Norte state, northeast of Brazil (Figure 1) (Silva *et al.*, 2007). It is characterized by a dry summer with major drought from October to December, and a wet winter, from March to August. This estuarine system is formed by several creeks and Potengi river is the main contributor. The estuary is 30 km long and 15 m deep maximum (Silva *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2016), passing through three cities whose populations, together, sum more than 1 million people (Silva *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2007; IBGE, 2016).

This estuary is very important because it works as a nursery for various marine and estuarine organisms, providing commercial and subsistence fishing, and supporting aquaculture and tourism activities. Additionally, there are some industries, fishing and oil terminals, a port and a marina in its boundaries. Unfortunately, the industrial and domestic effluents of surrounding areas are thrown directly into the waters and, frequently, they are *in natura* (Silva *et al.*, 2006). The intense urbanization, the lack of efficient sanitation, and various others anthropogenic activities are threatening the environment. Some contaminants have been already reported in the local, such as metals in oyster (Silva *et al.*, 2001) and PAHs in sediments from the channel (Queiroz, 2011). Due to its socioeconomic and environmental importance, this region was included in the environmental protection zone of the Natal city, named EPZ-8, which comprises the mangrove and biota, in order to protect and maintain healthy the local ecosystem (Prefeitura Municipal de Natal, 2008).

2.2 SAMPLING

A field survey was performed on 24 and 25 November, 2015 (dry season), in 04 sites (A to D) in the mangroves of the Potengi/Jundiaí estuary (Figure 1, Table 1), during spring tides. A total of 12 crabs were collected from each station and sediments were sampled from each crab burrow. Every 3 sediment samples were mixed up,

resulting in 4 composite samples for each site. Sediment samples were kept frozen at -18 °C until analysis in the laboratory. The crab hemolymph was withdrawn from the legs articulation in a red light room. Additionally, 30 crabs and associated burrow sediments from 3 sites were collected at Juréia - Itatins Ecological Station (JIES) – São Paulo, as a control site. This region is well preserved, and it has been used in many studies with the same purpose (Pinheiro *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2016; Banci *et al.*, 2017).

Table 1. Coordinates of stations collection from Potengi/Jundiaí (A to D) estuary (Natal/RN) and Juréia (J).

Station	Lat	Long
A	05°47'0.4" S	35°15'2.4" W
B	05°47'0.1" S	35°13'4.4" W
C	05°46'38.8" S	35°12'39.5" W
D	05°46'5.6" S	35°12'43.9" W
J	24°26'03"S	47°05'25"W

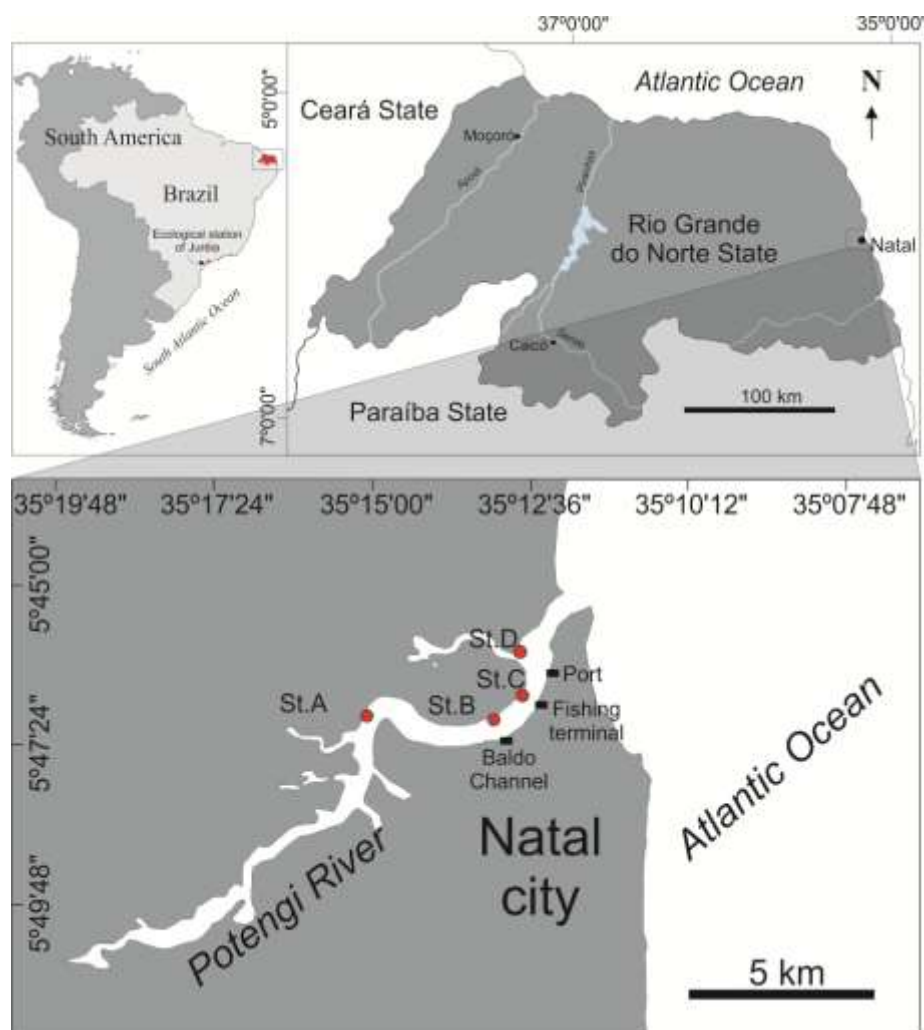


Figure 1. Sediments and crabs sampling sites in mangroves at Potengi/Jundiá estuary: stations A, B, C and D. November, 2015. The Ecological Station of Juréia is indicated in the upper left figure.

2.3 SEDIMENT ANALYSIS

Sediments were freeze-dried and the aliquots were separated for the following analysis.

2.3.1 Organic matter and Grain size analysis

Organic matter (OM) percentage was determined gravimetrically by sample calcination (adapted from Davies, 1974). An aliquot of 4 g was weighed and combusted at 450 °C for 6 hours. The OM percentage was calculated by weight difference multiplied by 100. Grain size distribution followed Suguio (1973) methodology. An aliquot of 8g was weighed and hydrogen peroxide 30% (V/V) was added to remove the organic matter. After that, sediments were washed with water to separate sediment fractions smaller than 63 μm . Sand fraction distribution (grain >

63 μ m) was performed in a sieve shaker, and the pipetting method was used to determine the fine particles (silt and clay). Results were calculated using Sysgran 3.0 software.

2.3.2 PAH extraction in sediment

The 16 EPA priorities PAHs (USEPA, 1987) were analyzed and quantified in sediments samples (UNEP, 1992). An aliquot of 4 grams of sediment was weighed and added 100 μ L of surrogate standards of deuterated PAHs (AccuStandard, Internal Standard Mix, 1000 ng mL⁻¹): naphthalene-d₈, acenaphthene-d₁₀, phenanthrene-d₁₀ and chrysene-d₁₂. Samples from control station (JIES) were analyzed following the same procedures, but the aliquot used was 15g instead. The extraction was performed in a Soxhlet apparatus for 8 h with 80 mL of n-hexane/dichloromethane (1:1 v/v). Extracts were purified and fractionated in a 5% deactivated silica and alumina column. Aliphatic hydrocarbons were removed with 10 mL of n-hexane, but they were not used in this study. PAHs were eluted with 15 mL of n-hexane/dichloromethane (7:3 v/v) solution. This fraction was concentrated to 1 mL, and added 100 μ L of internal standard containing the deuterated PAHs fluorene-d₁₀, benzo[a]anthracene-d₁₂ and benzo[a]pyrene-d₁₂, at 1000 ng mL⁻¹. Extracts were injected in a gas chromatograph (Agilent technologies 7820A GC System) coupled to a mass spectrometer (Agilent technologies 5975 series MSD), in the selected ion monitoring (SIM) mode. The injector was in the Splitless mode and the temperature was 300 °C. A capillary column HP-5MS (J&W Scientific) of fused silica (30 m $\times$ 0.25 mm i.d. $\times$ 0.25 μ m) was used. Helium (5.0 pure) was the carrier gas, with a flow rate of 1.2 mL min⁻¹. The oven temperature was programmed to start 60 °C, then 15 °C min⁻¹ to 150 °C, 5 °C min⁻¹ to 220 °C, 10 °C min⁻¹ to 300 °C, remaining constant for 10 min. The interface temperature was 300 °C. The spectra and chromatograms were obtained by EI, and the analyzer used was quadrupolo. PAHs were identified by retention times and mass/charge of 4 ion fragments. PAHs quantification was performed by peaks integrating using the internal standardization method.

Surrogate standards, procedural blanks and certified reference material (SRM - IAEA-417, from International Atomic Energy Agency) were used for quality control. The blank was performed in a sodium sulfate matrix and the observed individual compounds (if any) were subtracted from the results of the samples. Quantification limit was 0.25 ng g⁻¹ of dry sediment for samples and 0.06 ng g⁻¹ for JIES sediments. Recovery of the surrogate standard varied between 61.2% and 118% (Lauenstein and

Cantillo, 1998). Coefficient of variation (CV) averaged $6.3 \pm 4.5\%$ and 81% of these analytes were within the expected concentration.

2.4 BIOLOGICAL ANALYSIS

2.4.1 Crabs physical characteristics

The crabs were taken to the laboratory for hemolymph removal. The sex of the *U. cordatus* were identified through sexual dimorphism of abdomen. Physical parameters such as weight, width and length of the carapace were measured using digital scale and caliper. Subsequently the organisms were returned to the mangrove.

2.4.2 Comet assay alkaline

The comet test was performed according to the protocol described by Singh *et al.* (1988). The slides were sanded, washed with neutral soap (extran 2%) and dried after alcohol immersion. After, they were dipped in standard agarose solution (70 °C), and dried at room temperature for 24 hours. A volume of 400 µL hemolymph was punctured with a syringe containing 200 µL of anticoagulant and then mixed with 100 µL of Agarose LM (water-bath at 37°C). This mixture was transferred to the slides, covered with cover slips, and stayed for 10 minutes in the refrigerator. The cover slips were removed and slides were immersed in a lise solution for 1 day, to break cell membranes. The slides were transfered to an electrophoresis tank with buffer solution, and waited 20 minutes for "unpacking" the double helix. Subsequently, the tank was connected to a 40 V voltage and 300 mA during 20 min to move the DNA fragments toward the anode, forming the "comet tail". The slides were stained with Gel Red dye diluted in ultra-pure water (1:100). The analysis was carried in epifluorescence microscope (Zeiss Axio Imager 2 model with the Software Axio Vision). The damage was classified in 5 levels, ranging from level 0 (zero) for a non-damaged cell to level 4 (four) for the most damaged cell, respectively.

2.4.3 Micronuclei test

The micronuclei test was performed according to the protocol described by Schmid (1975). The hemolymph was collected with a syringe containing an anticoagulant solution, and it was dropped into a slide to perform the smear. The slides were fixed with methanol for 15 minutes and were subsequently stained with Giemsa diluted in a pH 6.8 phosphate buffer solution (1:20). A total of 500 cells from each slide

was analyzed in an optical microscope with an immersion objective, and micronucleus cells were quantified.

2.6 STATISTICAL ANALYSIS

Data were tested for normal distribution using Kolmogorov-Smirnov test. ANOVA test was performed to evaluate differences among stations, tukey test and Pearson correlation was used to investigate differences among the data: grain size, organic matter, total PAHs, micronucleus and comet assay data. *Posteriori test* of Dunnet was applied to PAHs and Micronuclei, comparing with control. Analyses were performed by Biostat 5.0. The principal component analysis was performed to identify associations among all data, performed by STATISTICA 6.0 program.

1 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 SEDIMENT ANALYSIS

Organic matter content ranged from 3 to 25%, with the lowest values at St. C and the highest at St. A. There was significant differences between the stations ($F = 8.1426$; $p = 0.003$) and St. A was significantly higher than others stations ($p < 0.01$). The median of fines (silt + clay) percentage was 27%. The lowest value was at St. C (13%) and the highest at St. A (62%), with the latter being significantly higher than the other stations ($F = 36.9887$; $p < 0.0001$). Total PAHs concentration ranged from 3.25 ng g^{-1} to 1065 ng g^{-1} . Organic Matter was positively correlated to fines particles ($r = 0.7372$; $p = 0.0011$), but no correlation was observed between PAHs and OM ($r = 0.1492$; $p > 0.05$) or fines ($r = -0.305$; $p > 0.05$). PAHs are usually positively correlated to these parameters (Countway *et al.*, 2003; Maciel *et al.*, 2015) but, at this estuary, the PAHs distribution seems to be more related to other parameters such as input distance or local hydrodynamics.

There were no significant differences between Sts. A, B and C, but their concentrations were higher than St. D ($F = 41.8852$; $p < 0.0001$) and higher than the control (JIES) ($F = 40.2429$; $p < 0.0001$). The highest PAHs concentration was observed at St. C ($294 - 1065 \text{ ng g}^{-1}$), followed by St. B ($292 - 666 \text{ ng g}^{-1}$) and St. A ($121 - 555 \text{ ng g}^{-1}$) (Table 2). St. D is located at Jaguaribe creek and presented the lowest concentrations ($3.25 - 23.17 \text{ ng g}^{-1}$), which are similar to those observed at sediments from Juréia ($24.3 - 39.0 \text{ ng g}^{-1}$). Based on total PAH, sediments may be classified as low (up to 100 ng g^{-1}), moderate ($100 - 1000 \text{ ng g}^{-1}$), and highly

contaminated (1000 to 5000 ng g⁻¹) (Baumard, 1998). All sediments from Sts. A, B and C were within moderate range, but one sample, from St. C, was highly contaminated with concentration above 1000 ng g⁻¹. St. D was classified as low contaminated.

Table 2. PAH concentration (ng g⁻¹) range and median in sediment samples from Potengi/Jundiaí estuary, and TEL/PEL proposed values

Comp.	St.A	Median	St.B	Median	St.C	Median	St.D	Median	J	Median	TEL	PEL
N	ND - LQ	-	ND - 3.14	0.38	<LQ - 2.04	1.17	<LQ	-	4 – 7.6	6	34.6	391
Ayl	<u>ND - 14.2</u>	7.85	0.42 - 3.06	2.5	1.53 - 2.85	2.23	<LQ	-	<LQ - 0.6	<LQ	5.87	128
Aen	<LQ - 0.74	0.37	1.17 - 4.68	1.92	<u>1.47 - 17.3</u>	6.62	ND - <LQ	-	ND - <LQ	<LQ	6.71	88.9
F	0.76 - 2.29	1.14	<u>4.65 - 35.6</u>	14.6	<u>4.01 - 27.9</u>	10.4	<LQ	-	0.3 – 0.4	0.3	21.20	144
Pn	5.90 - 11.1	7.88	8.12 - 41.7	21.7	<u>24.2 - 113.2</u>	48.6	ND - 0.71	<LQ	2.3 – 11.4	8.1	86.70	544
An	2.62 - 7.15	3.86	4 - 16.0	7	4.19 - 18.6	10.9	ND - <LQ	-	<LQ	<LQ	46.9	245
Fl	15.7 - 56.0	25.6	<u>38.0 - 132.0</u>	78.9	<u>46.9 - 178.6</u>	131.9	0.59 - 4.08	1.01	2 – 3.6	2.6	113	1494
Py	18.5 - 58.5	29.0	46.5 - 139.0	90.8	<u>43.5 - 161.0</u>	102.3	0.64 - 3.40	1	3.9 – 5.4	4.8	153	1398
BaA	11.1 - 40.1	15.6	24.9 - 48.7	36.7	<u>22.6 - 79.3</u>	60.4	ND - 2.49	0.48	<LQ - 2	0.3	74.8	693
Ch	8.38 - 49.6	21.2	34.2 - 70.7	52.2	26.5 - 87.1	62.3	0.41 - 2.56	0.75	1.6 – 3.1	2.3	108	846
BbF	11.4 - 55.1	17.7	22.0 - 49.1	40.1	20.3 - 74.5	45.1	0.39 - 1.85	0.5	0.6 – 1.7	0.6		
BkF	8.68 - 41.0	11.6	19.4 - 47.2	30.9	15.6 - 66.1	46.5	0.28 - 1.55	0.42	<LQ – 3.8	0.3		
BaP	10.6 - 63.7	16.2	24.0 - 52.4	36.2	22.2 - 81.6	61.6	<LQ - 1.80	0.43	<LQ – 3.7	0.3	88.8	763
IP	11.8 - 86.1	17.1	27.9 - 59.6	38.1	29.7 - 103.0	69.7	0.41 - 2.22	0.74	0.5 - 5	0.8		
DhA	<u>3.20 - 14.7</u>	4.4	<u>5.36 - 10.2</u>	7.66	<u>5.91 - 18.5</u>	10.2	ND - 0.42	ND	<LQ – 0.9	<LQ	6.22	135
BghiP	9.84 - 54.3	12.8	19.3 - 45.5	24.6	24.2 - 76.4	51.8	0.52 - 2.08	0.92	0.4 - 3.2	0.5		
LMW	12 – 35.4	12.1	26.1 – 88.1	52.2	36.9 - 181.4	79.5	0 – 0.7	-	7.2 – 19.3	14.5		
HMW	109.2 – 519.1	171.4	264.4 – 640.2	441.5	257.4 – 883.9	663.2	3.3 – 22.5	6.3	10.3 – 31.9	11.8		
Σ 16 HPAs	121.2 – 554.6	182.9	292.5 – 666.3	523.8	294 – 1065	742.7	3.25 – 23.2	6.28	26.3 - 39	29.6		

Compounds: N (naphthalene); Ayl (Acenaphthylene); Aen (Acenaphthene); F (Fluorene); Pn (Phenanthrene); An (Anthracene); Fl (Fluoranthene); Py (Pyrene); BaA (Benz[a]anthracene); Ch (Chrysene); BbF (Benzo[b]fluoranthene); BkF (Benzo[k]fluoranthene); BaP (Benzo[a]pyrene); IP (Indeno[1,2,3-cd]pyrene); DhA (Dibenz[a,h]anthracene); BghiP (Benzo[ghi]perylene) /

J: Juréia (Control) / **TEL:** threshold effect level / **PEL:** probable effect level

Total PAHs' concentration at Potengi/Jundiaí estuary is similar to that reported for sediment mangrove worldwide, as observed in China at Jiulong estuary (Tian *et al.*, 2008) and Nansha Mangrove (Wu *et al.*, 2014) and Guadalupe Island in France (Ramdine *et al.*, 2012) (Table 3). These systems encompass an urbanized region and receive port, domestic and industrial discharges. On the other hand, PAHs at this study were lower than that reported in Nigeria at Calabar River Estuary (Oyo-ita *et al.*, 2013), and mangroves in China, like Futian, Baguang, Waterland (Li *et al.*, 2014) and Hongkong (Wang *et al.*, 2015). These places have large industrial centers, petroleum, fishing and agriculture activities in their surroundings, confirming they are potential PAH sources.

Table 3. Total PAHs concentrations in mangrove sediments worldwide.

Country	Place	$\Sigma 16\text{PAHs}$ (ng g ⁻¹)	Mean (ng g ⁻¹)	Reference
China	Jiulong Estuary	280 - 1206	648 ± 246	Tian <i>et al.</i> , 2008
France	Guadalupe Island	49 - 1065	317 ± 309	Ramdine <i>et al.</i> , 2012
Nigeria	Calabar River Estuary	1670 – 20,100	9370 ± 579	Oyo-ita <i>et al.</i> , 2013
	Futian	1649 – 7925	4480	
China	Baguang	313 – 2847	1262	Li <i>et al.</i> , 2014
	Waterland	1189 – 5168	2711	
China	Nansha Mangrove	150 - 610	nc	Wu <i>et al.</i> , 2014
China	Seven Hong Kong Mangroves	313 -5767	2491±1910	Wang <i>et al.</i> , 2015
Brazil *present study	Potengi/Jundiaí Estuary	3.25 – 1065	371 ± 332	Cabral <i>et al.</i> , 2017

nc = not calculated

3.3 ADVVERSE BIOLOGICAL EFFECTS

Individual PAHs concentrations in sediments were compared to the sediment quality guidelines (SQGs) proposed by Environmental Agency of Canada, according to Macdonald *et al.*, (1996): TEL (threshold effect level), below of which no adverse effects upon organisms are expected, and PEL (probable effect level), above of which harmful effects on biota may occur. Concentrations between TEL and PEL may cause some effects. None PAH was above PEL in the studied sediments neither above TEL at St. D. Some compounds were above TEL in samples from Sts. A, B and C, with the highest incidence at St. C. The most frequent were fluoranthene and dibenzo[a,h]anthracene but, in some samples, acenaphthylene, fluorene, phenanthrene, pyrene and benzo[a]anthracene also exceed the limit (Table 2). These results are of

great concern because, for example, fluoranthene may interfere on DNA synthesis and cyanobacteria cell cycle (Danz *et al.*, 1998; Cerezo and Agustí, 2015) besides its potential to cause toxic effects in several levels, altering hepatic and gonadal tissue (Irwin *et al.*, 1997; IARC 2003; González-Fernández *et al.*, 2016; Paul-Pont *et al.*, 2016). Dibenzo[a,h]anthracene is described as a powerful carcinogenic and mutagenic inducer to animals and humans (Irwin *et al.*, 1997; IARC, 2003). Human lymphocytes exposed to extracts containing benzo[a]anthracene caused genetic damage that was identified by both the comet assay and the micronuclei (Carreras *et al.*, 2013) and its oxidation product was able to cause apoptosis of human cells (Mujtaba *et al.*, 2015). Phenanthrene is known as a potential mutagenic, may alter copepod swimming, bioaccumulate in mussels, and cause biochemical and molecular alterations (Irwin *et al.*, 1997; IARC, 2003; Michalec *et al.*, 2016; Piazza *et al.*, 2016; Yakan *et al.*, 2016). *Poecilia vivipara* fish exposed to phenanthrene showed an increase on DNA stress, decrease in the antioxidant defense (Machado *et al.*, 2014), reduction on swimming resistance and swimming speed patterns changes (Torreiro-Melo *et al.*, 2015). Solutions prepared with some polycyclic aromatic compounds showed to have ability to alter cell division and DNA synthesis of the cyanobacterium *Prochlorococcus* (Irwin *et al.*, 1997; Cerezo and Agustí, 2015). Based on these studies, concentrations observed in sediments from Potengy/Jundiaí estuary are potentially harmful to cause adverse effects on local organisms, even though most of them were classified as moderately contaminated.

The knowledge of PAH potential effects on crabs is limited. PAHs can, individually or mutually, cause several damages in organisms, depending on the compound, concentration and exposure time (Woo *et al.*, 2006). Certain PAHs may bioaccumulate in crustaceans (Chase *et al.*, 2013) and alter their reproductive processes (Wen and Pan, 2016), such as benzo[a]pyrene that accumulates in ovaries of *Portunus trituberculatus* female Crabs, causing oxidative stress and decreasing sex hormones (Wen and Pan, 2016).

3.4 GENOTOXIC EFFECTS ON *UCIDES CORDATUS*

Micronucleus frequency (MNF) observed at Uçá crabs from Juréia (JIES) ranged from 0 to 3, with median 2. The MNF of a non impacted station reflects the individual variation of damage expression typical of a population. The normal value of MNF for mollusk hemolymph was defined as < 4 , but previous studies using *U.*

cordatus as biomonitors presented $MNF < 2$ (Nudi *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2016), pointing out this organism as a good environmental quality biomonitor. Crabs from JIES are within this value and could be used as the control site.

MNF in the hemolymphs of Uçá crabs from St. A ranged from 4 to 17 (median 11), St. B varied from 6 to 26 (median 14), St. C ranged from 11 to 27 (median 22), and St. D ranged from 4 to 12 (median 9). MNF in all crabs were significantly higher than that at control station (JIES) ($F = 40.2721$; $p < 0.0001$), indicating that *U. cordatus* are undergoing stresses. Such stressor agent is capable of alter normal functions during the cell cycle, causing rupture or chromosome delay in the anaphase migration, and generating MN (Falck *et al.*, 2002).

PAHs are known to bioconcentrate in mollusks and crabs, besides the genotoxic properties. Oysters contaminated with benzo[a]pyrene showed a positive relationship between this compound and MNF in cardiac cells (Burgeot and Galgani, 1995). A positive correlation was reported between PAHs in Uçá crabs hepatopancreas and their burrow sediments (Nudi *et al.*, 2007). The *U. Cordatus* is able to metabolize PAHs, but their metabolites may have mutagenic properties as observed by the positive correlation between the concentration of metabolites in this crab urine and the FMN (Nudi *et al.*, 2010). In the present study, MNF in the Uçá hemolymphs positively correlated with PAHs at burrow sediments ($r = 0,5785$; $p = 0,0188$). An increase tendency in the frequency of micronucleus can be observed with increasing PAHs concentrations (Figure 2). Natural sediments may receive complex pollutant mixtures that may be bioavailable depending on environmental conditions, such as pH and redox, and physiological status of organism. Even though several stressors could be contributing to the observed genetic alterations, this correlation suggests that PAHs an aneugenic or clastogenic factor that is contributing to the MNF increase.

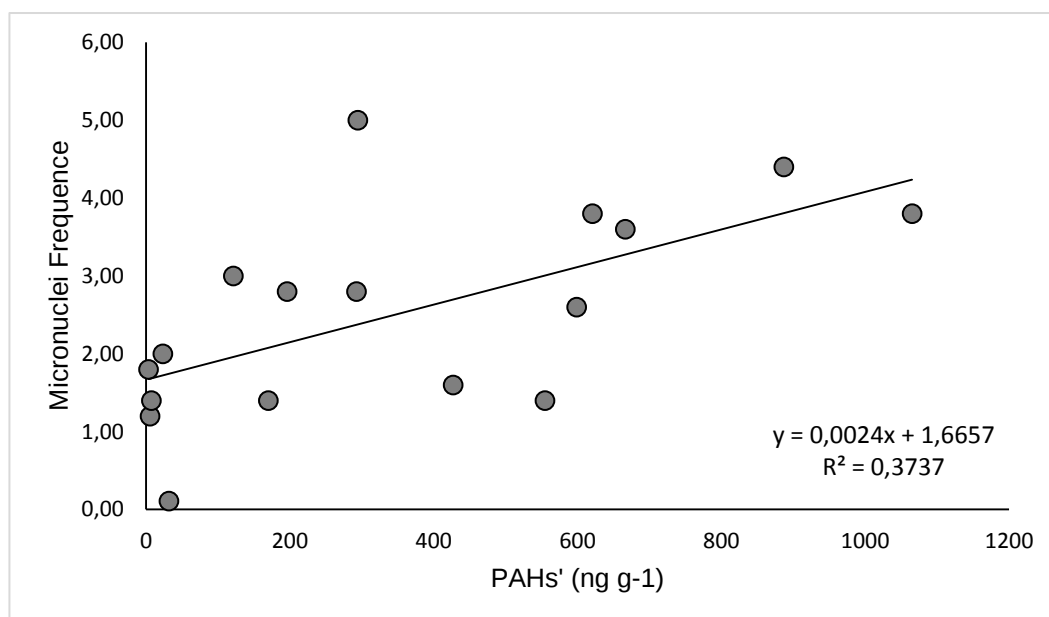


Figure 2: Trend line showing the relation among PAHs (ng g⁻¹) and micronuclei frequency.

The comet assay, unlike the micronucleus test, represents immediate damage to DNA that may still undergo repair process. These damages can be caused by compounds that act directly on DNA, or by those that need metabolic activation, such as PAHs (Mitchelmore and Chipman, 1998; Lee and Steinert, 2003; Villela *et al.*, 2007). For several years, this technique has been used as a tool to detect the phases of cellular apoptosis (Frenzilli *et al.*, 2009). As evidenced by micronucleus frequency, all crabs sampled from Potengi/Jundiaí estuary are undergoing genotoxic alterations. The most observed damage at St. A and St. B were levels 3 and 4, that together, sum more than 50%, with many cells in the apoptosis phase (no cellular nucleus). Damage level 1 predominated at Sts. C (71%) and D (66%) (Figure 3).

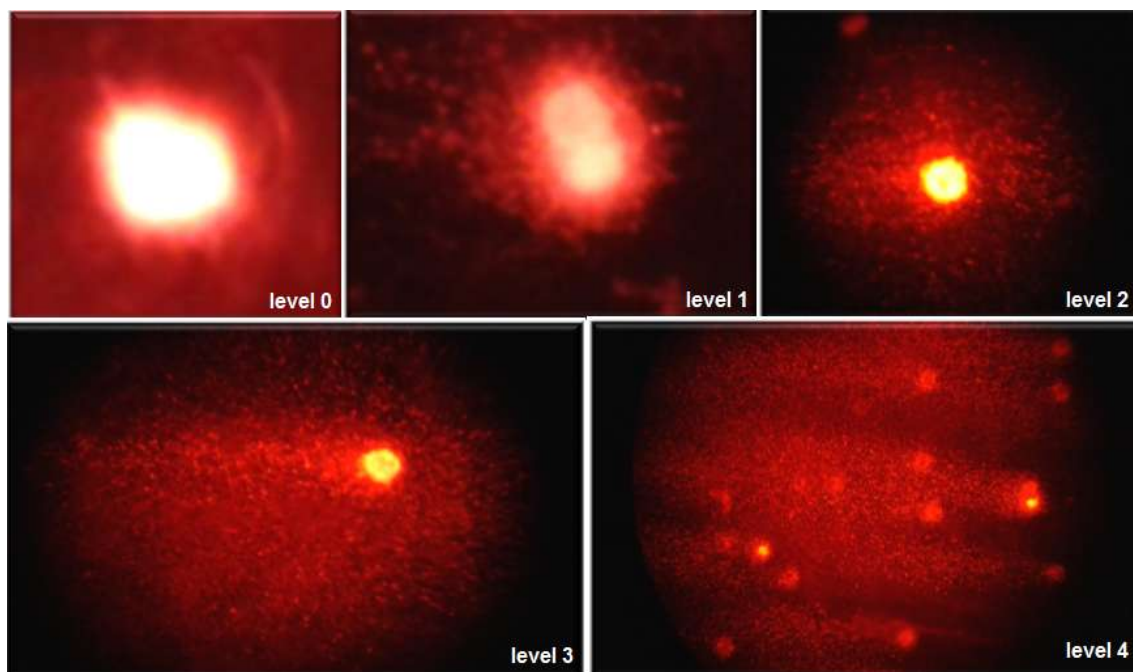


Figure 3. Pictures of the 5 level-damage images (comet tail) observed at Uçá crabs hemolymph from Potengi/Jundiaí estuary, November 2015.

The damage frequency (DF) was calculated for each organism as the percentage of all cells that presented damages, being $DF = [(n \text{ total} - n \text{ level } 0) \times 100] / n \text{ total}$ (Silva *et al.*, 2014), where $n \text{ total}$ is the total cells analyzed and $n \text{ level } 0$ are the cells at level 0 (no damages). DF varied between 95 and 100% for each organism and there was no significant difference ($p > 0.05$) among the 48 specimens analyzed. A high DF value indicates impact upon organisms, corroborating the observed micronucleus results. The damage index (DI) (Table 4) was calculated by the sum of the number of comets (n) of each level multiplied by the respective level digit, as follow: $DI = 0 \times (n \text{ level } 0) + 1 \times (n \text{ level } 1) + 2 \times (n \text{ level } 2) + 3 \times (n \text{ level } 3) + 4 \times (n \text{ level } 4)$ (Silva *et al.*, 2014). Stations were statistically different in terms of DI ($F = 5.7809$; $p = 0.0112$) and Sts. A and B were significantly higher than Sts. C and D ($p < 0.05$).

Table 4. Damage Index (DI) calculated for Uçá crabs from Potengi/Jundiaí estuary (Natal/RN)

Crab	St.A	St.B	St.C	St.D
	DI	DI	DI	DI
1	324	334	201	242
2	233	331	100	116
3	219	315	334	107
4	202	336	256	126
5	266	270	104	103
6	323	346	116	233
7	100	332	126	132
8	306	286	100	124
9	252	127	100	115
10	188	100	107	299
11	265	185	214	111
12	228	219	279	100

Comet assay data did not correlate with PAH concentrations nor with micronuclei frequency (Figure 3), in contrast to the observed with micronucleus test. The microlesions detected by comet assay are associated with recent events that can still undergo cellular repair process (Collins, 2014), and could explain the lack of correlation. In addition, some other factors might be influencing DNA breakdown, as reactive oxygen species present inside the crabs and in the environment, which are capable of acting directly on the nitrogenous bases (Alemán *et al.*, 2015).

The two genotoxicity methodologies used have different sensitivities for the same species, being able to reflect different stressors in the environment, as well as observed in the Micthelmores and Chipman (1998) study, and/or are influenced by the inter-variability of each crab. These results suggest that other parameters, such as complex contamination mixture in the burrow sediments of the *U. cordatus*, may be causing genetic damages, manifested in different ways. Cytogenetic evaluations may be influenced by environmental conditions and organism physiological, such as size, age and sex (Flora *et al.*, 1991). The *U. cordatus* female presented MNF slightly higher than the males, but they were not significantly different.

PCA analysis was performed and considered several parameters, such as damage index, MNF, PAH in burrow sediments, crab weight, organic matter and fines percentage and explains 88% of the results (Figure 4). Factor 1 represents 41%, and

shows a correlation between OM, fines and weight crabs. *U. cordatus* is very important in controlling organic matter and nutrient retention, which is essential to crabs diet and growth, mainly in the juvenile phase (Nordhaus *et al.*, 2006; 2011; Fanjul *et al.*, 2015). Factor 2 represents 29% and groups MNF and total PAH (as showed in the pearson correlation), indicating these compounds probably are influencing micronuclei formation. Data from the comet assay (factor 3) data did not correlate with any parameter, suggesting an influence of others stressors, such as metals or pesticides used in agriculture (Poletta *et al.*, 2009; Bony *et al.*, 2008).

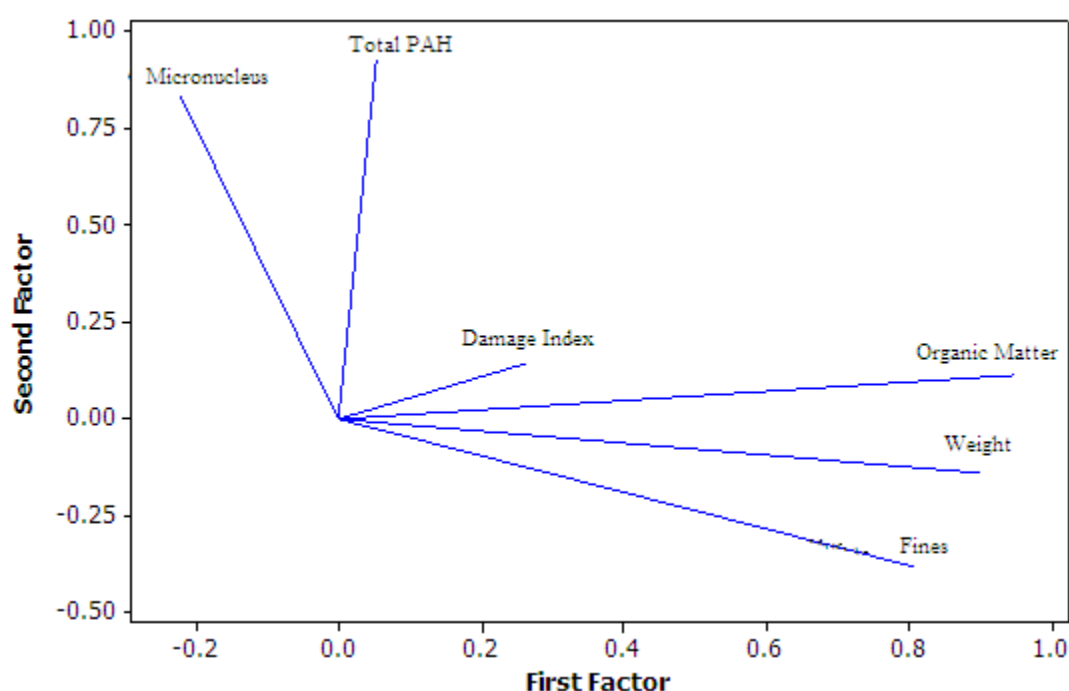


Figure 4. Ordination results of the principal component analysis (PCA) based on micronucleus frequency (MN), damage index, crabs weight, PAHs concentrations, organic matter (%) and fines (%).

3.4.1 Principal genotoxic compounds

Each individual PAH has different potential toxic. In order to identify the main responsible for micronucleus observed, a principal component analysis containing individual compound and average of micronuclei frequency (from the 3 crabs corresponding to that sediment mixture) was done. The results explain 94% of data. Factor 1 explains 43%, and correlated high molecular weight compounds (4 – 6 rings) with MNF (Table 5). Factor 2 (31%) grouped low molecular weight compounds (2 – 3 rings) with exception of acenaphthylene. This compound was placed in factor 3 (20%)

and did not correlate with any other variable. Heavier aromatic compounds have higher lipophilicity and Kow (octanol-water), resulting in a preferential interaction with organisms than those of low molecular weight (Nudi *et al.*, 2007). Bioaccumulation in Uça-crabs was positively correlated to PAHs molecular weight (Nudi *et al.*, 2007), and the concentrations on these crabs' hepatopancreas reflected the concentrations reported in mangrove sediments. Fluorene (Fl) and pyrene (Py) presented the highest loads (table 5). Their metabolites may associate and alter micro RNA functions, which are responsible for gene expression regulation. This pairing mechanism desregulation causes a significative increase of micronuclei frequency (Deng *et al.*, 2014).

Table 5. Ordination results of the principal component analysis (PCA) with loads of each compound and micronucleus frequency.

Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Acenaphthylene	0.123	0.007	-0.962
Acenaphthene	0.248	-0.926	-0.099
Fluorene	0.387	-0.750	-0.060
Phenanthrene	0.300	-0.925	-0.115
Anthracene	0.305	-0.865	-0.264
Fluoranthene	0.832	-0.429	-0.279
Pyrene	0.862	-0.340	-0.290
Benz[a]anthracene	0.792	-0.460	-0.383
Chrysene	0.779	-0.460	-0.391
Benzo[b]fluoranthene	0.669	-0.503	-0.532
Benzo[k]fluoranthene	0.777	-0.413	-0.462
Benzo[a]pyrene	0.737	-0.392	-0.539
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.671	-0.409	-0.606
Dibenz[a,h]anthracene	0.643	-0.466	-0.585
Benzo[ghi]perylene	0.713	-0.415	-0.539
Micronucleus	0.881	-0.148	0.114

DNA damages may be induced by PAH metabolites, which can bind to nitrogenous bases. In addition, the metabolism of parent compounds create reactive oxygen species which are also genotoxic (Bihanic *et al.*, 2015). The Benzo[a]pyrene (BaP) diol epoxide is the most known BaP metabolite and bind preferentially guanine (Phillips, 2005; Arlt *et al.*, 2012; Bernardo *et al.*, 2016).

Irreversible DNA damage was reported in fish larvae (medaka) exposed to Benz[a]anthracene through metabolic alteration in cells (Bihanic *et al.*, 2015). PAH' metabolites can also cause proteins oxidation and induce DNA damages, as observed during *Chlamys farreri* juvenile exposition to benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene

and chrysene (Xiu *et al.*, 2014). However, a mixture of PAH and other contaminants are frequently observed in the environment rather than individual compounds and the knowledge of synergism effects is scarce. Exposition of *Chlamys farreri* chrysene and benzo[a]pyrene (individually and/or mixed) induced to different responses. Biomolecular damage was observed in both tests, but the biomarkers analysis showed a synergism when compounds were mixed, resulting in more damages than when separately exposition. It was also observed that benzo[a]pyrene caused more damage than chrysene (Guo *et al.*, 2017).

The analytical strategy used in the present study showed to be an useful tool to better understand crabs health in association to PAH pollution. Due to the complexity of matrices in natural environment, complementary studies with a broader spectrum of contaminants are required, which in addition to PAHs may be threatening the health of organisms in the Potengi/Jundiaí estuary.

4 CONCLUSION

The Potengi/Jundiaí estuary is under chronic PAH impact and concentrations at sediments might be causing effects upon local biota.

Genetic damages in *U. cordatus*, manifested in different ways, showed that these organisms are under genomic stressors influence.

Macrolesions were correlated to PAHs in burrow sediments, and the heavier compounds seems to be the most effective in causing such effects on Uçá crabs.

Microlesions were not correlated to PAHs suggesting that there are other stressors acting upon local biota health.

Association of Comet assay and the micronucleus results reinforce the importance of doing both tests concomitantly.

The contamination level of Potengi Mangrove may compromise the conservation status of the *Ucides cordatus*. Further studies integrating other contaminants, are required to better understand the health of these environment and, consequently, the Uçá preservation.

5 REFERENCES

- Abdel-Shafy, H.I. and Mansour, M.S.M, 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**. 25, 107–123.
- Adam, M.L. *et al.*, 2013. Assessment of Genome Damage in Bird and Mammal Species as a Tool for Improvements in ex-situ Conservation at Zoos. **Natureza & Conservação**. 11, 59-64.
- Alemán, A. *et al.*, 2015. Caracterización química del material particulado PM10 de la zona urbana de Cuenca- Ecuador e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares A549. **Rev. Toxicol.** 32, 121-126.
- Araldi, R.P., 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 72, 74–82.
- Arantes, A.C.R. *et al.*, 2016. Frequency of fish micronuclei to diagnose aquatic environmental conditions from Brazilian megacities: a case study of Iguaçu river, Southern Brazil. **R. Bras. Bioci.** 14, 111-116.
- Arlt, V.M. *et al.*, 2012. Exposure to benzo[a]pyrene of Hepatic Cytochrome P450 Reductase Null (HRN) and P450 Reductase Conditional Null (RCN) mice: Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts by immunohistochemistry and 32P-postlabelling. **Toxicology Letters**. 213, 160-166.
- Baumard, P. *et al.*, 1998. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments and Mussels of the Western Mediterranean Sea. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 17, nº 5, 765–776.
- Barale, R. *et al.*, 1991. Correlations between 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and the mutagenicity of the total PAH fraction in ambient air particles in La Spezia (Italy). **Mutation Research**. 249, 227-241.
- Bernardo, D.L. *et al.*, 2016. Carcinogenicidade de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. **Química Nova**. 39, nº 7, 789-794.
- Binkova, B. *et al.*, 2007. PAH–DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. **Mutation Research**. 620, 49–61.
- Bihanic, F. *et al.*, 2015. Environmental concentrations of benz[a]anthracene induce developmental defects and DNA damage and impair photomotor response in Japanese medaka larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 113, 321–328.
- Boitsov, S. *et al.*, 2009. Natural background and anthropogenic inputs of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in sediments of South-Western Barents Sea. **Marine Environmental Research**. 68, 236–245.

Bonassi, S. *et al.*, 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. 28, n° 3, 625-31.

Bolognesi, C. and Degan, P., 2001. Genotoxicity Biomarkers in Aquatic Organisms as Indicators of Carcinogenic Marine Pollutants. Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach. Chapter 3.

Burgeot, T. and Galgani, E.H.F., 1995. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. **Mutation Research**. 342, 125-140.

Brianezi, G. *et al.*, 2009. Development and validation of a quantitative image analysis method to evaluate comet assay (silver staining). **J Bras Patol Med Lab**. 45, n° 4, 325-334.

CAERN – Companhia de Águas e Esgotos do Rio Grande do Norte. ETE do Baldo - Natal/RN. Disponível em: <http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/caern/DOC/DOC000000000017758.PDF>

Cai, Y. *et al.*, 2016. Over 100-year sedimentary record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine compounds (OCs) in the continental shelf of the East China Sea. **Environmental Pollution**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.053>.

Carreras H.A. *et al.*, 2013. Composition and mutagenicity of PAHs associated with urban airborne particles in Córdoba, Argentina. **Environmental Pollution**. 178, 403-410.

Cardoso, F.D. *et al.*, 2016. A critical and comparative appraisal of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended particulate material from a large South American subtropical estuary. **Environmental Pollution**. 214, 219-229.

Cebulska-Wasilewska *et al.*, 2007. Repair competence assay in studies of the influence of environmental exposure to c-PAHs on individual susceptibility to induction of DNA damage. **Mutation Research**. 620, 155–164.

Cerezo, M.I and Agustí, S. 2015. PAHs reduce DNA synthesis and delay cell division in the widespread primary producer *Prochlorococcus*. **Environmental Pollution**. 196, 147-155.

CEPENE – Boletim Técnico-Científico do Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Nordeste – Tamandaré/PE, 2000. 8, n° 1, 1-301.

Collins, A.R., 2014. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1840, 794–800.

CODERN – Companhia Docas do Rio Grande do Norte, 2016. Available in: <http://codern.com.br/porto-de-natal/>.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, 1993. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/E4B1AB8F/CPEAERL-ERM.pdf>.

Countway, R.E. *et al.*, 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions and associations with organic matter in surface waters of the York River, VA Estuary. **Organic Geochemistry**. 34, 209–224.

Chase, D.A., *et al.*, 2013. Bioaccumulation of petroleum hydrocarbons in fiddler crabs (*Uca minax*) exposed to weathered MC-252 crude oil alone and in mixture with an oil dispersant. **Science of the Total Environment**. 444, 121–127

Hartmann, D.M.; Blaszyk, H., 1998. Mitogenic short-term effects on hepatocytes and adrenocortical cells: phenobarbital and reserpine compared to carcinogenic and noncarcinogenic fluorene derivatives. **Exp Toxic Pathol**. 50, 416—424.

Davies, B.E., 1974. Loss on ignition as an estimate of soil organic matter. **Soil. Sci. Am.** Vol. 38, 347-353p.

Deng, Q. *et al.*, 2014. Plasma microRNA Expression and Micronuclei Frequency in Workers Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ Health Perspect.* 122, 719–725.

Duarte, L.F.A. *et al.*, 2016. Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western atlantic. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 133, 176–187.

Duodu, G.O. *et al.*, 2016. Source apportionment and risk assessment of PAHs in Brisbane River sediment, Australia. *Ecol. Indic.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.10.038>.

DNIT – Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes. Available in: <http://www.dnit.gov.br/rodovias/operacoes-rodoviaras/rio-grande-do-norte>

Ertl, N.G. *et al.*, 2016. Combined exposure to pyrene and fluoranthene and their molecular effects on the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. **Aquatic Toxicology**. 177, 136–145.

Falck, G. C. M. *et al.*, 2002. Nature of anaphase laggarads and micronuclei in female cytokinesis blocked lymphocytes. **Mutagenesis**. 17, 111–117.

FEMURN – Federação dos Municípios do Rio Grande do Norte, 2008. Disponível em: <http://www.femurn.org.br/noticia/103/>.

FEMURN – Federação dos Municípios do Rio Grande do Norte, 2013. Disponível em: <http://www.femurn.org.br/noticia/3487/>.

Fenech, M. 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 392, nº 1-2, 11-18.

Flora, S.; Bagnasco, M.; Zanicchi, P., 1991. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutation Research**. 258, 285-320.

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

González-Fernández, C. *et al.*, 2016. Effect of mussel reproductive status on biomarker responses to PAHs: Implications for large-scale monitoring programs. **Aquatic Toxicology**. 177, 380-394.

Guo, W. *et al.*, 2009. Distribution, partitioning and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in Daliao River water system in dry season, China. **Journal of Hazardous Materials**. 164, 1379-1385.

Guo, R. *et al.*, 2017. The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene and chrysene. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 191, 36-51.

IARC - International Agency for Research on Cancer, 2003. **Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data**. Vol. 32.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=240810&search=rio-grande-do-norte|natal>.

Irwin, R.J. *et al.*, 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia Indeno(1,2,3-c,d)Pyrene Entry. National Park Service Water Resources Divisions, Water Operations Branch.

Irwin, R.J. *et al.*, 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia Fluoranthene Entry. National Park Service Water Resources Divisions, Water Operations Branch.

Irwin, R.J. *et al.*, 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia Pyrene Entry. National Park Service Water Resources Divisions, Water Operations Branch.

Irwin, R.J. *et al.*, 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia Phenanthrene Entry. National Park Service Water Resources Divisions, Water Operations Branch.

Irwin, R.J. *et al.*, 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia Benzo(a)Anthracene Entry. National Park Service Water Resources Divisions, Water Operations Branch.

Irwin, R.J. *et al.*, 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia Dibenzo(a,b)Anthracene Entry. National Park Service Water Resources Divisions, Water Operations Branch.

Ke, Y. *et al.*, 2014. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in leather products using solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. **Microchemical Journal**. 112, 159–163.

Kurihara, R., *et al.*, 2005. Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastal Japanese waters. **Environ. Toxicol. Chem.** 1984-1993.

Lauenstein, G.G. and Cantillo, A.Y., 1998. Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program mussel watch project: 1993–1996 Update. Dept. of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, Coastal Monitoring and Bioeffects Assessment Division, Office of Ocean Resources Conservation and Assessment, National Ocean Service, Silver Spring, MD.: U.S, p. 257.

Lee, R.F., and Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**. 544, 43–64.

Liu, S., *et al.*, 2016. Levels, sources and risk assessment of PAHs in multi-phases from urbanized river network system in Shanghai. **Environmental Pollution**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.010>.

Li, F. *et al.*, 2014. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments and plants of mangrove swamps in Shenzhen, China. **Marine Pollution Bulletin**. 85, 590–596.

Li, C.K., Kamens, R.M., 1993. The use of polycyclic aromatic hydrocarbons as sources signatures in receptor modeling. **Atmospheric Environment**. 27A, 523–532.

Lin, M. *et al.*, 2016. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in textile dyeing sludge with ultrasound and Fenton processes: Effect of system parameters and synergistic effect study. **Journal of Hazardous Materials**. 307, 7–16.

Lu, X., *et al.*, 2010. Temporal gene expression changes induced by a low concentration of benzo[a]pyrene diol epoxide in a normal human cell line. **Mutation Research**. 684, 74–80.

Macdonald, D.D. *et al.*, 1996. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. **Ecotoxicology**. 5, 253-278.

Maciel, D.C. *et al.*, 2015. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons en a urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. 101, 429-433.

Maciel, D.C. *et al.*, 2016. Hydrocarbons in sediments along a tropical estuary-shelf transition area: Sources and spatial distribution. **Marine Pollution Bulletin**. 113, 566-571.

Machado, A.A.S *et al.*, 2014. Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivípara*. **Marine Environmental Research**. 98, 96-105

Martins, C.C. *et al.*, 2010. Historical record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and spheroidal carbonaceous particles (SCPs) in marine sediment cores from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Environmental Pollution**. 158, 192–200.

Meador, J.P., 2016. Contaminants of emerging concern in a large temperate estuary. **Environmental Pollution**. 213, 254–267.

Michalec, F.G. *et al.*, 2016. Lipid nanocapsules for behavioural testing in aquatic toxicology: Time–response of *Eurytemora affinis* to environmental concentrations of PAHs and PCB. **Aquatic Toxicology**. 170, 310–322.

Mitchelmore, C.L. and Chipman, J.K., 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**. 399, 135–147.

Motelay-Massei *et al.*, 2004. Distribution and spatial trends of PAHs and PCBs in soils in the Seine River basin, France. **Chemosphere**. 55, 555–565.

Murphy, B.T. *et al.*, 2016. The occurrence of PAHs and faecal sterols in Dublin Bay and their influence on sedimentary microbial communities. **Marine Pollution Bulletin**. 106, 215–224.

Mujtaba, S.F. *et al.*, 2015. Superoxide mediated photomodification and DNA damage induced apoptosis by Benz(a)anthracene via mitochondrial mediated pathway. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 142, 92–102.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Annex II da Instrução Normativa nº5 de 21 de maio de 2004. Disponível em: <http://www.prpe.mpf.mp.br/internet/content/download/2830/22487/file/in052004mma.pdf>.

MPP – Ministério Público da Paraíba, 2009. Lei proíbe captura do caranguejo uçá. Jus Brasil. Disponível em: <http://amp-pb.jusbrasil.com.br/noticias/2075385/lei-proibe-captura-do-caranguejo-uca>.

Nordhaus, I. *et al.*, 2006. Litter processing and population food intake of the mangrove crab *Ucides cordatus* in a high intertidal forest in northern Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 67, nº 1–2, 239–250.

Nudi, A.H. *et al.*, 2007. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. **Environment International**. 33, 315–327.

Nudi, A.H. *et al.*, 2010. Biomarkers of PAHs exposure in crabs *Ucides cordatus*: Laboratory assay and field study. *Environmental Research* 110 (2010) 137–145.

Oga, S.; Camargo, M.M.A.; Batistuzzo, J.A.O., 2008. **Fundamentos de Toxicologia**. Atheneu Editora. São Paulo, 3ªed.

Oyo-Ita, O.E. *et al.*, 2013. Anthropogenic PAHs in mangrove sediments of the Calabar River, SE Niger Delta, Nigeria. **Applied Geochemistry**. 28, 212–219.

Oliveira, C.J.F. *et al.*, 2010. POPULAÇÃO CAIÇARA, MATA ATLÂNTICA E SITUAÇÃO ATUAL DO PALMITO-JUÇARA (*Euterpe edulis* MART.) NA REGIÃO DO RIO UNA DA ALDEIA (IGUAPE-SP), ENTORNO DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA JUREIA-ITATINS. **Revista Árvore**. 346, 1065-1073

Paul-Pont, I. *et al.*, 2016. Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. **Environmental Pollution**. 216, 724-737.

Piazza, R.S. *et al.*, 2016. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on genetranscription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*. **Aquatic Toxicology**. 177, 146–155.

Prefeitura Municipal de Natal, 2008. Zoneamento Ambiental de Natal. Available in: <https://natal.rn.gov.br/semurb/paginas/ctd-594.html>.

PETROBRAS – Petróleo Brasileiro. Combustíveis marítimos, informações técnicas. Available in: <http://sites.petrobras.com.br/minisite/assistenciatecnica/public/downloads/manual-tecnico-combustiveis-maritimos-assistencia-tecnica-petrobras.pdf>

PGI - Plataforma de Gestão de Indicadores, 2016. Available in: https://i3gov.planejamento.gov.br/balanc0/1%20-%20DESENVOLVIMENTO%20SUSTENTAVEL%20COM%20REDUCAO%20DESIGUALDADE/9%20-%20Incentivo%20Aquicultura%20e%20a%20Pesca/2%20-%20Obras/obras_pesca.xls

Queiroz, M. S. M. 2011. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Sedimentos de Fundodo Estuário do Rio Potengi, Região da Grande Natal (RN): Implicações Ambientais**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de pós-graduação em ciência e engenharia de petróleo – PPGCEP.

Ramdine, G. *et al.*, 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from mangrove of Guadeloupe: Levels, bioavailability, and effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 79, 80–89.

Rodrigues, E.T. and Pardal, M.A., 2014. The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. **Environment International**. 70, 158–182.

Ruiz, Y. *et al.*, 2011. Environmental quality of mussel farms in the Vigo estuary: Pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. **Environmental Pollution**. 159, 250-265.

Senado federal, 2015. BR-101 deverá ter o nome de "Governador Mário Covas". Disponível em: <http://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2001/09/06/br-101-devera-ter-o-nome-de-governador-mario-covas>

Silva, C.A.R. *et al.*, 2001. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophogae*, a local food source. **Water Research**. 35, nº 17, 4072– 4078.

Silva, C.A.R. *et al.*, 2003. Biomonitoring of trace metal contamination in the mangrove-lined Brazilian coastal system using the oyster *Crassostrea rhizophogae*: comparative study of regions affected by oil, salt pond and shrimp farming activities. **Hydrobiologia**. 501, 199– 206.

Silva, C.A.R. *et al.*, 2006. Concentration, stock and transport rate of heavy metals in a tropical red mangrove, Natal, Brazil. **Marine Chemistry**. 99, 2 –11.

Silva, C.A.R. *et al.*, 2007. Dynamics of phosphorus and nitrogen through litter fall and decomposition in a tropical mangrove forest. **Marine Environmental Research**. 64, 524–534

Silva, L.D.C. *et al.*, 2014. Evaluation of mutagenic and genotoxic activities of lobeline and its modulation on genomic instability induced by ethanol. **Life Sciences**. 103, 73–78.

Singh, N. P. *et al.* 1988. A Simple Techniue for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **EXP, Cell Res**. 175, 184-191.

Souza, I.S. *et al.*, 2016. Using an integrated approach to assess the sediment quality of an estuary from the semi-arid coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. 104, 70–82.

Soclo, H.H. *et al.*, 2000. Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. **Marine Pollution Bulletin**. 40, nº5, 387-396.

Suguio, K. 1973. **Introdução à Sedimentologia**. Edgard Blücher Ltda./EDUSP, São Paulo, SP. 317 p.

Shi, Z. *et al.*, 2005. Contamination of rivers in Tianjin, China by polycyclic aromatic hydrocarbons . **Environmental Pollution**. 134, 97–111.

Schmid W., 1975. The micronucleus test. **Mutat. Res**. 31, 9–15.

Schubel, J.R. and Kennedy, V.S., 1984. The Estuary as a filter: An Introduction. *Ocean Science for the Year 2000*. 1–11.

Sponchiado, G. *et al.*, 2016. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of Ethnopharmacology**. 178, 289–296

Tian, Y. *et al.*, 2008. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. **Marine Pollution Bulletin**. 57, 707–715.

Tolbert, P.E. *et al.*, 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, 271, 69-77.

Torreiro-Melo, A.G.A.G. *et al.*, 2015. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivípara*. **Chemosphere**. 132, 17–23.

UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Dados de Infra –estrutura e Saneamento. Disponível em: <http://www.cchla.ufrn.br/rmnatal/relatorio/prac4.pdf>.

UNEP, 1992. Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. Ref. Methods Mar. Pollut. Stud. 75.

USEPA, 1987. Nonpoint Source Guidance. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water and Office of Water Regulations and Standards, Washington, DC (December).

Vane, C.H. *et al.*, 2009. Organic and metal contamination in surface mangrove sediments of South China. **Marine Pollution Bulletin**. 58, 134–144.

Vilella, I.V. *et al.*, 2007. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutation Research**. 628, 76–86.

Walker, C.H. and Savva, D., 2001. BIOCHEMICAL RESPONSES OF CRABS (*Carcinus* spp) TO POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs) AS THE BASIS FOR NEW BIOMARKER ASSAYS. **Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach**. Chapter 17.

Wang, X. *et al.*, 2015. Characterizing the parent and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Hong Kong. **Marine Pollution Bulletin**. 98, 335–340.

Wang *et al.*, 2016. Studies on size distribution and health risk of 37 species of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with fine particulate matter collected in the atmosphere of a suburban area of Shanghai city, China. **Environmental Pollution**. 214, 149-160.

Wen, J. and Pan, L., 2016. Short-term exposure to benzo[a]pyrene causes oxidative damage and affects haemolymph steroid levels in female crab *Portunus trituberculatus*. **Environmental Pollution**. 208, 486-494.

Woo, S. *et al.*, 2006. Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Marine Pollution Bulletin**. 52, 1768–1775.

Wu, Q. *et al.*, 2014. Biological risk and pollution history of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Nansha mangrove, South China. **Marine Pollution Bulletin**. 85, 92–98.

Yang, S.Y.N. *et al.*, 1991. Polycyclic aromatic hydrocarbons in air, soil and vegetation in the vicinity of an urban roadway. **The Science of the Total Environment**. 102, 229–240.

Yakan, S.D., *et al.*, 2016. Numerical evaluation of bioaccumulation and depuration kinetics of PAHs in *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Pollution**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.009>.

Yunker, M.B. and Macdonald, R.W., 2003. Alkane and PAH depositional history, sources and fluxes in sediments from the Fraser River Basin and Strait of Georgia, Canada. **Organic Geochemistry**. 34, 1429–1454.

Yunker *et al.*, 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. **Organic Geochemistry**. 33, 489–515.

Xiu, M. *et al.*, 2014. Bioaccumulation and oxidative damage in juvenile scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and chrysene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 107, 103–110.

Zhang, J. *et al.*, 2004. Distribution and sources of polynuclear aromatic hydrocarbons in Mangrove surficial sediments of Deep Bay, China. **Marine Pollution Bulletin**. 49, 479–486.

Zhang, Y. *et al.*, 2011. Nitration of particle-associated PAHs and their derivatives (nitro-, oxy-, and hydroxy-PAHs) with NO₃ radicals. **Atmospheric Environment**. 45, 2515–2521.

Zhang, Y. *et al.*, 2016a. Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. **Environmental Pollution**. 213, 809–824.

Zhang, D. *et al.*, 2016b. Distribution, sources and ecological risk assessment of PAHs in surface sediments from the Luan River Estuary, China. **Marine Pollution Bulletin**. 102, 223–229.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 1. PAHs concentration (ng g⁻¹), percentage of organic matter and fines in sediments, and mean $\pm$ standard deviation of micronuclei (MN $\pm$ SD) in organisms collected from Potengi/Jundiaí estuary and Juréia.

Comp.	A 1	A 2	A 3	A 4	B 1	B 2	B 3	B 4	C 1	C 2	C 3	C 4	D 1	D 2	D 3	D 4	J1	J2	J3
N	<LQ	ND	ND	ND	<LQ	0.77	ND	3.1	0.8	2	<LQ	1.5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	7.6	6.0	4
Ayl	ND	ND	14.2	ND	0.4	3.1	2.9	2.1	2.9	2.2	1.5	2.3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.2	0.2	0.6
Aen	<LQ	<LQ	0.7	<LQ	1.2	1.5	2.4	4.7	1.5	17.3	2.7	10.6	ND	ND	<LQ	<LQ	LQ	LQ	ND
F	0.8	1.1	2.3	1.2	46	8.7	35.6	20.4	4	27.9	4.3	16.5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.3	0.4	0.3
Pn	8.6	7.2	11.1	5.9	16	8.1	27.4	41.7	25.4	113.2	24.2	71.8	<LQ	<LQ	0.7	ND	11.4	8.1	2.3
An	2.6	4.1	7.1	3.6	5.8	4.0	8.2	16	5.7	18.6	4.2	16.1	<LQ	ND	<LQ	<LQ	0.1	0.1	0.2
Fl	15.7	27.3	56	24	38.0	132.0	93.3	64.5	178.6	167.3	47	96.5	1	0.6	4.1	1.1	2.0	2.6	3.6
Py	18.5	29.3	58.5	28.7	46.5	139	108.6	73	161	129.9	43.5	74.7	1	0.6	3.4	1	3.9	5.4	4.8
BaA	11.2	18.3	40.1	12.8	24.9	48.8	44	29.4	76.7	79.3	22.6	44.2	ND	ND	2.5	1	0.3	0.2	2
Ch	8.4	22.6	49.6	19.9	34.2	60.4	70.7	44.1	79.7	87.1	26.5	44.9	0.7	0.4	2.6	0.8	1.6	2.3	3.1
BbF	11.4	19.6	55.1	15.9	22	49.1	47.8	32.5	49.6	74.5	20.3	40.7	0.5	0.4	1.9	0.5	0.6	0.6	1.7
BkF	8.7	12.8	41	10.4	20.6	47.2	41.1	19.4	59.4	66.1	15.6	33.6	0.4	0.3	1.6	0.5	0.3	0.2	3.8
BaP	10.6	18.2	63.7	14.5	24	48.4	52.4	23.3	79.1	81.6	22.2	44.1	0.4	<LQ	1.8	0.5	0.3	0.2	3.7
IP	11.8	17.7	86.1	16.5	29.2	59.6	47.0	27.9	85.8	103	29.7	53.6	0.6	0.4	2.2	0.8	0.8	0.5	5.0
DhA	3.2	4.6	14.7	4.2	5.7	10.2	9.7	5.4	11.6	18.5	5.9	8.8	ND	ND	0.4	<LQ	0.1	LQ	0.9
BghiP	9.8	13.3	54.3	12.2	19.3	45.5	29.7	19.5	65.1	76.5	24.2	38.6	0.8	0.5	2.1	1.0	0.5	0.4	3.2
$\Sigma 16$ HPAs	121.2	196	554.6	169.9	292.5	666.3	620.6	426.9	886.8	1065.2	294.3	598.7	5.4	3.3	23.2	7.2	30	27.3	39.3
OM (%)	8.88%	18.09%	24.97%	14.89%	12.61%	7.50%	4.66%	8.47%	3.87%	10.47%	8.37%	6.08%	3.15%	3.09%	2.70%	3.45%			
Fines (%)	55.92	56.27	57.92	62.04	38.20	31.73	20.27	31.14	13	16.23	15.09	15.44	37.09	22.55	19.26	16.36			
MN$\pm$SD	15 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3.2	7 $\pm$ 3.6	7 $\pm$ 3.2	14 $\pm$ 5.5	18 $\pm$ 7.8	19 $\pm$ 7	8 $\pm$ 2.5	22 $\pm$ 3.5	19 $\pm$ 5.1	25 $\pm$ 2.1	13 $\pm$ 1.5	6 $\pm$ 2.5	9 $\pm$ 3.1	10 $\pm$ 5.6	7 $\pm$ 1.5	1 $\pm$ 0.8	1,2 $\pm$ 1	1,1 $\pm$ 0.9

6 CONCLUSÃO GERAL

- O estuário do Rio Potengi/Jundiaí está moderadamente contaminado por HPAs, resultante principalmente das atividades náuticas e lançamento de esgotos;
- O processo de combustão de biomassa e de combustíveis fósseis são as principais fontes de HPAs para o estuário;
- Os danos genéticos observados no *U. cordatus*, se manifestaram de formas diferentes, mostrando que os organismos estão sob influência de diferentes estressores;
- Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estão causando danos irreparáveis (macrolesões) nos DNAs dos caranguejos-Uçá, e podem comprometer a conservação destes organismos;
- O ensaio cometa e o teste de micronúcleo se mostraram importantes ferramentas no estudo de danos no DNA na espécie *U. cordatus*;
- São necessários estudos integrando outros contaminantes, para uma maior compreensão das pressões antrópicas que este ecossistema está exposto.

REFERÊNCIAS

- AUGUSTYNIAK, M. *et al.*, 2014. DNA damage in grasshoppers' larvae – Comet assay in environmental approach. **Chemosphere**. 96, 180–187.
- ADAM, M.L., *et al.*, 2010. Environmental Degradation at a Public Park in Southern Brazil as Revealed Through a Genotoxicity Test (MN) on Peripheral Blood Cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). **Water Air Soil Pollut.** 211, 61–68.
- ADAMS, J.B. *et al.*, 2016. Distribution of macrophyte species and habitats in South African estuaries. **South African Journal of Botany**. 107, 5–11.
- AGOSTINHO, A., FLUES, M., 2006. Determinação do Coeficiente de Distribuição (Kd) de Benzo(a)Pireno em Solo por Isotermas de Sorção. **Quim. Nova**. Vol. 29, nº 4, 657-661P.
- ANGERER, J.; MANNUSCHRECK, C.; GUNDEL, J. 1997. Int. Arch. Environ. Health. Vol 70, 365.
- AMORIM, L.C.A. 2003. Os Biomarcadores e sua aplicação na Avaliação da Exposição aos Agentes Químicos Ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. Vol 6, nº 2.
- ANDRADE, L.N. 2010. Autodepuração dos corpos d'água. **Revista da Biologia**. Vol 5. Disponível em: www.ib.usp.br/revista.
- ANTAQ - 2008. **Infra-estrutura e logística retroportuária de Itaguaí / RJ**. Marcos Maia Porto, - Gerente de Meio Ambiente. Apresentação Foro de Itaguaí- Itaguaí/RJ. Acesso em: 02/10/2014 Disponível em: <http://www.antaq.gov.br/portal/pdf/palestras/marcosmaiaportoapresentacaoforoitaguai08.pdf>.
- ALVES, R.R.N. & NISHIDA, A.K. 2002. A ECDISE DO CARANGUEJO-UÇÁ, *Ucides cordatus* L. (DECAPODA, BRACHYURA) NA VISÃO DOS CARANGUEJEIROS. **Interciência Mar**. Vol. 27 Nº 3
- ALVES, R.R.N. & NISHIDA, A.K. 2003. ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS E PERCEPÇÃO AMBIENTAL DOS CATADORES DE CARANGUEJO-UÇÁ *Ucides cordatus cordatus* (L. 1763) (DECAPODA, BRACHYURA) DO ESTUÁRIO DO RIO MAMANGUAPE, NORDESTE DO BRASIL. **Rev. Interciência**. Vol. 28 Nº 1
- ARALDI, R.P., 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 72, 74–82.
- ARSLAN, *et al.*, 2015. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliag~a Bay Turkey. **Marine Pollution Bulletin**. Vol. 94, 48–54p.

ARLT, V.M. *et al.*, 2012. Exposure to benzo[a]pyrene of Hepatic Cytochrome P450 Reductase Null (HRN) and P450 Reductase Conditional Null (RCN) mice: Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts by immunohistochemistry and 32P-postlabelling. **Toxicology Letters**. 213, 160-166.

AWABDI, D.R.; SICILIANO, S., BENEDITTO, A.P.M., 2013. Ingestão de resíduos sólidos por tartarugas-verdes juvenis, *Chelonia mydas* (L. 1758), na costa leste do estado do Rio de Janeiro. **Brasil. Biotemas**. Vol. 26, nº 1, 197-200p.

BARBOSA, K.B.F, *et al.*, 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** Vol. 23, nº4, 629-643p.

BARROSO, H.S., 2010. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Organismos Marinhos da Baía do Almirantado, Península Antártica. Doutorado em Ocenografia Química e Geológica (Tese). Universidade de São Paulo – USP.

BARHOUMI, B. *et al.*, 2016. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and eel (*Anguilla anguilla*) from Bizertelagoon, Tunisia, and associated human health risk assessment. **Continental Shelf Research**. 124, 104–116.

BELARMINDO, P.H.P, *et al.*, 2014. Resíduos sólidos em manguezal no rio Potengi (Natal, RN, Brasil): relação com a localização e usos. **Journal of Integrated Coastal Zone Management**. Vol. 14, nº 3, 447-457p.

BELPAEME, K., COOREMAN, K. & KIRSH-VOLDERS, M. 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutag.** Vol. 415, 167-184p.

BERNARDO, D.L. *et al.*, 2016. Carcinogenicidade de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. **Quim. Nova**. Vol. 39, nº7, 789-794p.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.L.V. & MIOT, H.A. 2009. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J Bras Patol Med Lab**. Vol. 45. nº 4, 325-334p.

BÍCEGO, M.C. *et al.*, G. 2008. Poluição por petróleo, in: Baptista Neto, J.A., Wallner-Kersanach, M., Patchineelam, S.M. (Eds.), Poluição Marinha. Rio de Janeiro. **Interciência Ltda**.

BONASSI, S. *et al.* 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. Vol. 28, nº3, 625–631p.

BURCKER, A., CARVALHO, W., ALVES-GOMES, J.A. 2006. Avaliação da Mutagênese e Genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) Expostos ao Benzeno. Vol. 36, nº3, 357 – 364p.

BRANCO, J. O. 1993. Aspectos Bioecológicos do Caranguejo *Ucides cordatus* (LINNAEUS 1763) (Crustacea, Decapoda) do Manguezal do Itacorubi, Santa Catarina, BR. **Arq. Biol. Tecnol.** Vol. 36, nº 1, 133-148p.

CAI, Y. *et al.*, 2016. Over 100-year sedimentary record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine compounds (OCs) in the continental shelf of the East China Sea. **Environmental Pollution**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.053>.

CABRAL, W. B. M. 2014. **Análise da genotoxicidade in vivo dos agrotóxicos ciromazina e mancozeb em baixas doses**. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente. p. 99.

CARDOSO, F.D. *et al.*, 2016. A critical and comparative appraisal of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended particulate material from a large South American subtropical estuary. **Environmental Pollution**. 214, 219-229.

CANUTO, 2002. Disponível em: <http://www.igc.usp.br/index.php?id=309>

CARRERAS, H.A. *et al.*, 2013. Composition and mutagenicity of PAHs associated with urban airborne particles in Córdoba, Argentina. **Environmental Pollution**. 178, 403-410.

CARRACOZA, L.S. 2011. **Hidrocarbonetos Alifáticos em Sedimentos de Fundo do Estuário do Rio Potengi, Grande Natal (RN): Implicações Ambientais**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia do Petróleo - UFRN.

CARUSO, M.S.F. & ALABURDA, j., 2008. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. Vol. 67, nº 1, 1-27p.

CEBULSKA-WASILEWSKA *et al.*, 2007. Repair competence assay in studies of the influence of environmental exposure to c-PAHs on individual susceptibility to induction of DNA damage. **Mutation Research**. 620, 155–164.

CEPENE – Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Nordeste, 2000. **Boletim Técnico Científico**. Vol. 8, nº1.

CEREZO, M.I and Agustí, S. 2015. PAHs reduce DNA synthesis and delay cell division in the widespread primary producer *Prochlorococcus*. **Environmental Pollution**. 196, 147-155.

COELHO, C.V. *et al.*, 2007. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas de Mucosa Bucal. **Rev. Fac. Odontol.** Porto Alegre, Vol. 48, nº1/3, 77-81p.

CONAMA – **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. 2000. Resolução N° 273 de 29 de novembro de 2000.

CONSTANZA, R., R. *et al.*, 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**. 387, 253–259.

COTELLE S. & FÉRARD J. F., 1999. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. Vol. 34, 246 – 255p.

COELHO, P.A. & RAMOS, M.A. 1972. **A constituição e a distribuição da fauna de decápodes do litoral leste da América do Sul, entre as latitudes 5°N e 39°S**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, DF. Trab. oceanogr. Univ. Fed. Per., Recife. Vol.13, 133-236p.

CHRISTOFOLETTI, R.A. 2005. **Ecologia Trófica do Caranguejo-Uçá, *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763) (Crustacea, Ocypodidae) e o Fluxo de Nutrientes em Bosques de Mangue, na Região de Iguape (SP)**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CROTT, J.W. *et al.* 2001. MTHFR C677T polymorphism does not alter folic acid deficiency-induced uracil incorporation into primary lymphocyte DNA in vitro. (Accelerated Paper). **Carcinogenesis**. Vol. 22, 1019–1025p.

DAVANZO, M.B. *et al.*, 2013. Biomarkers in mangrove root crab *Goniopsis cruentata* for evaluating quality of tropical estuaries. **Marine Environmental Research**. 91, 80-88.

DAVIES, B.E., 1974. Loss on ignition as an estimate of soil organic matter. **Soil. Sci. Am.** Vol. 38, 347-353p.

DUDHAGARA, D.R. *et al.*, 2016. Distribution, sources and ecological risk assessment of PAHs in historically contaminated surface sediments at Bhavnagar coast, Gujarat, India. **Environmental Pollution**. 213, 338-346.

DUTRA, I. 2007. **Investigação de lesões em DNA induzidas pelo Hidrocarboneto policíclico aromático antraceno**. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Departamento de análises clínicas e toxicológicas. Programa de pós-graduação em toxicologia e análises toxicológicas.

DUARTE, L.F.A, *et al.*, 2016. Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763, Brachyura, Ocypodidae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western Atlantic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol.133, 176–187p.

ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY - **EPA** 1986. Quality criteria for water 1986. EPA 440/5-86-001. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

ERTL, N.G. *et al.*, 2016. Combined exposure to pyrene and fluoranthene and their molecular effects on the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. **Aquatic Toxicology**. 177, 136–145.

FENECH, M.; DREOSTI, I.E.; RINALDI, J.R. 1997. Folate vitamin b12, homocysteine status and cromossome damage rate in lymphocytes of older man. **Carcinogenesis**. Vol. 18,1329-1336p.

FENECH, M. 2002. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**. Vol.2 Nº.5.

FENECH, M. *et al.* 2005. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, b-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis**. Vol. 26, 991–999p.

FLORES, C.P. *et al.*, 2017. Management of transboundary estuaries in Latin America and the Caribbean. **Marine Policy**. 76, 63–70.

FRANÇA, S. & CABRAL, H.N. 2016. Predicting fish species distribution in estuaries: Influence of species' ecology in model accuracy. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 180, 11-20.

FREIRE, M.M. *et al.* 2008. Biomarcadores na Avaliação da Saúde Ambiental dos Ecossistemas Aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. Vol.12, nº3, 347-354p.

GARRISON, T. 2010. **Fundamentos de Oceanografia**. 4º Ed. São Paulo. Cengage Learning.

GUTIERREZ, J.M., VILLAR, S., PLAVAN, A.A., 2015. Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Rio de la Plata (Uruguay). **Marine Pollution Bulletin**. Vol. 91, 518–523p.

HARTMANN, P. C. *et al.* 2005. Depositional history of organic contaminants in Narragansett Bay, Rhode Island, USA. **Mar. Pollut. Bull.** Vol. 50, nº 4, 388-395p.

HARVEY, R. G., 1996. **Polycyclic Aromatic Compounds**. Vol.9, nº1.

IBAMA - **Portaria IBAMA nº 1.208, 22 de novembro de 1989**. http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/1989/p_ibama_1208_1989_definetamanhominimocaranguejouca_ne.pdf.

IARC - **International Agency for Research on Cancer. 2003**. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>.

IBAMA - **Lei nº 9.605, de 12 de Fevereiro de 1998**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9605.htm.

IBAMA, 2008. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/noticias-2008/ibama-alerta-para-o-consumo-dos-caranguejos-uca-e-goiamum>.

IBAMA, 2014. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/publicadas/defeso-do-caranguejo-ibama-apreende-e-multa-ilegais>.

IBAMA – **Diário Oficial da União**. Nº 1, sexta-feira, 2 de janeiro de 2015 - <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=02/01/2015&jornal=1&pagina=81&totalArquivos=128>.

IBGE, 2004. **Indicadores de desenvolvimento sustentável - Brasil 2004 - Dimensão ambiental** - Oceanos, mares e áreas costeiras.

IRWIN, R.J. *et al.*, 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia PAHs. National Park Service Water Resources Divisions, Water Operations Branch.

IVO & GESTEIRA. **ICMBIO**. Acesso em 07/09/2015. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cepene/images/stories/publicacoes/btc/vol07/btc-vol07.pdf>.

ROCHA, A.J.S. *et al.*, 2015. GENOTOXICITY OF SHALLOW WATERS NEAR THE BRAZILIAN ANTARCTIC STATION "COMANDANTE FERRAZ" (EACF), ADMIRALTY BAY, KING GEORGE ISLAND, ANTARCTICA. **BRAZILIAN JOURNAL OF OCEANOGRAPHY**. Vol. 63, nº1, 63-70p.

KASIOTIS, K.M. *et al.*, 2015. Organic pollution and its effects in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* in Eastern Mediterranean coasts. **Chemosphere**. Vol. 119, 145–152p.

LAUENSTEIN, G. G. & CANTILLO, A. Y. 1998. **Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project: 1993-1996 Update**. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 130.

LEE, R.F. and STEINERT, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**. Vol. 544, 43–64p.

LI, Y. *et al.*, 2016. Assessing spatial vulnerability from rapid urbanization to inform coastal urban regional planning. **Ocean & Coastal Management**. 123, 53-65

MACIEL, D.C. *et al.*, 2015. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. 101, 429-433

MACGREGOR, J.T. 1990. Dietary factors affecting spontaneous chromosomal damage in man. **Prog Clin Biol Res**. Vol. 347, 139–153p.

MARNETT, L. J.; PLASTARAS, J. P., 2001. Endogenous DNA damage and mutation. **Trends in Genetics**. Vol.17, 214-221p.

MELO, F. R. 2011. **Avaliação dos efeitos do hidrocarboneto aromático fenantreno e do metal cobre em juvenis do peixe Poecilia vivípara**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Pernambuco.

MUTTI, A.; BERGAMASCHI, E., 1996. Idrocarburi policiclici aromatici negli ambienti di vita e di lavoro: esposizione ed effetti; Apostoli, P.; Minoia, C.; Alessio, L., Eds.; ATTI, Gargnano. 213 p.

MMA - Ministério do Meio Ambiente, 2004. **ANÁLISE DAS DIRETRIZES INTERNACIONAIS PARA AVALIAÇÃO DA PROPOSTA DE RESOLUÇÃO SOBRE LICENCIAMENTO AMBIENTAL DAS ATIVIDADES DE DRAGAGEM EM ÁGUAS JURISDICIONAIS BRASILEIRAS E GERENCIAMENTO DE MATERIAL DRAGADO.**

MPP – Ministério Público da Paraíba. **Lei proíbe captura do caranguejo uçá | Notícias JusBrasil.** Disponível em: <http://amppb.jusbrasil.com.br/noticias/2075385/leiproibecapturadocaranguejouca?print=true>.

NETTO, A.D.P. *et al.*, 2000. Aaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e Seus Derivados Nitratos (NHPAS): Uma Revisão Metodológica. **Rev. Química Nova**. Vol.23, nº6.

NUDI, A.H. *et al.*, 2007. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. **Environment International**. Vol. 33, 315–327p.

NUDI, A.H. *et al.*, 2010. Biomarkers of PAHs exposure in crabs *Ucides cordatus*: Laboratory assay and field study. **Environmental Research**. Vol. 110, 137–145p.

NRC, 2003. National Research Council. **Oil in the sea III: Inputs fates and effects**. Washington, National Academy of Sciences, 265 p.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A., O2008. **Fundamentos de Toxicologia**. ATHENEU Editora. SÃO PAULO, 3ª. EDIÇÃO.

PAUL-PONT, I. *et al.*, 2016. Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. **Environmental Pollution**. 216, 724-737.

PAOLO, C. 2006. **Aplicação do Ensaio Cometa a Estudo de Danos do DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos a β -naftoflavona**. Dissertação de mestrado do Instituto Oceanográfico/SP.

PERUZZO, F. M. e CANTO, E. L. 2006. **Química na Abordagem do Cotidiano**. 4. ed. São Paulo: Moderna, Química Orgânica. Vol. 3.

PINHEIRO, M.A.A *et al.*, 2013. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. **Environ Monit Assess**. 185, 8273–8285.

PREFEITURA de NATAL & SEMURB, 2008. **Zoneamento Ambiental de Natal**.

PREFEITURA MUNICIPAL DE NATAL, 2014. **Plano Municipal de Saneamento Básico do Município de Natal/RN**. Disponível em: https://natal.rn.gov.br/seharpe/File/DIAGNOSTICO_DRENAGEM.pdf.

QUEIROZ, M. S. M. 2011. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Sedimentos de Fundodo Estuário do Rio Potengi, Região da Grande Natal (RN): Implicações Ambientais**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de pós-graduação em ciência e engenharia de petróleo - PPGCEP

RAJAGOPALAN, H. et al. 2004. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. **Nature**. Vol. 428, 77–81p.

SAMANTA, S.K.; SINGH, O.V.; JAIN, R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**. Vol. 20, nº6, 243-248p.

SINGH, N. P. et al. 1988. A Simple Techniuqe for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **EXP, Cell Res**. Vol. 175, 184-191p.

SILVA, C.A.R. et al., 2001. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophogae*, a local food source. **Water Research**. 35, nº 17, 4072– 4078.

SILVA, J. 2007. **O USO DO ENSAIO COMETA PARA O ENSINO DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA**. 30-33p. www.sbg.org.br.

SILVA, J. S. 2013. **Biomarcadores ecotoxicológicos para análise da exposição de *Poecilia vivipara* ao fenantreno**. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas Monografia (graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas (Ambientais), 2013.

SUGUIO, K., 1973. **Introdução à sedimentologia**. Editora E. Blücher, São Paulo.

SCHMID, W., 1975. The micronucleus test. **Mutat. Res**. Vol. 31, 9–15p.

STANSBURY, K. H.; Flesher, J. W.; Gupta, R. C.; **Chem. Res. Toxicol.** 1994, Vol. 7, 254.

TEIXEIRA, M. 2007. Explicação diversa para a origem do câncer, com foco nos cromossomos, e não nos genes, ganha corpo no *establishment* científico. **Rev. Latinoam. Psicopat. Fund.** São Paulo. Vol. 10, nº 4, 664-676p.

TORREIRO-MELO, 2010. **Toxicidade e biorremediação em sedimento contaminado, utilizando o copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis***. Dissertação (Mestrado em Oceanografia), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

TORREIRO-MELO, A.G.A.G. et al., 2015. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**. Vol. 132, 17–23p.

TOLBERT, P. E., SHY, C. M., ALLEN, J. W. 1992. MICRONUCLEI AND OTHER NUCLEAR ANOMALIES IN BUCAL SMEARS: METHODS DEVELOPMENT. **Mutat. Res, Amsterdam**. Vol. 271, nº1, 69-77p.

TOMMASI, L. R., 1989. **Tendências da poluição dos oceanos**. *Bol. IG-USP, Publ. espec.* n.6, pp. 94-99. ISSN 0102-6275.

UNEP - UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, 1992. **Determination of petroleum hydrocarbons in sediments**. Reference Methods For Marine Pollution Studies No. 20.

UMEGAKI, K.; FENECH, M. 2000. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. **Mutagenesis**. Vol. 15, 261–269p.

URIBE-HERNANDEZ, R., PEREZ-ZAPATA, A. J., 2005. In vitro DNA fragmentation by anthracene and benzo[a]pyrene in human polymorphonuclear leukocytes. *Rev. Interciencia*. Vol. 30, 7^{ed}, 419-423p.

VANHAUWAERT, A; VANPARYS, P.; VOLDERS, M. K, 2001. The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. **Mutagenesis**. Vol. 16, 39-50p.

VIARENGO, A. *et al.*, 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant – induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.: Toxicology and Pharmacology*. Vol. 146, n^o3, 281-300p.

VOLKMAN *et al.*, 1992. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. **The Science of the Total Environmen**. 112, 203-219.

WOO, S. *et al.*, 2006. Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Marine Pollution Bulletin**. Vol. 52, 1768–1775p.

WHO. 1983. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, chemical environmental and experimental data, 32. **International Agency for Research on Cancer**. World Health Organization. 477 p.

ZANARDI-LAMARDO, E. *et al.*, 2000. Southern Brazil. Seas at the millennium: **An Environmental Evaluation**, Vol. 47, 731-747p.

APÊNDICE: MATERIAIS E MÉTODOS

1 AMOSTRAGEM

O estudo foi realizado em 04 estações na região estuarina do Rio Potengi, denominadas St. A à D (Tabela 01). As coletas foram realizadas nos dias 24 e 25 de novembro/2015 (período de estiagem), durante a vazante, na maré de sizígia. Em cada estação foram coletados 12 caranguejos e os sedimentos de sua loca. Os sedimentos de cada 3 locas foram agrupados, formando 4 amostras compostas para cada estação. Desta forma, foi gerado um total de 16 sedimentos e 48 caranguejos. A Estação Ecológica da Juréia (JIES) - Itatins/SP foi estabelecida como ponto controle, onde foram coletados 30 caranguejos em 3 estações (10 por estação), e sedimentos do mangue. Esta área tem sido utilizada como controle em diversos estudos pelo grupo do Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental - UFPE, e no Brasil (PINHEIRO *et al.*, 2013; DUARTE *et al.*, 2016).

A estação A é a mais distante da costa, localizada em uma curva acentuada do rio, e está próxima à BR 101. A St. B fica na margem oposta ao canal do Baldo, um canal que recebe a drenagem urbana da cidade de Natal, e deságua no estuário (Prefeitura Municipal de Natal, 2014); A St. C fica na margem oposta ao terminal pesqueiro de Natal; e a St. D está localizada na entrada da gamboa de Jaguaribe e é o ponto mais próximo da costa (Tabela 01).

Tabela 1. Coordenadas das estações de coleta de sedimento e caranguejo no Estuário do Rio Potengi. 24 e 25 de novembro/2015

Data de Coleta	Estação	Latitude	Longitude
24/11/2015	St.A	S 05°47'0,4"	W 35°15'2,4"
24/11/2015	St.B	S 05°47'0,1"	W 35°13'4,4"
25/11/2015	St.C	S 05°46'38,8"	W 35°12'39,5"
25/11/2015	St.D	S 05°46'5,6"	W 35°12'43,9"

2 ANÁLISES BIOLÓGICAS

2.1 PARÂMETROS FÍSICOS DOS CARANGUEJOS

Os caranguejos foram levados ao laboratório para retirada do material biológico (hemolinfa). O sexo dos *U. cordatus* foi identificado através do dimorfismo sexual do abdômen. Os parâmetros físicos tais como peso, comprimento e largura da carapaça foram medidos usando uma balança digital e paquímetro. Posteriormente, os organismos foram devolvidos ao mangue do estuário Potengi/Jundiaí.

2.2 ANÁLISE DE MICRONÚCLEO

O teste de micronúcleo seguiu o protocolo descrito por Schmid (1995). As lâminas utilizadas para esta análise foram lavadas com sabão neutro (Extran – 2%), mergulhadas em um béquer com álcool etílico e secas em temperatura ambiente por 24h. Para a retirada da hemolinfa de cada caranguejo, foi feita a punção com uma seringa, contendo solução anticoagulante, na articulação de uma das patas. A hemolinfa foi gotejada sobre a lâmina e, na sequência, foi realizado um esfregaço. As lâminas foram imersas em metanol por 15 min, para fixação das células, seguidas da adição do corante Giemsa. Um total de 500 células foram analisadas e as células micronucleadas foram quantificadas em microscópio óptico comum, utilizando a objetiva de 100x com óleo de imersão.

2.3 ENSAIO COMETA ALCALINO

Os mesmos organismos utilizados para o teste de micronúcleo foram usados para o teste do ensaio cometa alcalino. A metodologia seguiu o protocolo estabelecido no Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (LAGEA) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, que é uma adaptação da metodologia descrita por Singh *et al.* (1988).

As lâminas para o ensaio cometa foram lixadas de forma uniforme e lavadas com sabão neutro (Extran – 2%). Estas foram imersas em álcool etílico e secas em temperatura ambiente. Na sequência, foram imersas em solução de agarose padrão mantida em banho-maria à 70°C, retiradas e secas em temperatura ambiente por 24 horas. A retirada do material biológico do caranguejo-Uçá foi realizada em um ambiente desprovido de luz branca, com iluminação vermelha, por ser um processo fotossensível, evitando danos no DNA. Em uma seringa esterilizada contendo 200µL de

anticoagulante foram puncionados 400µL de hemolinfa, que foram misturados a 100µL de Agarose LM (low melting) (a última permaneceu em banho maria a 37°C durante o processo de preparação das lâminas).

Esta mistura foi colocada em uma lâmina que, posteriormente, foi recoberta com uma lamínula, e o conjunto permaneceu em geladeira (~4°C) por 10 minutos. Após a remoção das lamínulas, as lâminas com o material biológico foram mergulhadas em solução de Lise Uso por 01 dia, para a quebra das membranas celulares. Posteriormente, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo solução tampão e esperou-se 20 minutos para o “desempacotamento” da dupla hélice. Na sequência, esta cuba foi ligada à uma voltagem de 40 V e 300 mA, permanecendo mais 20 minutos, para a corrida dos fragmentos (formação da cauda do cometa).

Após este processo, as lâminas foram coradas com 40 µL do corante Gel Red diluído a 1:100 (1µL de Gel Red para 100 µL de água milli-Q). Cada lâmina foi coberta por uma lamínula pra que o corante se espalhasse sobre ela, e a análise foi realizada em microscópio de epifluorescência modelo Axio Imager M2 (Zeiss).

3 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA

A determinação da distribuição granulométrica dos sedimentos foi realizada pelo método de peneiramento e pipetagem (adaptada de SUGUIO, 1973). Uma alíquota de 8g de sedimento foi pesada e, sobre a mesma, foi adicionado peróxido de hidrogênio a 30% (V/V). Este material foi agitado periodicamente por 48h, para quebrar as ligações mais fortes da matéria orgânica com o sedimento. O sedimento foi transferido para o papel de filtro e lavado com água destilada em abundância, para a retirada da matéria orgânica e do peróxido excedente. O papel contendo o sedimento foi seco em estufa a 60°C. Depois de seca, a amostra foi pesada para registro da massa inicial, antes da separação. O peneiramento úmido foi utilizado para separação das frações de sedimento menores que 63 µm. Um agitador de peneiras foi utilizado para a determinação das frações de areia (> 63 µm); para a determinação dos finos (silte e argila) foi realizado o método de pipetagem.

4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA

O teor da matéria orgânica foi quantificado através do método gravimétrico (adaptado de DAVIES, 1974). Uma fração de 4g do sedimento foi pesada e calcinada em mufla à 450°C por 6 horas, para a queima total da matéria orgânica. Após

resfriamento, a amostra foi novamente pesada, e o teor de matéria orgânica foi calculado a partir das diferenças das massas.

5 ANÁLISE DE HPA EM SEDIMENTO

Uma alíquota de 4 gramas de sedimento de cada amostra foi pesada para a identificação e quantificação dos 16 HPAs prioritários em estudos ambientais (US-EPA, 1986). Sobre estas foram adicionados 100 μL de padrão interno (AccuStandard, Internal Standard Mix, 1000 ng mL^{-1}) contendo os seguintes HPAs deuterados: naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10 e criseno-d12. A extração foi realizada em aparato soxhlet (UNEP, 1992) durante 8h com 80 mL de uma mistura de n-hexano / diclorometano (1:1 v/v). Em cada balão também foram adicionados fragmentos de cobre (previamente ativados com ácido clorídrico a 2%) para a retirada do enxofre. Os extratos foram concentrados à 1 mL em um rotaevaporador a vácuo, com subsequente purificação e fracionamento em coluna de vidro contendo sílica e alumina desativadas a 5%. Os hidrocarbonetos alifáticos foram eluídos com 10 mL de n-hexano e, em seguida, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram eluídos com 15 mL de uma solução n-hexano/diclorometano (7:3 v/v). Os hidrocarbonetos alifáticos não foram analisados dentro do escopo deste estudo. O extrato contendo os HPAs foi concentrado em um rotaevaporador a vácuo e, quando necessário, foi utilizado um fluxo de nitrogênio para ajustar os extratos a 1 mL. O extrato final foi transferido para um vial de vidro e adicionado 100 μL de uma mistura contendo outros padrões internos, denominados padrões cromatográficos com os seguintes HPAs deuterados: fluoreno-d10, benzo[a]antraceno-d12 e benzo[a]pireno-d12 com 1000 ng mL^{-1} . Estes padrões são utilizados para o cálculo de recuperação dos padrões analíticos e também para detectar possíveis variações nos sinais analíticos do cromatógrafo durante uma corrida. Um volume de 1 μL do extrato foi injetado em um cromatógrafo a gás (Agilent technologies 7820A GC System) acoplado a um espectrômetro de massas (Agilent technologies 5975 series MSD), no modo SIM, onde há o monitoramento de íons previamente selecionados. A temperatura do injetor foi 300 °C e o extrato foi injetado no modo Splitless. A coluna capilar utilizada foi a HP-5MS (J&W Scientific) de sílica fundida, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, e espessura do filme 0,25 μm , com fase estacionária de Arileno polisiloxano. O Hélio (pureza de 5.0) foi usado como gás de arraste, em fluxo contínuo de 1,2 mL min^{-1} . A temperatura do forno foi programada para iniciar à 60 °C, seguida de um aquecimento de 15 °C min^{-1} até 150°C,

5°C min⁻¹ até 220°C, 10°C min⁻¹ até 300°C, permanecendo constante por 10 min, com um tempo total da corrida de 38 min. A temperatura da interface permaneceu em 300°C. Os espectros dos HPAs foram obtidos por ionização de elétrons, que passaram por um analisador do tipo quadrupolo. O software Enhanced Data Analysis, foi utilizado para identificação dos HPAs, através do tempo de retenção e dos valores m/z (massa/carga) dos 4 fragmentos de íons. A quantificação dos HPAs foi realizada através da integração dos picos, para obtenção das áreas dos mesmos. As áreas foram calculadas através do método de padronização interna, utilizando uma razão entre a resposta do analito de interesse e do padrão interno e concentrações dos mesmos.

5.1 CONTROLE DE QUALIDADE

Para o controle de qualidade, foram utilizados padrões internos, controle analítico, brancos e material de referência (SRM - IAEA-417, Agência Internacional de Energia Atômica) (LAUENSTEIN & CANTILLO, 1998). O controle analítico consistiu na adição de todos os padrões adicionados nas amostras em um vial, porém este não foi submetido ao processo de extração. Esta solução foi preparada com o propósito de avaliar possíveis perdas dos padrões durante o processamento das amostras. As recuperações dos padrões internos variaram entre 61,2% e 117,9%, sendo consideradas satisfatórias (LAUENSTEIN & CANTILLO, 1998). Os brancos foram realizados utilizando sulfato de sódio calcinado como matriz, sobre o qual foram adicionados padrões internos, com o intuito de avaliar possíveis contaminações durante alguma etapa do procedimento analítico. As concentrações dos compostos identificados nos brancos foram subtraídas das concentrações das amostras. O material de referência foi utilizado para uma maior confiabilidade na precisão e exatidão da análise. O coeficiente de variação dos analitos, que identifica a precisão dos resultados, foi $6.3 \pm 4.5\%$ com 81% dos analitos investigados dentro da faixa de concentração esperada. O limite de quantificação (LQ) foi considerado como sendo o menor ponto da curva analítica (1 ng mL⁻¹) dividido pela massa da amostra (4 g), que resultou num LQ de 0,25 ng g⁻¹, para as amostras do estuário do Rio Potengi. Para o ponto controle (JIES) o LQ foi de 0,06 ng g⁻¹. Os compostos não detectados foram reportados como ND.

6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A distribuição normal dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. ANOVA foi realizada avaliar diferenças entre as estações, o teste a posteriori de tukey foi usado para investigar diferenças entre cada dado, e também foi realizada a correlação de Pearson. Estes testes foram usados para os dados de granulometria, matéria orgânica, HPAs totais, micronúcleo e ensaio cometa. O teste de Dunnet foi aplicado para HPAs e micronúcleo para comparação com os dados da estação controle. As análises foram realizadas no programa Biostat 5.0. A análise de componentes principais foi realizada para identificar associações entre os dados, realizada no programa STATISTICA 6.0.