

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS
MESTRADO EM ECOLOGIA

LAÍS HENRIQUE CICERO

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA SÉRIE VERMELHA DO SANGUE DE
***Mugil curema* (Mugiliformes: Mugilidae) EM DISTINTAS CONDIÇÕES**
AMBIENTAIS

SANTOS/SP

2015

LAÍS HENRIQUE CICERO

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA SÉRIE VERMELHA DO SANGUE DE
Mugil curema (Mugiliformes: Mugilidae) EM DISTINTAS CONDIÇÕES
AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília, como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob orientação de Profa. Dra. Ursulla Pereira Souza

SANTOS/SP

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

CICERO, Laís Henrique.

Avaliação das alterações da série vermelha do sangue de *Mugil curema* (Mugiliformes: Mugilidae) em distintas condições ambientais/ Laís Henrique Cicero.

Ano de conclusão: 2015.

43 p.

Orientador: Profa. Dra. Ursulla Pereira Souza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos (ECOMAR), Santos, SP, 2015.

1. *Mugil curema*. 2. Estuário. 3. Parâmetros hematológicos
4. Biometria dos eritrócitos. 5. Biomarcador. I. SOUZA, Ursulla Pereira. II. Avaliação das alterações da série vermelha do sangue de *Mugil curema* (Mugiliformes: Mugilidae) em distintas condições ambientais.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

Dedico este trabalho a meus pais, Irene e Sérgio e minha irmã Isa, por me auxiliarem na realização de mais um sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida para a realização do mestrado, a UNISANTA, LABOMAC e LAPEBIO pela infraestrutura para que as pesquisas fossem realizadas.

Agradeço demais a minha orientadora e amiga Profa. Dr^a Ursulla Pereira Souza, por ter aceito embarcar nesse projeto e por ter tido a oportunidade de conhecer essa pessoa tão querida e com muito conhecimento sobre peixes. Muito obrigada por toda a ajuda, correções, puxões de orelha e conselhos sábios que levarem para minha vida profissional e pessoal. Obrigada por não desistir de mim. E obrigada mais ainda por ter acreditado em mim e aceitado ser minha linda e querida orientadora.

Muito obrigada ao meu co orientador de coração e amigo, Prof. MSc. Matheus Marcos Rotundo, por nunca ter desistido de mim e das minhas ideias para que tudo desse certo nessa dissertação. Obrigada do fundo do coração por toda ajuda, por todo seu conhecimento sobre peixes, e como sempre falo: “- Espero um dia ter metade do conhecimento que você tem sobre o mundo dos peixes”. Muito obrigada por todas as conversas, correções e por ter passado um pouco do seu vasto conhecimento no assunto.

Obrigada também ao Prof. Dr^o Walter Barrella, por me orientar no início do mestrado.

Obrigada a Prof^a. Dr^a Milena Ramires, pelo contato inicial com a comunidade de pescadores da Juréia.

Obrigada ao Prof. Dr^o Fabio Cop pelas ajudas nas análises de dados, que foram de extrema importância.

Agradeço ao Prof. Dr^o Camilo D. Seabra Pereira e Prof^a Dr^a Juliana P. Guimarães, pelas preciosas considerações na qualificação.

Agradeço demais aos pescadores que me ajudaram nas coletas dos meus peixes. Sr Camarão nas coletas de Santos e todos da comunidade da praia da Barra do Una na Juréia, Thiago, Djalma, Sr Vila, Sílvia, e todos os outros pescadores que calorosamente receberam a mim e a meu pai.

Gostaria de agradecer também ao Laboratório Central da Biologia, por todo material utilizado na pesquisa.

Obrigada ao Prof. Dr^o Camilo Seabra, ao MSc Fabio Hermes Pusceddu e a estagiária Beatriz Barbosa Moreno, pelas análises do oxigênio dissolvido, realizado no Laboratório de Ecotoxicologia da UNISANTA.

Obrigada a Profa. Dr^a Maria José Tavares Ranzani Paiva, mais conhecida como Masé, obrigada por ter tido a oportunidade de lhe conhecer, pelas dicas e pelas conversas sempre produtivas.

Agradeço imensamente e do fundo do meu coração a meus pais, Sérgio e Irene e à minha irmã Isa, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e sendo minha base e suporte de vida. Obrigada meus amores, por acreditarem em mim, e sempre embarcarem nos meus sonhos e me ajudarem para que eles se realizem. Pai, obrigada por ter ido comigo nas coletas da Juréia, pela paciência comigo reclamando dos mosquitos, borrachudos e insetos que tanto me incomodam quando estou em coletas de campo. Mãe obrigada por todas as broncas e cobranças, hoje vejo o quanto foram necessárias e me ajudando a ser perseverante e nunca desistir dos meus sonhos quando um obstáculo aparece. Sou muito grata pela família que tenho, amo muito vocês.

Obrigada à meu namorado, Daniel, por toda paciência de me ouvir falar tanto sobre a dissertação, me ajudando nas planilhas dos dados, me apoiando e incentivando, te amo muito.

Agradeço as secretárias do mestrado Sandra e Imaculada, minhas lindezas, por toda a atenção e o carinho com que tratam todos os alunos.

Muito obrigada ao pessoal do Acervo Zoológico da UNISANTA, Gustavo, Duda e Ricardo, pela ajuda com os peixes. E as estagiárias da minha querida orientadora pela ajuda nas análises.

Gostaria de agradecer também uma pessoa muito especial que me introduziu no mundo dos peixes, Dr^a Cristiane Rodrigues Pinheiro Neiva, do Instituto de Pesca de Santos, obrigada por todo ensinamento, paciência e conversas que levo pra vida. Amei ter tido a oportunidade de te conhecer e conviver diariamente com você. Obrigada por tudo, amo muito você!!

Agradeço também a todos os professores do mestrado, em especial profs. Drs Roberto Pereira Borges e João Marcos Miragaia Schimiegelow, mais conhecidos como Borges e Miragaia, respectivamente, por me apoiarem e incentivarem na época da faculdade a não desistir desse sonho de ser bióloga.

Muito obrigada a todos os professores, funcionários da UNISANTA, onde estudo desde criança, o lugar onde considero minha casa.

"Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço." (Dave Weinbaum).

"Quando a vida te põe pra baixo sabe o que você tem que fazer?? Simplesmente continua a nadar... continue a nadar...continue a nadar." (Dori-Procurando Nemo, Walt Disney).

RESUMO

Os parâmetros hematológicos são úteis para a determinação de características sanguíneas dos peixes, pois propiciam importantes informações sobre a saúde e as condições físicas de uma população ou indivíduo, bem como podem atuar como biomarcadores para o monitoramento ambiental. O objetivo do trabalho foi verificar se existe diferença entre os parâmetros hematológicos de *Mugil curema* de um estuário mais poluído (Santos) e outro menos poluído (Barra do Una – Juréia) em diferentes estações do ano. Os 133 exemplares do parati *Mugil curema* foram coletados no verão e no inverno de 2015 nos estuários de Santos e da Juréia, anestesiados com solução de óleo de cravo e o sangue coletado através da incisão do pedúnculo caudal (Santos) e pelas brânquias (Juréia), e armazenado em tubos identificados contendo anticoagulante EDTA. Os peixes foram levados ao laboratório para análises posteriores. Foram realizados hematócrito (Ht), contagem de eritrócitos (Er), cálculo do volume corpuscular médio (VCM), extensões sanguíneas para verificar micronúcleos, formato dos eritrócitos e para biometria das áreas do citoplasma e do núcleo dos eritrócitos. Verificou-se diferença entre os locais, sendo que Santos apresentou maiores valores de Ht no verão e Er no inverno, enquanto o VCM foi mais elevado nos peixes da Juréia em ambas as estações do ano. Quanto às biometrias dos eritrócitos, a área do citoplasma foi, aparentemente, maior nos exemplares de Santos. O efeito da estação do ano não foi significativo para a biometria da área do núcleo, mas o núcleo dos eritrócitos foi em média maior nos peixes de Santos. Com isso, conclui-se que as análises dos parâmetros hematológicos podem ser agregadas a análises ambientais e toxicológicas para auxiliar no diagnóstico de alterações nos peixes de acordo com o ambiente em que ele vive.

Palavras-Chave: *Mugil curema*. estuário. parâmetros hematológicos. biometria dos eritrócitos. biomarcador.

ABSTRACT

Haematological parameters are useful for the determination of blood characteristics of fish, since they provide important information about the health and physical condition of a population or individual, and can act as biomarkers for environmental monitoring. The objective was to verify if there is difference between the hematological parameters of *Mugil curema* in a more polluted estuary (Santos) and a less polluted (Barra do Una - Juréia) in different seasons. The 133 copies of *Mugil curema* were collected in the summer and winter of 2015 in the estuaries of Santos and Juréia, anesthetized with clove oil solution and the blood collected through the incision caudal peduncle (Santos) and the gills (Juréia) and stored in labeled tubes containing EDTA anticoagulant. The fish were taken to the laboratory for further analysis. Hematocrit were performed (Ht), erythrocyte count (Er), calculating the mean corpuscular volume (MCV), blood smears to verify micronuclei in erythrocytes format and biometrics areas of the cytoplasm and nucleus of erythrocytes. It was found differences between sites, and Santos had higher hematocrit values in summer and in winter Er, while the VCM was higher in fish of Juréia in both seasons. As for the biometrics of erythrocytes, the area of the cytoplasm was apparently higher in specimens of Santos. The effect of the season was not significant for the biometrics of the core area, but the core of erythrocytes was on average higher in fish of Santos. Thus, it is concluded that the analysis of hematological parameters can be aggregated to environmental and toxicological analyzes to assist in the diagnosis of changes in fish according to the environment in which he lives.

Key Words: *Mugil curema*. estuary. hematological parameters. biometrics red blood cells. biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Mugil curema</i> (Mugiliformes: Mugilidae).....	19
Figura 2 - Áreas de estudo com os respectivos pontos de coletas de <i>Mugil curema</i> nos estuários de Santos (A) e da Juréia (B).....	19
Figura 3 - Estuário de Santos.....	20
Figura 4 - Estuário do rio Una do Prelado, Juréia.....	21
Figura 5 - Média e intervalo de confiança (95%) dos valores médios de Hematócrito (%) de <i>Mugil curema</i> amostrados no Verão e no Inverno em Santos e na Juréia.....	27
Figura 6 - Média e intervalo de confiança (95%) dos valores do número de Eritrócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) de <i>Mugil curema</i> amostrados no Verão e no Inverno em Santos e na Juréia.....	28
Figura 7 - Média e intervalo de confiança (95%) dos valores de volume corpuscular médio (VCM) (fL) de <i>Mugil curema</i> amostrados no Verão e no Inverno em Santos e na Juréia.....	29
Figura 8 - Média e intervalo de confiança (95%) dos valores da Área do citoplasma (μm^2) de <i>Mugil curema</i> amostrados no Verão e no Inverno em Santos e na Juréia.....	30
Figura 9 - Média e intervalo de confiança (95%) dos valores da Área do núcleo (μm^2) de <i>Mugil curema</i> amostrados no Verão e no Inverno em Santos e na Juréia.....	31
Figura 10 – Extensão sanguínea dos peixes do estuário de Santos (a) e da Juréia (b).....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Profundidade (m), Salinidade, Temperatura (°C) e Oxigênio Dissolvido (OD em mg/L) obtidos em Santos e na Juréia no Verão e Inverno de 2015.....	26
Tabela 2 - Média e desvio padrão do Comprimento padrão (CP, mm), Peso total em (P, g), hematócrito (Ht, %), contagem dos eritrócitos (Er em $\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), volume corpuscular médio (VCM em fL), área do citoplasma (Área cit em μm^2) e área do núcleo (Área nuc em μm^2) dos exemplares de <i>Mugil curema</i> amostrados no Verão e no Inverno, nos estuários de Santos e da Juréia.....	26
Tabela 3 - Resultado da Análise de variância para os dados de hematócrito de <i>Mugil curema</i> entre os locais (Santos e Juréia) e as estações do ano (Verão e Inverno). Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM), F e p.....	27
Tabela 4 - Resultado da Análise de variância para os dados do número de eritrócitos de <i>Mugil curema</i> entre os locais (Santos e Juréia) e as estações do ano (Verão e Inverno). Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM), F e p.....	28
Tabela 5 - Resultado da Análise de variância para os dados de volume corpuscular médio de <i>Mugil curema</i> entre os locais (Santos e Juréia) e as estações do ano (Verão e Inverno). Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM), F e p.....	29
Tabela 6 - Resultado da Análise de variância para os dados da área do citoplasma de <i>Mugil curema</i> entre os locais (Santos e Juréia) e as estações do ano (Verão e Inverno). Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM), F e p.....	30
Tabela 7 - Resultado da Análise de variância para os dados da área do núcleo de <i>Mugil curema</i> entre os locais (Santos e Juréia) e as estações do ano (Verão e Inverno). Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM), F e p.....	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 ÁREAS DE ESTUDO	19
3.2 COLETA DOS ANIMAIS E AMOSTRA BIOLÓGICA	21
3.3 VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA	22
3.4 ANÁLISES LABORATORIAIS	23
3.4.1 DADOS MORFOLÓGICOS	23
3.4.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS	23
3.4.2.1 ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS	23
3.4.2.2 HEMATÓCRITO	23
3.4.2.3 CONTAGEM DE ERITRÓCITOS	23
3.4.2.4 VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO	24
3.4.2.5 BIOMETRIA DOS ERITRÓCITOS	24
3.5 ANÁLISES DE DADOS	24
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

O sistema circulatório sanguíneo é constituído de vasos sanguíneos (artérias, veias e capilares) e pelo coração, órgão responsável por bombear o sangue. Nos peixes a circulação é um sistema simples que consiste em um circuito no qual o sangue sai do coração pela aorta ventral, segue às brânquias de onde, pelas artérias carótidas, é levado para a cabeça e pela aorta dorsal para o resto do corpo, retornando ao coração pelo seio venoso e assim sucessivamente (SCHMIDT-NIELSEN, 2002; ZAVALA-CAMIN, 2004; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

O sangue origina-se principalmente no timo, fígado, rim, baço e intestino, sendo responsável por levar aos tecidos os nutrientes e gases que são importantes para as atividades metabólicas e hormônios, além de retirar o frívolo que não é útil (SATAKE *et al.*, 2009). É um tecido constituído pelo plasma, líquido que conduz células responsáveis por diferentes funções. O plasma conduz três células distintas quanto a suas funções: os leucócitos, os trombócitos e os eritrócitos. Os leucócitos são as células de defesa e podem ser utilizados para avaliar o sistema imunológico. Os trombócitos estão relacionados com a coagulação sanguínea, com a defesa orgânica e possuem função fagocitária. Os eritrócitos são as células em maior quantidade na circulação sanguínea, são nucleados, transportam oxigênio e gás carbônico e, quando não são mais funcionais, são retirados da circulação sanguínea pelo baço (ZAVALA-CAMIN, 2004; SATAKE *et al.*, 2009; DRUMOND *et al.*, 2010).

Os parâmetros hematológicos são úteis para a determinação de características sanguíneas dos peixes, pois propiciam importantes informações sobre a saúde e as condições físicas de uma população ou indivíduo, bem como podem atuar como biomarcadores para o monitoramento ambiental (AZEVEDO *et al.*, 2006; FRANÇA *et al.*, 2007; SERIANI *et al.*, 2013). Os valores correspondentes ao estado saudável dos peixes podem demonstrar notáveis informações para o prognóstico e diagnóstico de condições mórbidas de uma população ou indivíduo, auxiliando assim, a identificação de enfermidades ou estresse (ISHIKAWA *et al.*, 2008; DRUMOND *et al.*, 2010).

Peixes expostos a pesticidas, elementos traços e efluentes contaminados apresentam alterações hematológicas tanto em campo quanto em laboratório (SERIANI *et al.*, 2013). Avaliações dos parâmetros hematológicos em diferentes condições ambientais e de influências antrópicas foram realizadas por Saad *et al.* (1973) com *Tilapia zilli*, Şahan *et al.* (2007), para *Anguilla anguilla*, Ranzani-Paiva *et al.* (1997) para *Mugil platanus*, Jerônimo *et al.* (2009) para *Pimelodus maculatus*, Seriani *et al.* (2010) para *Micropogonias furnieri* e Seriani *et al.* (2013) para *Centropomus parallelus*.

Além dos parâmetros hematológicos, outros métodos estão sendo utilizados para avaliar a qualidade ambiental, como os biomarcadores que indicam em termos celulares ou bioquímicos a presença de contaminantes ou a resposta do organismo a partir da medição de seus fluidos corporais, teciduais ou celulares. Modificações na integridade do DNA são as primeiras observações nos organismos ao serem expostos a produtos químicos genotóxicos (SANTOS, 2009).

Os danos genotóxicos podem ser detectados pelo teste do micronúcleo. Os micronúcleos são massas de cromatina oriundas de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros (RIVEIRO, 2007). É o teste *in vivo* mais usado para detectar agentes clastogênicos (quebram cromossomos) e aneugênicos (induzem a segregação cromossômica anormal ou aneuploidia) (RIBEIRO *et al.*, 2003). Os micronúcleos podem ser observados nas células descendentes em decorrência de danos que ocorreram nas células parentais. São formados a partir da condensação dos cromossomos acêntricos (os fragmentos de cromossomos) e/ou de cromossomos inteiros que acabam não migrando para os polos dos fusos mitóticos na mitose. Os micronúcleos são formados na telófase com o envolvimento do material genético por uma membrana nuclear (PORTO, 2009; MARTINS *et al.*, 2010).

O teste do micronúcleo também tem sido utilizado em peixes como um indicador de poluição, para avaliar a contaminação e os efeitos causados pelos poluentes nos ecossistemas aquáticos, sendo considerados assim organismos viáveis ao monitoramento ambiental (OOST *et al.*, 2003; PORTO, 2009; KIRSCHBAUM *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010).

O ambiente influencia o perfil sanguíneo do peixe e vem sendo usado para monitorar as respostas a uma situação de estresse. O estresse causado por hipóxia, por exemplo, diminui a taxa de desenvolvimento e crescimento, causa mudanças morfológicas, alterações no comportamento e ampla variedade de ajustes fisiológicos e metabólicos em diversas etapas do ciclo de vida do peixe (MELO, 2008).

Quando há alterações nos parâmetros sanguíneos, como contagem de eritrócitos e hematócrito, resultando em diminuição nos valores, estes podem ser usados como indicativos de anemia, o que pode levar ao agravamento do estado de saúde do peixe (MELO, 2008). Segundo Lopes (2007), anemias hemorrágicas e perdas sanguíneas podem ser agudas devido a traumas, hipovitaminose K, desordens da coagulação, e crônicas devido a ação parasitária, trombocitopenias e lesões gastrointestinais. Destruição dos eritrócitos de maneira acelerada pode ser ocasionada por parasitos sanguíneos, bactérias, vírus, doenças metabólicas e intoxicação. O volume corpuscular médio está relacionado com o fluxo sanguíneo e a dinâmica cardíaca (SILVA *et al.*, 2012).

Segundo Silva *et al.* (2012) oscilações dos valores dos parâmetros hematológicos em peixes são influenciados pelo oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura, pH, estresse, ciclo sazonal e fatores endógenos (sexo e estágio de maturação gonadal), doenças e estado nutricional.

Além das alterações relacionadas às variáveis abióticas e à qualidade da água, podem ocorrer mudanças nos parâmetros. Em *Oxydoras niger*, uma espécie de bagre Doradidae consumida por populações na Amazônia brasileira, houve aumento no volume corpuscular médio, porém queda na quantidade de eritrócitos e hematócrito em peixes parasitados, o que pode levar a anemia, devido a hemorragia, causada pela influência do parasito (SANTOS & TAVARES-DIAS, 2010).

O parati *Mugil curema* Valenciennes, 1836, pertence à ordem Mugiliformes, família Mugilidae, sendo a espécie mais comum da família no litoral brasileiro. Realiza migrações entre estuários, lagoas costeiras e o mar em águas subtropicais e tropicais de todo o mundo. No continente americano ocorre desde Cape Code (EUA) até o sul do Brasil (Oceano Atlântico), e do Golfo da Califórnia até o norte do Chile (Oceano Pacífico). Os adultos habitam preferencialmente

regiões estuarinas com fundo lodoso e se alimentam de detritos orgânicos e pequenos materiais particulados. Os juvenis são encontrados em praias arenosas, próximo a desembocadura de rios, onde se alimentam de plâncton (MENEZES & FIGUEIREDO, 1985; FERREIRA, 1989; THOMPSON, 1997; FRANCO, 1999; FERNANDEZ, 2011).

Mugil curema apresenta como características o corpo prateado, com a parte superior mais escura, nadadeiras amareladas, sendo a segunda dorsal enegrecida em sua extremidade, a caudal e as peitorais com pigmentação escura esparsa, além de uma mancha escura em sua base. Alcançam no máximo 45 cm de comprimento total, porém o mais comum nas capturas são indivíduos em torno de 30 cm de comprimento total (MENEZES & FIGUEIREDO, 1985; MENEZES *et al.*, 2015).

Os estuários estão associados a elevado potencial econômico devido a complexos industriais, crescimento de cidades e a instalações de portos que encontram nessa região uma interface com o continente. A poluição faz parte da realidade atual devido à modernização e ao crescimento dessas regiões, contribuindo assim para a liberação de uma grande quantidade de poluentes para os corpos de água (SANTOS, 2009). Os índices hematológicos vêm sendo utilizados para avaliação da qualidade ambiental, especialmente das espécies que vivem em ambientes estuarino e marinho, a fim de compreender como respondem aos contaminantes antrópicos e alterações das condições de qualidade ambiental. Assim, no presente estudo buscou-se responder às perguntas: Os parâmetros hematológicos sofrem alterações de acordo com a poluição em diferentes ambientes? Quanto a sazonalidade pode influenciar estes parâmetros? Micronúcleo e anomalias celulares estão presentes em peixes de ambientes poluídos e não poluídos?

2. OBJETIVO

Verificar se existem diferenças nos parâmetros hematológicos, presença de micronúcleo e anomalias celulares de *Mugil curema* entre um estuário mais poluído (Santos) e outro menos poluído (Barra do Una – Juréia) no verão e inverno de 2015.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo

Os exemplares de *Mugil curema* (Figura 1) foram amostrados nos estuários de Santos – SP (Santos) e da Unidade de Conservação do Mosaico Juréia – Itatins – SP – Reserva de Desenvolvimento Sustentável (RDS) - Barra do Una, o que denominaremos como Juréia ao longo do trabalho (Figura 2).



Figura 1: *Mugil curema* (Mugiliformes: Mugilidae).

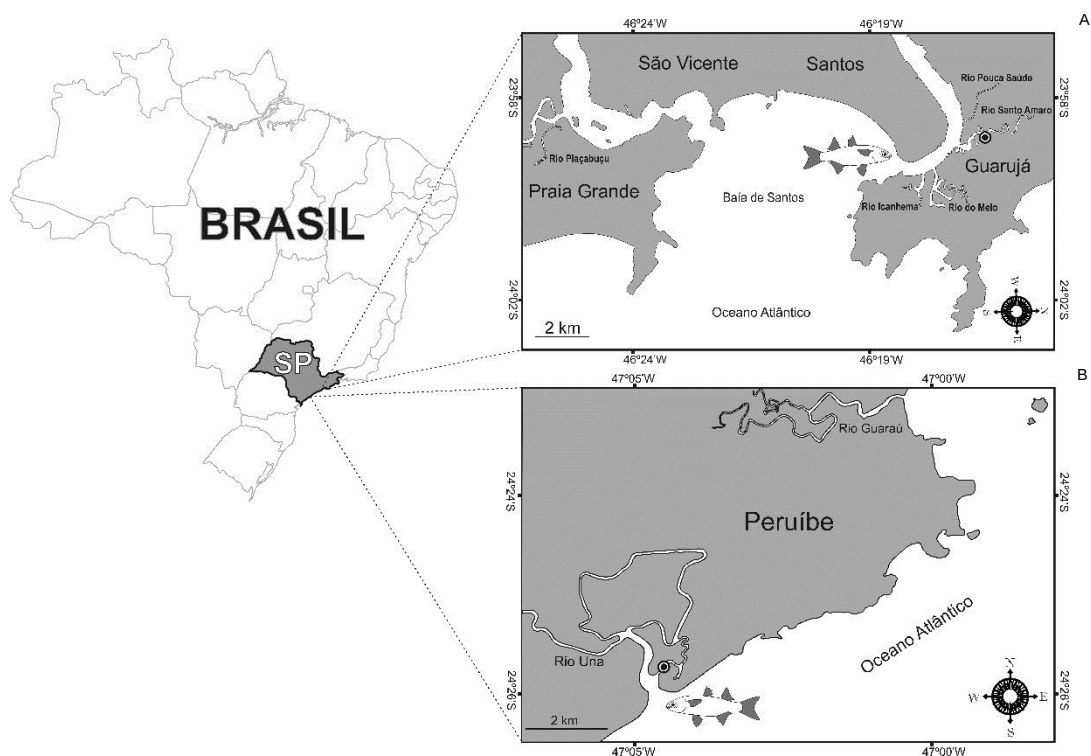


Figura 2: Áreas de estudo com os respectivos pontos de coletas de *Mugil curema* nos estuários de Santos (A) e da Juréia (B).

O estuário de Santos possui, aproximadamente, 15 km de extensão e a principal atividade desenvolvida nessa área é referente ao porto de Santos, que ocupa cerca de 7 milhões de m². O estuário recebe drenagem dos municípios de Santos, Cubatão e São Vicente, além do Canal de Bertioga (CETESB, 2014).

O porto de Santos, desde a década de 50, vem sofrendo com o lançamento de poluentes das indústrias metalúrgicas, de fertilizantes e petroquímicas localizadas na cidade de Cubatão. Esses poluentes sempre foram lançados na região sem um programa adequado do controle de emissão, o que levou ao processo de degradação ambiental intenso. Estudos demonstram a presença de alguns elementos traços e compostos orgânicos em concentrações elevadas no sedimento e nos organismos aquáticos (VIRGA *et al.*, 2007). O estuário de Santos apresenta os nutrientes fósforo, boro e parâmetros microbiológicos (coliformes termotolerantes e enterococos) em quantidades acima dos padrões de qualidade, alterações na qualidade da água e baixos níveis de oxigênio dissolvido. O sedimento é arenoso e testes ecotoxicológicos indicam péssima qualidade do mesmo nesta região, resultando na classificação deste estuário como "ruim e péssimo" (CETESB, 2014). Assim, para o presente estudo esta região será considerada poluída (Figura 3).



Figura 3: Estuário de Santos.

A Unidade de Conservação do Mosaico Juréia-Itatins – SP – Reserva de Desenvolvimento Sustentável (RDS), abrange parte dos municípios de Itariri, Iguape, Peruíbe e Miracatu, porém sua maior extensão está no município de Iguape (SOUZA & SOUZA, 2004). A Barra do Una localiza-se a 25 km de

Peruíbe (SP), está situada entre o Maciço do Panapuã e o rio Una do Prelado. Seu acesso dá-se pelas estradas do Guaraú (7 km de estrada asfaltada) e da Barra do Una (18 km de estrada de terra) (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, 2012). O estuário do rio Una do Prelado é constituído por sedimento predominantemente arenoso, seguido por silte e argila. As concentrações de nutrientes não são elevadas e os indicadores de poluição fecal são baixos. A densidade de *Clostridium perfringens*, bactéria que causa enterite necrótica e septicemia aliada à pequena quantidade de coliforme termotolerante, indica poluição fecal remota, e a análise ecotoxicológica indica ótima qualidade de sedimento (MURRAY *et al.*, 2014). Este estuário foi classificado como “bom” segundo o Relatório de Águas Superficiais de 2012 da CETESB e assim, será considerado como controle no presente estudo (Figura 4).



Figura 4: Estuário do rio Una do Prelado, Juréia.

3.2 Coleta dos animais e amostra biológica

A espécie *Mugil curema* foi selecionada para o presente estudo, pois há relativamente poucos trabalhos sobre sua biologia e ecologia, destacando-se a recente revisão taxonômica do gênero *Mugil* (MENEZES *et al.*, 2015). Adaptam-se muito bem às alterações de salinidade e temperatura, pois passam a maior parte de seu ciclo de vida nos estuários, percorrem toda a coluna d'água e possuem contato direto com o sedimento (alimentação). Além disso, têm importância econômica nos dois locais do estudo, sendo um dos recursos mais consumidos por populações caiçaras que moram nas proximidades de ambos os estuários (Santos e Juréia).

Os peixes foram amostrados em fevereiro (n=35) e junho (n=31) de 2015 no estuário de Santos (23K0369446 / 7346844 UTM), com rede de espera, malha de 7 cm entre nós opostos. No estuário da Barra do Una (23J0289908 / 7295649 UTM), as coletas foram realizadas em março (n=35) e junho (n=32) de 2015, utilizando-se tarrafa, malha de 5 cm entre nós opostos. Imediatamente após as capturas os exemplares de *M. curema* foram anestesiados com 1 a 1,5 mL de solução de óleo de cravo por litro de água (5 mL de óleo de cravo + 95 mL de álcool 96 – 99° GL) (DELBON, 2009; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013), de maneira a não sofrerem estresse. O sangue amostrado em Santos foi coletado através da segmentação do pedúnculo caudal e dos peixes da Juréia pelas brânquias. A diferença na forma de obtenção do sangue entre os lugares foi um procedimento adotado após uma coleta piloto realizada em 2014, na qual não foi possível amostrar o sangue dos exemplares da Juréia através da incisão do pedúnculo caudal. Retirando-se o sangue pelas brânquias, obteve-se a quantidade suficiente para as análises. Posteriormente, foi armazenado em tubos contendo EDTA, para impedir a agregação dos trombócitos, com a identificação de cada exemplar. Os peixes foram colocados em sacos com a mesma identificação dos tubos, armazenados em caixas térmicas contendo gelo e transportados para o Laboratório de Pesquisas Biológicas (LAPEBio) da UNISANTA para análises posteriores.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UNISANTA, 01/2015). O material testemunho encontra-se depositado na Coleção Científica Regional de Peixes da Região da Costa da Mata Atlântica (Baixada Santista) do Acervo Zoológico da Universidade Santa Cecília (AZUSC), sob os registros 4569 e 4570, para Santos e Juréia, respectivamente.

3.3 Variáveis físicas e químicas da água

Nos mesmos locais de coletas foram tomadas medidas de temperatura (°C), com um termômetro e de salinidade, com um refratômetro óptico. A profundidade foi mensurada com um ecobatímetro e para o oxigênio dissolvido foi coletada água em frasco âmbar e mensurado em uma sonda multiparâmetro no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília.

3.4 Análises laboratoriais

3.4.1. Dados Morfológicos

Os peixes foram mensurados quanto ao comprimento padrão (CP) utilizando um ictiômetro com precisão em milímetros (mm), pesados (g) em balança analítica com precisão de 0,01 g, eviscerados e determinado o sexo.

3.4.2. Análises hematológicas

3.4.2.1 Extensões Sanguíneas

Foram feitas extensões sanguíneas para a contagem dos eritrócitos, para verificar micronúcleos, anomalias celulares e para a biometria dos eritrócitos. Em seguida a extensão foi corada utilizando um kit rápido de corante da marca Renylab®.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico em aumento de 1000x utilizando óleo de imersão, para as análises hematológicas, e contadas 2000 células para verificar a presença de micronúcleo e anomalias celulares (SATAKE *et al.*, 2009; PORTO, 2009; MARTINS *et al.*, 2010).

3.4.2.2 Hematócrito

Os eritrócitos foram analisados pelo método de microhematócrito, que verifica a proporção de eritrócitos no sangue em relação à quantidade de plasma, trombócitos e leucócitos (GOLDENFARB *et al.*, 1971; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Portanto, utilizou-se um microcapilar heparinizado preenchido em 2/3 de seu volume total, vedado em uma das extremidades com massa de modelar atóxica e centrifugado em microcentrífuga por 5 minutos em rotação de 12.000 rpm para a leitura em escala própria de microhematócrito. Para este procedimento foram utilizados três tubos de microcapilar por indivíduo.

3.4.2.3 Contagem de eritrócitos

A contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer foi realizada pelo método proposto por Ranzani-Paiva *et al.* (2013). O sangue nos tubos de EDTA foi homogeneizado e diluído em solução fisiológica a 0,65% em uma proporção de 1:200. Após essa diluição o sangue e o hemodiluyente foram homogeneizados

imediatamente e o procedimento realizado em duplicata em tubos de ensaios diferentes.

Uma lamínula foi fixada nas plataformas da câmara de Neubauer e os dois retículos preenchidos com a diluição em cada ponta, sempre do mesmo indivíduo. Após a sedimentação dos eritrócitos, foi realizada a leitura em microscópio óptico em aumento de 400x e a contagem realizada no quadrado central da câmara considerando sempre os cinco quadrados pequenos do retículo. Calculou-se a média de células μL^{-1} de sangue e o número de eritrócitos (Nº de células contadas) foi multiplicado por 10^4 em mm^{-3} .

3.4.2.4 Volume corpuscular médio (VCM)

Para avaliar o volume dos eritrócitos foi estimado o índice hematimétrico, através do cálculo do Volume Corpuscular Médio (VCM) (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013), dado por:

$$\text{VCM: } \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Número de Eritrócitos} (\times 10^6 \mu\text{L}^{-1})} = \text{fL}$$

3.4.2.5 Biometria dos eritrócitos

Foram realizados fotoregistros dos esfregaços sanguíneos para a biometria da área do citoplasma e do núcleo dos eritrócitos em microscópio óptico com aumento de 1000x, através do *software* Image Tool (WILCOX *et al.*, 2002). Foi tirada uma foto por lâmina e mediu-se 10 células por foto, sendo duas lâminas da extensão para cada indivíduo. Com isso, foram medidas 20 células por indivíduo.

3.5 Análise de Dados

As variações no número de hematócrito, contagem de eritrócitos, no valor de volume corpuscular médio e nas medidas referentes às áreas do citoplasma e do núcleo, entre os dois estuários e as estações do ano (verão e inverno) foram verificadas por modelos de Análise de Variância (ANOVA) *two-way*. Foram avaliados os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias e os dados de contagem de eritrócitos e volume corpuscular médio foram

transformados utilizando raiz quadrada, para atender estes pressupostos (ZAR, 2010). As análises foram realizadas no software Statistica.

4. RESULTADOS

Os valores mensurados para as variáveis abióticas no verão e no inverno são apresentados na Tabela 1. Observou-se que o Oxigênio Dissolvido foi mais elevado na Juréia nas duas estações do ano de 2015.

Tabela 1: Profundidade (m), Salinidade, Temperatura (°C) e Oxigênio Dissolvido (OD em mgL⁻¹) obtidos em Santos e na Juréia no verão e inverno de 2015.

Local	Santos		Juréia	
Estação do ano	Verão	Inverno	Verão	Inverno
Profundidade	1,5	1,3	0,5	2
Salinidade	18,2	25	18	15
Temperatura	28,8	22	28	20
Oxigênio	1,6	1,4	5,0	7,1

Dentre os 133 peixes analisados foram coletados 14 fêmeas e 49 machos em Santos e 16 fêmeas e 50 machos na Juréia. Para quatro exemplares não foi possível determinar o sexo, três em Santos e um na Juréia, ambos no inverno. Os valores médios de comprimento, peso e dos parâmetros hematológicos obtidos em Santos e na Juréia são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Média e desvio padrão do Comprimento padrão (CP, mm), Peso total em (P, g), hematócrito (Ht, %), contagem dos eritrócitos (Er em $\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), volume corpuscular médio (VCM em fL), área do citoplasma (Área cit em μm^2) e área do núcleo (Área nuc em μm^2) dos exemplares de *Mugil curema* amostrados no Verão e no Inverno, nos estuários de Santos e da Juréia.

Local	Santos		Juréia	
Estação do ano	Verão (n= 35)	Inverno (n=31)	Verão (n=35)	Inverno (n=32)
CP	201,2 $\pm$ 14,54	193,06 $\pm$ 14,21	195,51 $\pm$ 14,40	181,38 $\pm$ 10,66
P	185,39 $\pm$ 42,92	166,86 $\pm$ 24,99	175,89 $\pm$ 40,17	148,01 $\pm$ 21,26
Ht	19,65 $\pm$ 3,20	15,87 $\pm$ 2,33	13,77 $\pm$ 2,66	14,55 $\pm$ 1,95
Er	751,9 $\pm$ 223,86	962,45 $\pm$ 274,65	225,8 $\pm$ 105,24	258,25 $\pm$ 82,71
VCM	48,47 $\pm$ 47,27	18,59 $\pm$ 7,88	59,86 $\pm$ 18,91	61,17 $\pm$ 19,33
Área cit	39,93 $\pm$ 3,39	40,22 $\pm$ 4,99	39,84 $\pm$ 4,56	32,97 $\pm$ 4,45
Área nuc	5,92 $\pm$ 0,51	5,66 $\pm$ 0,58	5,20 $\pm$ 0,97	5,29 $\pm$ 0,80

Foi detectada interação significativa entre local e estação do ano para as contagens de Hematócrito (Tabela 3). Aparentemente, as contagens foram mais elevadas em Santos, porém a magnitude da diferença entre Santos e Juréia foi maior no verão (Figura 5). Adicionalmente, o efeito da estação do ano foi maior para Santos, enquanto na Juréia, o número médio de Hematócrito se manteve relativamente constante entre verão e inverno.

Tabela 3: Resultado da Análise de variância para os dados de hematócrito de *Mugil curema* entre os locais (Santos e Juréia) e as estações do ano (Verão e Inverno). Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM), F e p.

Fontes de Variações	SQ	gl	QM	F	p
Local	430,22	1	430,22	62,209	<0,001
Estação	74,87	1	74,87	10,826	0,001
Local * Estação	172,86	1	172,86	24,996	<0,001
Resíduo	892,12	129	6,92		

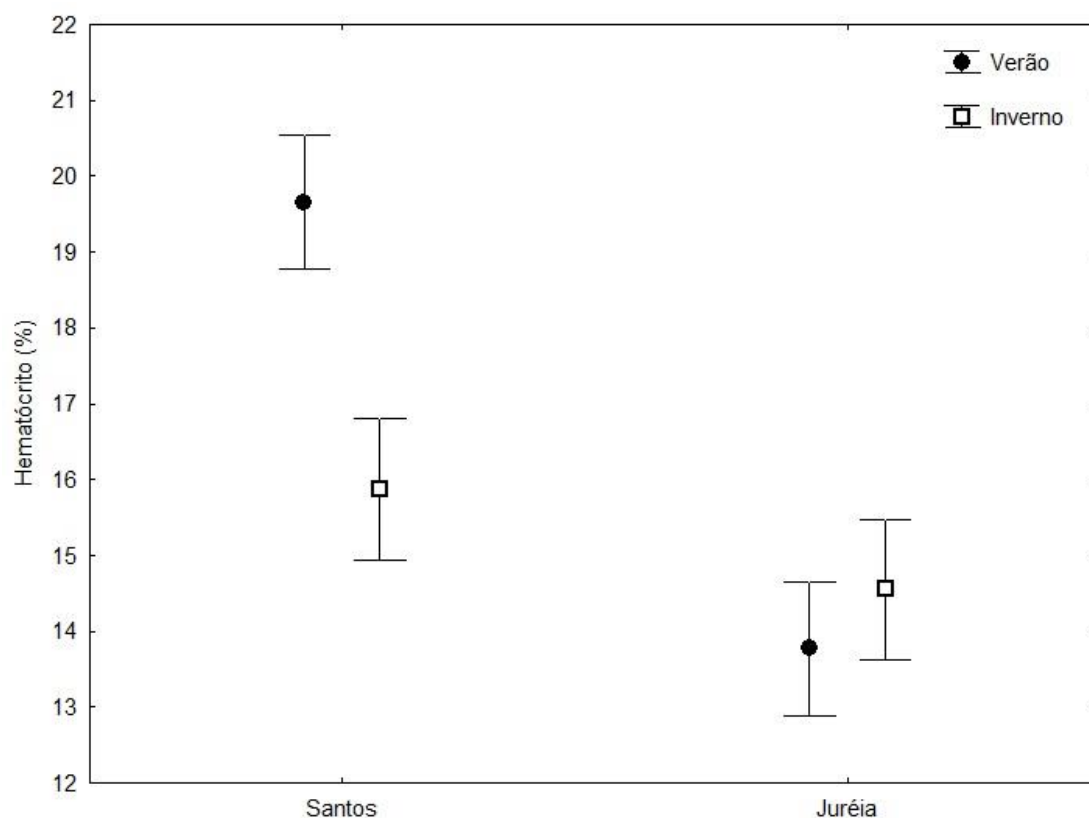


Figura 5: Média e intervalo de confiança (95%) dos valores médios de Hematócrito (%) de *Mugil curema* amostrados no Verão e no Inverno em Santos e na Juréia.

Da mesma forma, houve interação significativa entre local e estação para a contagem de eritrócitos (Tabela 4). Os valores foram diferentes entre os locais, sendo mais elevadas em Santos, principalmente no inverno. Na Juréia as contagens nas duas estações foram muito próximas (Figura 6).

Tabela 4: Resultado da Análise de variância para os dados de número de eritrócitos de *Mugil curema* entre os locais (Santos e Juréia) e as estações do ano (Verão e Inverno). Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM), F e p.

Fontes de Variações	SQ	gl	QM	F	p
Local	5714,80	1	5714,80	447,845	<0,001
Estação	114,09	1	114,09	8,941	0,003
Local * Estação	95,61	1	95,61	7,492	0,007
Resíduo	1646,13	129	12,76		

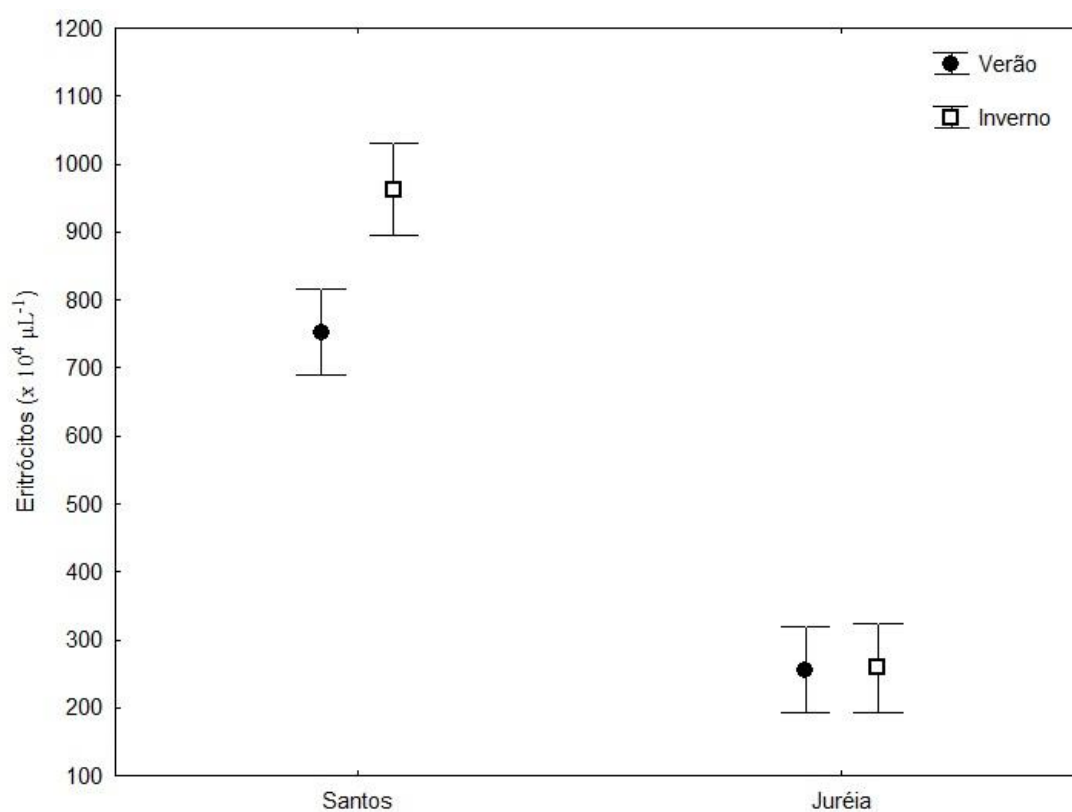


Figura 6: Média e intervalo de confiança (95%) dos valores de número de Eritrócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) de *Mugil curema* amostrados no Verão e no Inverno em Santos e na Juréia.

A interação entre local e estação foi significativa para o volume corpuscular médio (Tabela 5). Os valores foram mais elevados na Juréia nas duas estações, mas em Santos o VCM também foi elevado no verão (Figura 7).

Tabela 5: Resultado da Análise de variância para os dados de volume corpuscular médio de *Mugil curema* entre os locais (Santos e Juréia) e as estações do ano (Verão e Inverno). Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM), F e p.

Fontes de Variações	SQ	gl	QM	F	p
Local	180,083	1	180,083	65,171	<0,001
Éstação	37,567	1	37,567	13,596	<0,001
Local * Éstação	44,880	1	44,880	16,242	<0,001
Resíduo	356,456	129	2,763		

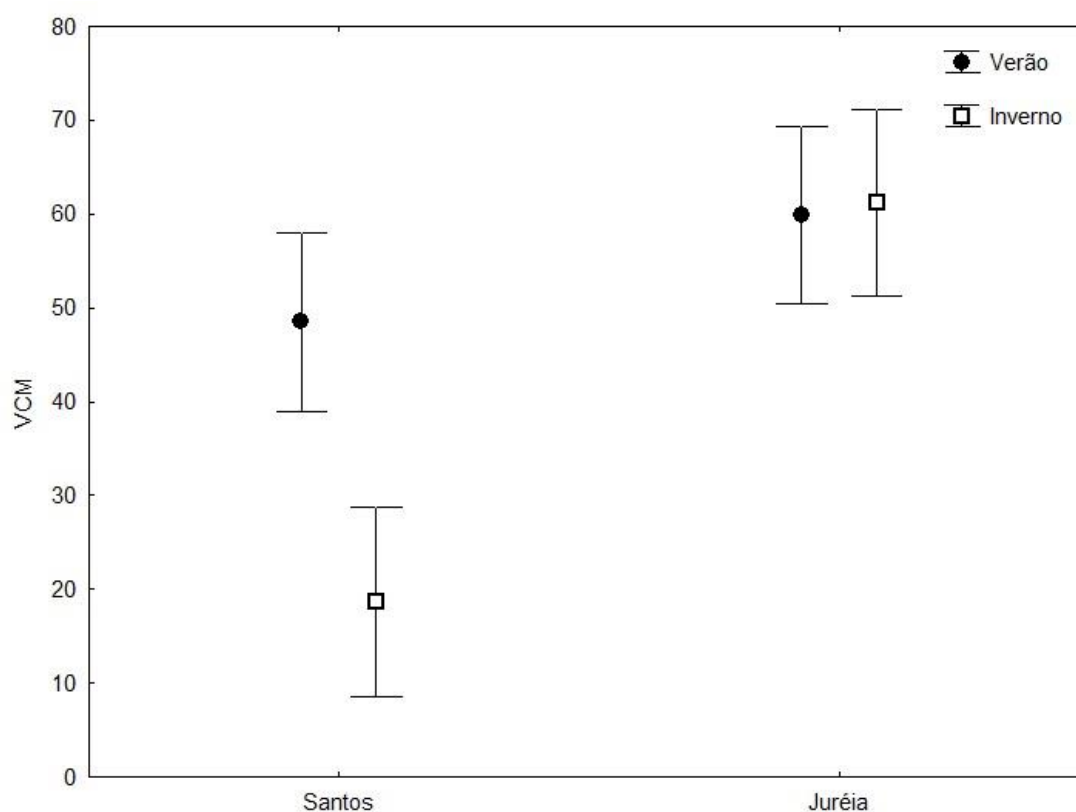


Figura 7: Média e intervalo de confiança (95%) dos valores de volume corpuscular médio (VCM) (fL) de *Mugil curema* amostrados no Verão e no Inverno em Santos e na Juréia.

Os resultados da ANOVA para a área do citoplasma evidenciaram interação significativa entre estação e local (Tabela 6). As contagens foram aparentemente mais elevadas em Santos no verão e no inverno (Figura 8). Na Juréia o efeito da sazonalidade foi maior no verão (Figura 8).

Tabela 6: Resultado da Análise de variância para os dados da área do citoplasma de *Mugil curema* entre os locais (Santos e Juréia) e as estações do ano (Verão e Inverno). Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM), F e p.

Fontes de Variações	SQ	gl	QM	F	p
Local	447,1	1	447,1	23,09	<0,001
Estação	359,7	1	359,7	18,58	<0,001
Local * Estação	425,8	1	425,8	21,99	<0,001
Resíduo	2497,2	129	19,4		

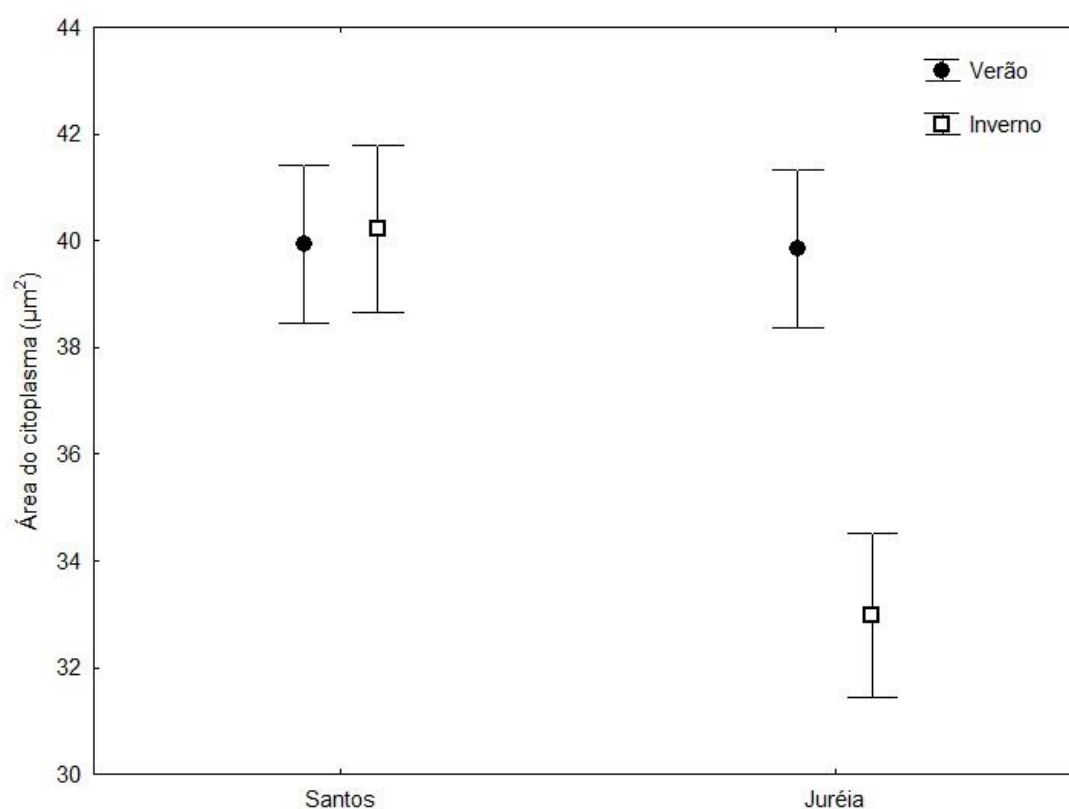


Figura 8: Média e intervalo de confiança (95%) dos valores da Área do citoplasma (µm²) de *Mugil curema* amostrados no Verão e no Inverno em Santos e na Juréia.

Não houve interação entre estação do ano e local para a área do núcleo ($F = 1,77$, $p = 0,184$). O efeito sazonal não foi significativo ($F = 0,39$, $p = 0,529$), porém o núcleo foi em média maior nos peixes de Santos ($F = 17,73$, $p < 0,001$) (Tabela 7, Figura 9).

Tabela 7: Resultado da Análise de variância para os dados da área do núcleo de *Mugil curema* entre os locais (Santos e Juréia) e as estações do ano (Verão e Inverno). Soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (gl), quadrado médio (QM), F e p.

Fontes de Variações	SQ	gl	QM	F	p
Local	10,014	1	10,014	17,730	<0,001
Estação	0,225	1	0,225	0,398	0,529
Local * Estação	1,004	1	1,004	1,778	0,184
Resíduo	72,863	129	0,565		

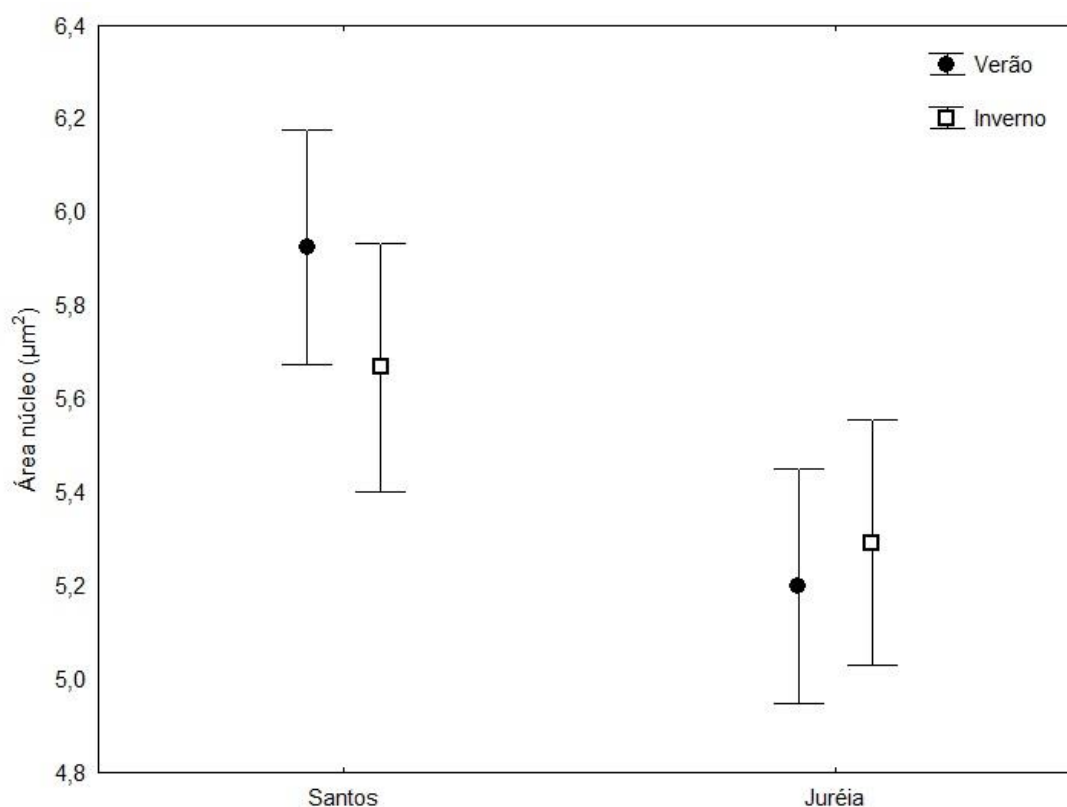


Figura 9: Média e intervalo de confiança (95%) dos valores da Área do núcleo (μm^2) de *Mugil curema* amostrados no Verão e no Inverno em Santos e na Juréia.

Foram contadas 2000 células em cada extensão sanguínea e não foram detectadas anomalias celulares e presença de micronúcleo. Os eritrócitos

apresentavam forma elipsoide, com núcleo central e citoplasma eosinofílico claro e homogêneo (Figura 10 a e b).

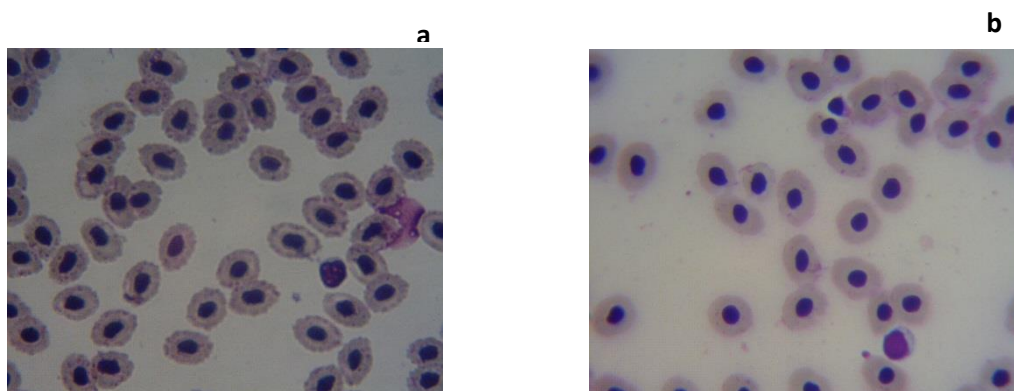


Figura 10b: Extensão sanguínea dos peixes dos estuários de Santos(a) e da Juréia (b).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram observadas diferenças nos resultados quanto à sazonalidade e os locais. O estuário de Santos foi considerado como ambiente poluído, pois sofre com os impactos provenientes dos contaminantes das indústrias de Cubatão e da poluição causada pelo porto de Santos e dos esgotos domésticos (CETESB, 2012). No sedimento desse estuário há muitos elementos traços acumulados principalmente na área mais interna, como por exemplo, cobre, cromo, níquel, chumbo, zinco, entre outros, todos oriundos das indústrias de Cubatão, além da presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (FLYNN *et al.*, 2011). O estuário da Juréia foi considerado como não poluído por estar inserido na Unidade de Conservação do Mosaico Juréia – Itatins – SP – Reserva de Desenvolvimento Sustentável (RDS). Em geral, peixes sujeitos a baixos níveis de oxigênio apresentam elevados valores de hematócrito e de contagem de eritrócitos, para melhorar a eficiência no transporte do oxigênio disponível na água (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Como esperado para diferentes estações do ano, a temperatura da água foi mais elevada no verão do que no inverno, em ambos os estuários. No estudo sobre os impactos da construção do porto de Suape sobre a comunidade fitoplanctônica no estuário do rio Ipojuca (Pernambuco), Koenig, *et al.* (2002), encontraram baixos valores de oxigênio dissolvido no período seco (0,32 mg/L a 5,53 mg/L) e valores mais elevados na época chuvosa (3,83 mg/L a 5,85 mg/L). As baixas concentrações de oxigênio dissolvido no estuário de Santos, podem estar relacionadas às alterações físicas e químicas no estuário (HORTELLANI *et al.*, 2008), geradas pelos impactos e contaminações. Na Juréia as concentrações de oxigênio dissolvido foram mais elevadas, provavelmente pelo estuário estar inserido em uma Unidade de Conservação e assim sujeito a menores influências de impactos e contaminações quando comparado ao estuário de Santos.

Os valores de hematócrito foram maiores nos peixes do estuário de Santos, principalmente no verão, e relativamente constantes entre os peixes analisados nas diferentes estações na Juréia. Resultados semelhantes foram encontrados por Seriani *et al.* (2013) para *Centropomus parallelus*, com valores

de hematócrito mais elevados nos peixes do estuário de São Vicente, considerado mais impactado do que o de Cananéia. Entre as épocas, da mesma forma que para *Mugil curema*, o hematócrito do robalo foi mais elevado no verão, provavelmente porque em menores temperaturas da água, os peixes tendem a diminuir seu metabolismo, reduzindo assim a produção de células sanguíneas, refletindo nos menores valores de hematócrito no inverno (SERIANI *et al.*, 2013). O hematócrito também pode mudar decorrente de outras causas, como o aumento da atividade eritropoiética do rim e do baço ocasionadas por estresse, sendo que a deficiência de nutrientes diminui a produção de trombócitos, leucócitos e eritrócitos (SILVA *et al.*, 2012). Tavares-Dias & Moraes (2004) ressaltam que as alterações nos valores de hematócrito devido ao estresse ocasionam hemodiluição, reduzindo assim o hematócrito ou hemoconcentração pela liberação de eritrócitos pelo baço, aumentando o hematócrito. Diversos trabalhos observaram que valores elevados deste parâmetro em peixes estão relacionados à exposição a contaminantes, como verificado em *Pimelodus maculatus* exposto a detritos contaminados por coliformes totais (JERONIMO *et al.*, 2009).

O número de eritrócitos foi diferente entre Santos e Juréia, sendo mais elevados nos peixes amostrados no inverno em Santos, corroborando os resultados encontrados por Abujamara *et al.* (2011) para *Micropogonias furnieri* no estuário de Santos, considerado mais impactado quando comparado ao estuário do rio Itanhaém, utilizado como controle. Da mesma forma, o número de eritrócitos de *Centropomus parallelus* foi mais alto nos peixes do verão e do inverno no estuário de São Vicente (SERIANI *et al.*, 2013). Peixes que sofrem com estresse tendem a apresentar maior número de eritrócitos, porém essas alterações podem estar relacionadas ao mecanismo de adaptação dos organismos, como observado no estudo do perfil hematológico de *Lutjanus analis* capturados em seu ambiente natural e depois criados em tanques-rede (DOTTA *et al.*, 2015).

Como o número de eritrócitos está diretamente ligado ao desempenho fisiológico do peixe, as alterações nesse parâmetro pode indicar doenças ou distúrbios de saúde. O aumento no número de eritrócitos é conhecido como eritrocitose e pode significar proliferação das células vermelhas por tecidos hematopoiéticos ou câncer, enquanto a diminuição do número caracteriza

anemia (SERIANI *et al.*, 2014). No trabalho foi observado número de eritrócitos mais elevado no estuário de Santos, o que relaciona, principalmente, aos efeitos da poluição neste ambiente.

Comparando a quantidade de eritrócitos entre machos e fêmeas de tilápia *Oreochromis niloticus*, Melo (2008) observou maiores valores em ambos os sexos do grupo com estresse por hipóxia, reforçando que o estresse e níveis muito baixos de oxigênio dissolvido na água podem provocar alterações sanguíneas em peixes. No presente estudo não foi possível comparar os parâmetros hematológicos entre os sexos e os estádios de maturação gonadal devido ao baixo número de fêmeas, sendo apenas dois exemplares com gônadas maduras, amostradas no verão em Santos.

O volume corpuscular médio está relacionado com o fluxo sanguíneo e nos exemplares de *M. curema* amostrados no estuário de Santos esse parâmetro foi mais baixo, principalmente no inverno. Na Juréia as células foram maiores, mas semelhantes entre as estações. O estresse sofrido pelo peixe pode levar à produção e ação de glicocorticóides no organismo, elevando os níveis de cortisol no sangue e, com isso, podem ocorrer modificações fisiometabólicas, observadas por meio do aumento do número de eritrócitos e da diminuição dos valores de volume corpuscular médio (SILVA *et al.*, 2012), como observado no presente estudo. Da mesma forma para *Tilapia zilli* amostrados em um rio poluído na Alexandria, houve diminuição no valor de VCM para os peixes que estavam em uma região do rio com maior descarga de poluentes e que sofriam de hipóxia, se comparados aos peixes amostrados em áreas com maior concentração de oxigênio. Assim, nos peixes do estuário de Santos, onde os valores de oxigênio foram muito menores do que os registrados na Juréia, as alterações hematológicas observadas podem estar relacionadas ao aumento da área de absorção celular e da velocidade no transporte dos gases.

Em relação à biometria dos eritrócitos, a área do citoplasma foi maior nos peixes de Santos nas duas estações e na Juréia no verão. As medidas da área do núcleo foram, significativamente, diferentes entre os locais, sendo maiores nos exemplares de *M. curema* amostrados em Santos. Em Santos, os valores de oxigênio foram muito baixos tanto no verão como no inverno e, na Juréia, registrou-se aumento de $5,0 \text{ mgL}^{-1}$ no verão para $7,1 \text{ mgL}^{-1}$ no inverno. Estes resultados parecem indicar que em locais com baixa concentração de oxigênio

são necessárias mais células com tamanhos menores, para que haja mais circulação dos gases na corrente sanguínea dos indivíduos, por haver maior superfície de contato.

Não foi observada presença de micronúcleo e anomalias celulares nas 2000 células de *Mugil curema* analisadas, contrariando o encontrado por Santos (2009) ao analisar o sangue de *M. curema* nos estuários de Piaçaguera (poluído) e Bertioga (não poluído). O autor encontrou micronúcleo nos eritrócitos dos peixes de Piaçaguera, local onde estão mais expostos a compostos mutagênicos em comparação com o canal de Bertioga.

Todos os parâmetros sanguíneos avaliados nesse estudo apresentaram-se diferentes entre os estuários de Santos (poluído) e da Juréia (controle), corroborando os resultados obtidos por Amado *et al.* (2006), Jerônimo *et al.* (2009), Seriani *et al.* (2010), Abujamara *et al.* (2011), Seriani *et al.* (2013), que observaram alterações entre ambientes considerados poluídos e preservados. Com isso, ressalta-se que os parâmetros hematológicos podem ser usados como biomarcadores para o diagnóstico de estresse animal e alterações ambientais causadas por poluição e/ou influências antrópicas. Estudos futuros que considerem as avaliações da séria branca, bem como comparações entre machos e fêmeas em diferentes estádios de maturação gonadal, poderão contribuir para pesquisas do uso dos parâmetros hematológicos como biomarcadores, visando gerar subsídios para estudos de conservação das espécies e dos ambientes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *Mugil curema* apresentou-se como um bom bioindicador na avaliação dos parâmetros sanguíneos, devido a sua ampla distribuição e abundância nos estuários tropicais. Os estuários estudados possuem características diferentes quanto aos impactos ambientais, sendo o de Santos considerado poluído, devido aos efluentes das indústrias de Cubatão, Porto e outras atividades antrópicas, enquanto o da Juréia foi considerado como controle e está inserido em uma Unidade de Conservação, Reserva de Desenvolvimento Sustentável da Barra do Una.

Os valores de hematócrito se apresentaram mais elevados nos peixes de Santos e no verão, enquanto os valores do número de eritrócitos foram mais elevados nos peixes no inverno. Os exemplares da Juréia apresentaram valores mais baixos que os de Santos para esses parâmetros. O volume corpuscular médio foi mais elevado nos peixes da Juréia e nas duas estações do ano. Quanto às biometrias, a área do citoplasma foi aparentemente maior nos peixes de Santos para ambas as estações. Contudo, a área do núcleo foi significativamente maior em *M. curema* coletados em Santos, não diferindo sazonalmente.

Embora alguns estudos tenham encontrado micronúcleo em peixes amostrados em locais mais poluídos, não foram registrados nos estuários aqui estudados, bem como as células apresentaram-se com aspecto normal.

Com isso, conclui-se que as análises dos parâmetros hematológicas podem ser agregadas a análises ambientais e toxicológicas para auxiliar no diagnóstico de alterações nos peixes de acordo com o hábitat, além de gerar subsídios para estudos de conservação das espécies e dos ambientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUJAMARA, L.D.; SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M.J. et al. **Análise de parâmetros citogenotóxicos da corvina *Micropogonias furniei*, provenientes de dois estuários da Baixada Santista, SP.** Revista Ceciliana, v. 2, n. 2, p. 17-20, 2011.
- AMADO, L.L.; ROSA, C.E.; LEITE, A.M. et al. **Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects.** Marine Pollution Bulletin, v. 52, p. 199–206, 2006.
- AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M. L.; YAMASHITA, M. M. et al. **Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no Vale do Rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil.** Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo. v. 32, n. 1, p. 41-49, 2006.
- CETESB (São Paulo). **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2012.** CETESB. - - São Paulo: CETESB, 2013.<<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/agua/aguas-superficiais/relatorio-aguas-superficiais-2012-substituido-em-060513.zip>> ; acesso em 20/11/2013.
- CETESB (São Paulo). 2014. **Qualidade das águas salinas e salobras no Estado de São Paulo 2014.** CETESB. São Paulo: CETESB, 2014.
- DELBON, M. C. **Ação da Benzocaína e do Óleo de Cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*.** Jaboticabal: UNSEP, 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.
- DOTTA, G.; ROUMBEDAKIS, K.; SANCHES, E.G.et al. **Hematological profile of the red snapper *Lutjanus analis* captured in Florianópolis, sc, Brazil, and cultured in floating net cages.** Boletim do Instituto de Pesca, V. 41, n. 1, p. 183-189, 2015.

DRUMOND, G. V. F.; CAIXEIRO, A.P. A.; TAVARES – DIAS, M. et al. **Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia.** Acta Amazônica, Amazônia, v. 40, n. 3, p. 591 – 596, 2010.

FERNANDEZ, W.S. **Dinâmica populacional, análise das concentrações de metais e utilização de biomarcadores em *Mugil curema* Valenciennes, 1836 do estuário de Santos e do sistema costeiro Cananéia-Iguape, São Paulo, Brasil.** São Paulo: USP, 2011. 237 p. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, Oceanografia Biológica. São Paulo, 2011.

FRANÇA, J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V. et al. **Toxicidade crônica do cloreto de mercúrio (HgCl₂) associado ao selênio, através do estudo hematológico em tilápia *Oreochromis niloticus*.** Bioikos, v. 21, p. 11-19, 2007.

FERREIRA, L.I. **Estudo de aspectos da reprodução de *Mugil curema* Valenciennes 1836 (Pisces Muligidae) no estuário de São Vicente, SP.** São Paulo: USP, 1989. 90 p. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo, 1989.

FLYNN, M.N.; SILVA, L.C.M.; LOURO, M.P. **Processo de Bioacumulação na área estuarina de Santos e São Vicente, São Paulo.** RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 4, n. 2, p. 36-58, 2011.

FRANCO, L. **Biología y reproduccion de la lisa, *Mugil curema* Valenciennes 1836 (Pisces Muligidae) em el Golfo de Cariaco, Venezuela.** Venezuela, 1999. 103 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Oriente, Instituto Oceanográfico de Venezuela ,1999.

GOLDENFARB, P.B, FRANK, P. HALL, E.; et al. **Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination.** Amerc. J. Clin. Path, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.

HORTALLANI, M.A.; SARKIS, J.E.S.; ABESSA,D.M.S. et al. **Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuário de Santos-São Vicente.** Química Nova, v. 31, n. 1, p. 10-19, 2008.

ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V. **Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus***. Archives of Veterinary Science, v. 13, n. 1, p. 54-63, 2008.

JERÔNIMO, G. T.; MARTINS, M.L.; BACHMANN, F. et al. **Hematological parameters of *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes: Pimelodidae) from polluted and non-polluted sites in the Itajaí-Açuriver, Santa Catarina State, Brazil**. Acta Scientiarum Biological Sciences Maringá, v. 31, n. 2, p. 179-183, 2009.

KIRSCHBAUM, A.A.; SERIANI, R.; PEREIRA, C.D.S.; ASSUNÇÃO, A.; ABESSA, D.M.S.; ROTUNDO, M. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. **Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil**. Genetics and Molecular Biology, v. 32, n. 1, p. 151-154, 2009.

KOENING, M.L.; ESKINAZI-LEÇA, E.; NEUMANN-LEITÃO, S. et al. **Impactos da construção do porto de Suape sobre a comunidade fitoplanctônica no estuário do Rio Ipojuca (Pernambuco-Brasil)**. Acta Bot. Brasil, v. 16, n. 4, p. 407-420, 2002.

LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3ª ed. Santa Maria: UFSM. 107 p, 2007.

MARTINS, L; PAZ, A.V.; BRENTANO, D.M. **Avaliação de Micronúcleos em Juvenis de *Centropomus parallelus* (Robalo-Peva) Exposto a Diferentes Concentrações Salinas**. RTC, Florianópolis, SC, v. 2, n. 1, p. 13-16, 2010.

MELO, D.C. **Indicadores hematológicos e imunológicos após estresse crônico por hipóxia em tilápia (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada**. Belo Horizonte, 2008. 38 p. Tese (Doutorado) - Escola de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

MENEZES, N.A. & FIGUEIREDO, J.L.. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. V. Teleostei (4)**. São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, v. 4, 105 p, 1985.

MENEZES, N.; NIRCHIO, M.; OLIVEIRA, C. et al. **Taxonomic review of the species of *Mugil* (Teleostei: Perciformes: Mugilidae) from the Atlantic South**

Caribbean and South America, with integration of morphological, cytogenetic and molecular data. ZOOTAXA. v. 3918, n. 1, p. 001-038, 2015.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** 7.ed. Estados Unidos: Elsevier Editora Ltda., 2014, 835 p.

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

PORTO, L.C.S. **Avaliação de metais pesados e micronúcleos em peixes da Bacia Hidrográfica Butuí-Icamaquã e análise da água.** Lageados, Rio Grande do Sul, 2009. 99 p. Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário UNIVATES, Programa de pós-graduação em ambiente e desenvolvimento, Lageado, 2009.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; CAMPOS, B.E. S.et al. **Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *mugil platanus* günther, from the estuarine region of cananéia, são paulo, brazil.** Revista brasileira de Zoologia. v. 14, n. 2, p. 329-339, 1997.

RANZANI – PAIVA, M. J.; PÁDUA, S.B.; TAVARES – DIAS, M. et al. **Métodos para análise hematologia de peixes.** 1 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá ,142 p, 2013.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental.** Canoas: Editora da Ulbra, 2003.

RIVEIRO, C. L. G. **Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do Lago Paranoá, Brasília –DF, Brasil.** Brasília, 2007. 113p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em patologia Molecular da UnB, Brasília, 2007.

SAAD, M.A.H.; EZZAT,A.; SHABANA,M.B. **Effect of pollution on the blood characteristics of *Tilapia zilli*.** Water, Air and Soil Pollution. v. 2, p. 171-179, 1973.

ŞAHAN, A.; ALTUN,T.; ÇEVİK, F.et al. **Comparative Study of some Haematological Parameters in European Eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) Caught from Different Regions of Ceyhan River (Adana, Turkey).** E.U, Journal of Fisheries & Aquatic Sciences. v. 24,p. 167-171, 2007.

SANTOS, P.E. **Biomarcadores genotóxicos no monitoramento de estuários com diferentes níveis de contaminação utilizando peixes coletados *in situ***. São Paulo, 2009. 165p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Programa de Pós –Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, São Paulo, 2009.

SANTOS, R.B.S; TAVARES-DIAS, M. **Células sanguíneas e resposta hematológica de *oxydoras niger* (pisces, doradidae) oriundos da bacia do médio rio solimões, estado do Amazonas (Brasil), naturalmente parasitados**. Boletim do Instituto de Pesca. v. 36, n. 4, p. 283-292, 2010.

SATAKE, F., BENITES DE PÁDUA, S. E ISHIKAWA, M. M. **Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica**. In: TAVARES-DIAS, M (Ed). Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Amapá: Embrapa, 2009. cap 13, p. 330-345.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. **Estudo Técnico para Recategorização de Unidades de Conservação e Criação do Mosaico de UCs Juréia-Itatins 2012**. p. 187, 2012.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal**. 5.ed. São Paulo: Livraia Santos Editora, 2002. 611.

ZAVALA – CAMIN, L.A. **O planeta água e seus peixes**. 1.ed. Santos: Comunicar, 2004. 326 p.

SERIANI, R.; MOREIRA, L. B.; ABESSA, D. M. S. et al. **Hematological analysis of *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Scianidae, from two Estuaries of Baixada Santista, São Paulo, Brazil**. Brazilian Journal of Oceanography, v. 58, p. 87-92, 2010.

SERIANI, R.; ABESSA,D.M.S.; PEREIRA,C.D.S. et al. **Influence of seasonality and pollution on the hematological parameters of the estuarine fish *Centropomus parallelus***. Braz. j. oceanogr., v. 61, n. 2, p. 105-111, 2013.

SERIANI, R.; ABESSA, D.M.S. PEREIRA C.D.S. et al. **Blood parameters of estuarine and marine fish as non-destructive pollution biomarkers**. In: Almeida, E.A. Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems, 1st ed. CRC Press Taylor & Francis Group, 2014. P. 182-206.

SILVA, A.S.E.; LIMA, J.T.A.X.; BLANCO, Q.S. **Hematologia em peixes (Revisão Bibliográfica)**. Revista Centauro, v. 3, n. 1, p. 24-32, 2012.

SOUZA, C. R. G.; SOUZA, A. P. **Geologia e geomorfologia da área da Estação Ecológica Juréia-Itatins**. In: MARQUES, O. A. V.; DULEBA, W. (Ed.). *Estação Ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna*. Ribeirão Preto: Holos, 2004. cap. 2, p. 16-33.

TAVARES – DIAS, M.; RUAS DE MORAES, F. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M.Tavares-Dias, 2004, 144 p.

THOMPSON, J.M. **The Muligilidae of the world**. Mem. Qlq. Mus, v. 41, p. 457-562, 1997.

VIRGA, R.H.P.; GERALDO, L.P.; SANTOS, F.H.. **Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis**. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 27, n. 4, p. 779-785, 2007.

WILCOX, C. D.; DOVE, S.B.; McDAVID, W.D. et al. **Image tool**. IT Version, v. 3, 2002.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 5th ed. New Jersey, Prentice-Hall, 2010. 944 p.

ZAVALA – CAMIN, L.A. **O planeta água e seus peixes**. 1.ed. Santos: Comunnicar, 2004. 326 p.