



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL
LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

JULIANA SCANONI SILVA

**HPAs BILIARES E BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NA CARAPEBA *Eugerres
brasilianus* EM QUATRO ESTUÁRIOS TROPICAIS DO NORDESTE BRASILEIRO**

RECIFE

2015

JULIANA SCANONI SILVA

**HPAs BILIARES E BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NA CARAPEBA *Eugerres
brasilianus* EM QUATRO ESTUÁRIOS TROPICAIS DO NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: **Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho**

RECIFE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Juliana Scanoni

HPAs biliares e biomarcadores bioquímicos na carapeba *Eugerres brasiliensis* em quatro estuários tropicais do Nordeste brasileiro/ Juliana Scanoni Silva– Recife: O Autor, 2015.

74 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biologia Animal, 2015.

Inclui bibliografia

1. Peixe 2. Pescados- contaminação 3. Estuários 4. Hidrocarbonetos I. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (orientador) II. Título

1.

597

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-194

JULIANA SCANONI SILVA

**HPAs BILIARES E BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NA CARAPEBA *Eugerres
brasilianus* EM QUATRO ESTUÁRIOS TROPICAIS DO NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para à obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em 28/07/2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho (Orientador)
Departamento de Zoologia - UFPE

Profa. Dra. Eliete Zanardi Lamardo (1º Titular)
Departamento de Oceanografia - UFPE

Profa. Dra. Cristiane Maria Varela de Araújo Castro (2º Titular)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (3º Titular)
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof. Dr. José Roberto Botelho de Souza (Suplente Interno)
Departamento de Zoologia – UFPE

Prof. Dr. Gilvan Takeshi Yogui (Suplente Externo)
Departamento de Oceanografia – UFPE

RECIFE
2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que participaram da minha formação acadêmica de forma direta e indireta todos esses anos. Obrigada por me permitir compartilhar de seus conhecimentos.

Aos meus pais, que me apoiam em tudo que faço, minhas dúvidas, meus gritos, minhas chatices, implicâncias e alegrias. A meu pai por todos os temakis de consolação. A minha mãe por todo suporte durante esse ano. A minha irmã, por fazer parte do meu mundo e compartilhar de todos meus pensamentos, te amo!

Ao meu Orientador Paulo Carvalho, por sua ajuda em inúmeros momentos, sua inesgotável paciência durante minhas crises existenciais e seus ensinamentos ao longo dos últimos anos. Obrigada por tudo.

A todo LABECOTOX, pelos últimos 5 anos de minha vida. A todos que passaram e aos que ficarão. Agradeço a essa equipe que compartilho um grande carinho para toda vida. A Laura Melo, Helena Oliveira, Romulo Nepomuceno, Driele Ventura, Talita Pereira, Raissa Mendonça, Ana Alice, Priscila Cordeiro, Anderson Brito, Luiz Eduardo. Especialmente a Gaby Torreiro-Melo, minha grande mãe na academia e na vida.

Aos meus Amigos, que me compreendem, e que mesmo não compreendendo, continuam me escutando. A Celina Martins, por ter me abrigado e me suportado nesse último ano. A Luiz Eduardo, por ter me iluminado com seu jeito de ser nos dias árduos de trabalho. A Rodolfo Ferreira por me mostrar que nem sempre o copo realmente está cheio. Aos meus queridos amigos do PPGBA, Lira Jr. Jaculi, Raissa Guerra, Tarciane Pires, Diego Oliveira por afogarem nossas mágoas juntos. A Daniele Miranda, que me abriu os olhos dessa nova etapa e me ajudou bastante na vida A Silvia Caroline e Marina Araújo por terem me acompanhado desde sempre e me apoiado nesse conturbado período: obrigada por tudo, meninas!

E por fim, agradeço a todos momentos, interações e pessoas que o Universo propiciou a minha vida.

RESUMO

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos derivados de petróleo conhecidos por seu potencial de toxicidade a organismos aquáticos. Regiões estuarinas são frequentemente contaminadas por HPAs em decorrência de processos de urbanização e atividades industriais, incluindo a cadeia produtiva do petróleo. O trabalho teve o objetivo de avaliar a bioconcentração e efeitos bioquímicos de HPAs em *Eugerres brasiliensis* coletados em quatro estuários no litoral sul de Pernambuco, a fim de obter um diagnóstico da poluição por estes contaminantes nestas regiões. As coletas foram realizadas no rio Ariquindá, sistema estuarino do rio Formoso (AR-SERF), no rio Massangana, no complexo estuarino de Suape (MA-CES), no sistema estuarino de Barra de Jangada (SEBJ), e no complexo estuarino da bacia do Pina (CEBP). A bile dos peixes foi analisada por Fluorescência Fixa para estimar a concentração em equivalentes dos HPAs naftaleno, fenantreno e criseno. Amostras de fígado foram utilizadas para análise de biomarcadores enzimáticos de fase I (etoxiresorufina orto-deetilase, EROD), fase II (glutathione S-transferase, GST), e defesa antioxidante (catalase, CAT, e glutathione redutase, GR). A análise de HPAs na bile e atividades enzimáticas em peixes coletados num ciclo anual em MA-CES e AR-SERF indicou uma semelhança na contaminação por HPAs na bile e nos níveis de atividades enzimáticas dos biomarcadores avaliados entre estes estuários, apesar da diferença do padrão de atividades antrópicas destas regiões. O CES comporta um complexo portuário com alta atividade industrial enquanto o SERF possui baixa densidade populacional e atividades turísticas. Os peixes coletados em SEBJ e CEBP apresentaram bile com concentrações do HPA criseno entre 13 x e 19 x maiores que AR-SERF, respectivamente. Foi detectado aumento das atividades da EROD, GST e CAT das regiões do SEBJ e CEBP, chegando a 30 x para a EROD, e aproximadamente 2 x para GST e CAT em comparação com AR-SERF. A maior bioconcentração de HPAs na bile e maior indução enzimática nos peixes *E. brasiliensis* do SEBJ e CEBP indicam que estes estão dispendendo energia para tentar se adaptar a esta contaminação, o que pode ter consequências para o seu crescimento e sobrevivência nestas regiões. Os resultados indicam que SEBJ e CEBP recebem um maior aporte de HPAs, associado a maior densidade populacional e atividades antrópicas nas bacias desses rios. Os parâmetros utilizados serão úteis para o monitoramento destes sistemas estuarinos, em especial do CES, em franco processo de urbanização e industrialização.

Palavras-chave: HPAs; fluorescência fixa; biotransformação; EROD; GST; defesa antioxidante.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are oil derived compounds known for their toxicity potential towards aquatic organisms. Estuarine regions are frequently contaminated with PAHs as a result of urbanization processes and industrial activities, including the oil productive chain. The work aimed to evaluate the bioconcentration and the biochemical effects of PAHs in *Eugerres brasiliensis* sampled from four estuaries in the south coast of Pernambuco, in order to obtain a pollution diagnosis by these contaminants in such regions. The data collection was made in the Aquirindá river, Rio Formoso estuarine system (AR-RFES), in the Massangana river, in the Suape's estuarine complex (MA-SEC), in the Barra de Jangada estuarine system (BJES) and in the Bacia do Pina estuarine complex (BPEC). The fish's bile were analyzed using fixed fluorescence to estimate the equivalent concentrations of the PAHs naphthalene, phenanthrene and chrysene. Liver samples were used for phase 1 enzymatic biomarkers analysis (*Ethoxyresorufin-O-deethylase*, EROD), phase II (glutathione S-transferase, GST) and antioxidant defense (catalase, CAT, and glutathione reductase, GR). The analyzes of PAHs in bile and enzymatic activity in fish that were sampled in an annual cycle in MA-SEC and AR-RFES indicated a similarity between PAHs contamination in bile and the enzymatic activity levels of the biomarkers evaluated among these estuaries, despite the different anthropogenic activity patterns. The SEC comprises a port complex with high industrial activity, while the RFES has low population density and touristic activities. The bile of the fish sampled in BJES and BPEC showed chrysene concentration between 13 x and 19 x higher than AR-RFEC, respectively. An increase in EROD, GST and CAT activities was detected in the regions of BJES and BPEC, reaching 30 x for EROD, and approximately 2 x for GST and CAT. The high PAHs bioconcentration in the bile and the high enzymatic induction in *E. brasiliensis* fish from BJES and BPEC indicate that these fish are wasting energy to try to become adapted to this contamination, which may have consequences to their growth and survival in such regions. The results indicate that BJES and BPEC receive a greater input of PAHs, associated with the higher population density and anthropogenic activities in these rivers' basins. The parameters used will be useful for the monitoring of these estuarine systems, especially in SEC, which suffers with a rapid urbanization and industrialization process.

Key words: PAHs; fixed fluorescence; biotransformation; EROD; GST; antioxidant defense.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	8
2.	REVISÃO DE CONCEITOS EM POLUIÇÃO AQUÁTICA.....	11
2.1.	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs).....	12
2.1.1.	NAFTALENO.....	14
2.1.2.	FENANTRENO.....	15
2.1.3.	CRISENO.....	15
2.2.1.	BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS.....	15
2.2.1.1.	Enzimas de Biotransformação.....	16
2.2.1.1.1.	Citocromo P450.....	16
2.2.1.1.2.	Glutathione S-Transferase (GST).....	18
2.2.1.2.	Enzimas de Defesa Antioxidante.....	18
2.2.1.2.1.	Glutathione Redutase (GR).....	20
2.2.1.2.2.	Catalase (CAT).....	20
2.2.1.3.	Biomarcador anticolinesterásico: Acetilcolinesterase (AChE).....	21
2.2.2.	METABÓLITOS BILIARES.....	22
2.3.	ÁREAS DE ESTUDO.....	24
2.4.	MODELO EXPERIMENTAL: <i>Eugerres brasiliensis</i>	27
3.	OBJETIVOS.....	29
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4.	METODOLOGIA.....	30
4.1.	COLETA DOS PEIXES NOS SISTEMAS ESTUARINOS.....	30
4.2.	HPAs NA BILE.....	31
4.3.	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	32
4.4.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
5.	RESULTADOS.....	35

5.1. ABORDAGEM ESPAÇO-TEMPORAL NO SERF E CES	35
5.1.1. HPAs NA BILE	35
5.1.2. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	38
5.1.2.1. Glutathione S-Transferase	39
5.1.2.2. EROD	40
5.1.2.3. Glutathione Redutase	42
5.1.2.4. Catalase	43
5.1.2.5. Acetilcolinesterase	44
5.2. ABORDAGEM ESPACIAL: SERF, CES, SEBJ E CEBP	46
5.2.1. HPAs NA BILE	46
5.2.2. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	50
5.2.2.1. Glutathione S-Transferase	50
5.2.2.2. EROD	51
5.2.2.3. Glutathione Redutase	52
5.2.2.4. Catalase	53
5.2.2.5. Acetilcolinesterase	54
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO I	73

1. INTRODUÇÃO

Regiões estuarinas tropicais possuem altas taxas de diversidade biológica, produtividade primária e biomassa, características que propiciam uma rápida expansão urbana, que geralmente ocorre de forma desordenada (SANTOS et al., 2002). Com o consequente aumento populacional ao longo da região estuarina, o aumento de descargas de efluentes agrícolas, domésticos e industriais é inevitável e os efeitos na biota aquática são imprevisíveis. No litoral de Pernambuco, nordeste brasileiro, trabalhos envolvendo a análise da contaminação de estuários por xenobióticos, como derivados de petróleo, são escassos e nem sempre envolvem a análise da biota da região (LEMOS et al., 2014).

O sistema estuarino do Rio Formoso (SERF) possui em suas margens uma área de proteção ambiental e, em conjunto com sua baixa densidade populacional, pode ser caracterizado como o estuário de menor impacto antrópico do litoral de Pernambuco (GREGO et al., 2009; LEAL et al., 2015). Já o complexo estuarino de Suape (CES) abriga o Complexo Industrial Portuário de Suape, grande empreendimento do estado, com mais de 100 indústrias implantadas, incluindo várias petroquímicas e em breve uma refinaria de petróleo (SUAPE, 2015), atividades com alto potencial de contaminação química na região. O sistema estuarino de Barra de Jangada (SEBJ) recebe as águas dos rios Jaboatão e Pirapama, e Branco (2007) descreve o rio Jaboatão como o segundo mais poluído de Pernambuco. Possui diversas indústrias ao longo de seu leito e uma população de 1,4 milhões de pessoas residindo em sua bacia hidrográfica (CPRH, 2013). Assim como a região estuarina de Barra de Jangada, o complexo estuarino da Bacia do Pina (CEBP) se encontra em uma área com alta taxa de urbanização, e a bacia de um de seus rios, o Capibaribe, abriga cerca de 1,3 milhões de pessoas (CPRH, 2013). Por se encontrarem dentro da região metropolitana do Recife, capital do estado, a consequente alta taxa de descargas de efluentes domésticos e industriais não tratados no SEBJ e CEBP promovem potencial contaminação química com efeitos desconhecidos na biota aquática.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) podem ter origem natural ou antrópica, como queima de combustíveis fósseis, efluentes domésticos e industriais, e vazamentos durante a produção, refino ou transporte de petróleo (TORREIRO-MELO et al., 2015). Os HPAs apresentam um potencial de toxicidade elevado para diversos grupos de animais aquáticos, como moluscos (NAHRGANG et al., 2013), crustáceos (REN et al. 2015),

peixes (Payne et al., 2003), aves (LUZARDO et al., 2014) e mamíferos (SIDDENS et al., 2015), inclusive humanos (GENKINGER et al. 2015). Eisler (1987) estimou que anualmente cerca de 230 mil toneladas de HPAs são liberados nos ambientes aquáticos no mundo, regiões particularmente vulneráveis a esse tipo de contaminação. Áreas costeiras e portuárias são frequentemente expostas a HPAs, por suportarem alta densidade populacional e envolverem atividades relacionadas ao tráfego de embarcações e à indústria petrolífera (BEBBIANO et al., 2015).

Os HPAs quando liberados no corpo d'água podem ser absorvidos por organismos de toda a teia trófica da região, incluindo os peixes, que podem sofrer efeitos deletérios que dificultam sua sobrevivência e reprodução (JOHNSON et al., 2008; PAYNE et al., 2003; TORREIRO-MELO et al., 2015). Os peixes absorvem HPAs da água pelas brânquias e pelo alimento, e para facilitar a excreção metabolizam estes compostos no fígado (SCHLENK et al., 2008). No processo metabólico, ocorre a participação de enzimas de biotransformação de fase I, como a enzima do gene CYP1A, etoxiresorufina-orto-deetilase (EROD), e de fase II, glutathione S-transferase (GST), ambas amplamente utilizadas como biomarcadores no monitoramento de ecossistemas aquáticos contaminados (WHYTE et al., 2000; SCHLENK et al., 2008; BASTOS et al., 2013). As reações de metabolização produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), que promovem danos celulares como lipoperoxidação e oxidação de proteínas e do DNA (LUSHCHAK, 2011). O aumento de EROs induz a produção de enzimas relacionadas a defesa antioxidante do organismo, como a glutathione redutase (GR) e catalase (CAT), a fim de minimizar os danos às células (LIVINGSTONE, 2001; VALAVANIDIS et al., 2006; REGOLI E GIULIANI, 2014).

Os produtos da biotransformação são transferidos e armazenados temporariamente na vesícula biliar para posterior excreção no trato digestivo (RUDDOCK et al., 2012). A quantificação de HPAs biliares é um parâmetro comumente utilizado na avaliação de ambientes contaminados por HPAs por ser um compartimento biológico concentrador dos compostos presentes na água aos quais os peixes foram expostos (RUDDOCK et al., 2002; LIN et al., 1996; AAS et al., 2000).

A avaliação da biococentração de HPAs na bile de peixes (AAS et al., 2000; BEYER et al., 2010), em conjunto com alterações em enzimas de biotransformação de fase I (BOLS et al., 1999; BILLIARD et al., 2002) e fase II (PATHIRATNE e HEMANCHANDRA, 2010), do

sistema antioxidante (VALAVANIDIS et al., 2006), e da acetilcolinesterase (FULTON e KEY, 2001) são constantemente utilizados como ferramentas ecotoxicológicas em programas de avaliação e monitoramento ambiental (SHAILAJA e D'SILVA, 2003; NAHRGANG et al., 2013; AMIARD-TRIQUET et al., 2013). A análise de múltiplos biomarcadores no monitoramento ambiental enriquece a compreensão dos efeitos subcelulares destes contaminantes, que podem ser utilizados na previsão de efeitos em níveis mais altos de organização biológica, que apresentam maior relevância ecológica (VAN DER OOST et al., 2003; ROMÉO e GIAMBÉRINI, 2013).

No monitoramento de regiões contaminadas quimicamente, é importante o cuidado na seleção da espécie a ser utilizada. Espécies sentinela devem ser representativas para a região, a fim de que possam refletir a intensidade da sua exposição aos contaminantes presentes através de efeitos deletérios quantificáveis, causados em longos períodos de tempo (BERTHET, 2012). A carapeba listrada *Eugerres brasiliensis* (Teleostei, Gerreidae) é uma espécie de peixe de larga abrangência e abundância por todo o litoral brasileiro, e possui características como importância econômica, onivoria, fácil captura e identificação, presença durante o ano inteiro (PAIVA et al., 2009), que a tornam potencialmente útil como espécie sentinela no monitoramento de regiões costeiras no Brasil.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo analisar HPAs biliares e biomarcadores enzimáticos de biotransformação e defesa oxidante na espécie *E. brasiliensis* coletada em quatro estuários do litoral sul do estado de Pernambuco no nordeste brasileiro, o sistema estuarino do Rio Formoso, o complexo estuarino de Suape, o sistema estuarino de Barra de Jangada e o complexo estuarino da Bacia do Pina. Esta abordagem com múltiplos biomarcadores objetiva construir um diagnóstico ambiental em relação a contaminação por HPAs nestes ambientes costeiros.

2. REVISÃO DE CONCEITOS EM POLUIÇÃO AQUÁTICA

Os últimos séculos foram marcados por grandes avanços industriais e tecnológicos em diversos tipos de vertentes, como agricultura, petroquímicas, mineração, entre outros. Consequentemente, essas atividades passaram a produzir e emitir uma significativa quantidade e diversidade de componentes químicos desconhecidos, promovendo uma contaminação do ambiente e da sua biota, e gerando efeitos tóxicos imprevisíveis. A partir de 1960, os problemas causados ao meio ambiente começaram a ser reconhecidos e entraram na pauta de discussões da sociedade. Um grande responsável por este acontecimento foi a publicação do livro *Primavera Silenciosa*, de Rachel Carson, em 1962, que tratou de forma didática essa problemática e sensibilizou grande parte da população da época (ROMÉO E GIAMBÉRINI, 2013).

A partir do fim dos anos 80, o monitoramento do ambiente era baseado na análise da água, de forma a quantificar quimicamente os compostos presentes (ROMÉO E GIAMBÉRINI, 2013). Porém, essas ferramentas não trazem informações sobre os possíveis efeitos deletérios nos organismos destes ambientes, e a criação de ferramentas que avaliassem como a contaminação química estava prejudicando as comunidades dos ecossistemas atingidos se tornou necessária (AMIARD-TRIQUET E AMIARD, 2013). Assim, surgiu a Ecotoxicologia, termo utilizado pela primeira vez em 1969, conceituado na época como um ramo da toxicologia que investiga os efeitos tóxicos de poluentes químicos nos ecossistemas, abrangendo desde sua entrada no ambiente até suas implicações nos organismos, populações e comunidades expostos (TRUHAUT, 1977). Atualmente a Ecotoxicologia pode ser conceituada como a ciência que estuda os efeitos deletérios não-intencionais causados por compostos químicos nos ecossistemas e organismos que os constituem (WALKER et al., 2005).

No contexto da poluição, ambientes aquáticos são sistemas altamente vulneráveis a contaminação e tendem a receber altas cargas de compostos pela drenagem a partir do ambiente terrestre (Di GIULIO e HINTON, 2008). A cadeia alimentar aquática é geralmente bem delimitada, e sem muita influência da cadeia alimentar terrestre, aumentando a tendência de acumulação de contaminantes persistentes nos níveis mais altos, como predadores aquáticos (Di GIULIO e HINTON, 2008).

2.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)

Atualmente, o petróleo é a maior fonte de energia mundial e representa 40,5% da fonte de energia primária no Brasil (MME, 2014). Diante da expansão das atividades de extração e refino de petróleo no Brasil, é crescente o risco de contaminação química do meio ambiente, decorrente de acidentes envolvendo derramamento de petróleo de diferentes magnitudes (SILVA et al., 1997). Eisler (1987) estimou que anualmente cerca de 230 mil toneladas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são liberados nos ecossistemas aquáticos. Assim, a avaliação da contaminação e dos efeitos biológicos destes contaminantes na biota é de suma importância no monitoramento ambiental de regiões costeiras.

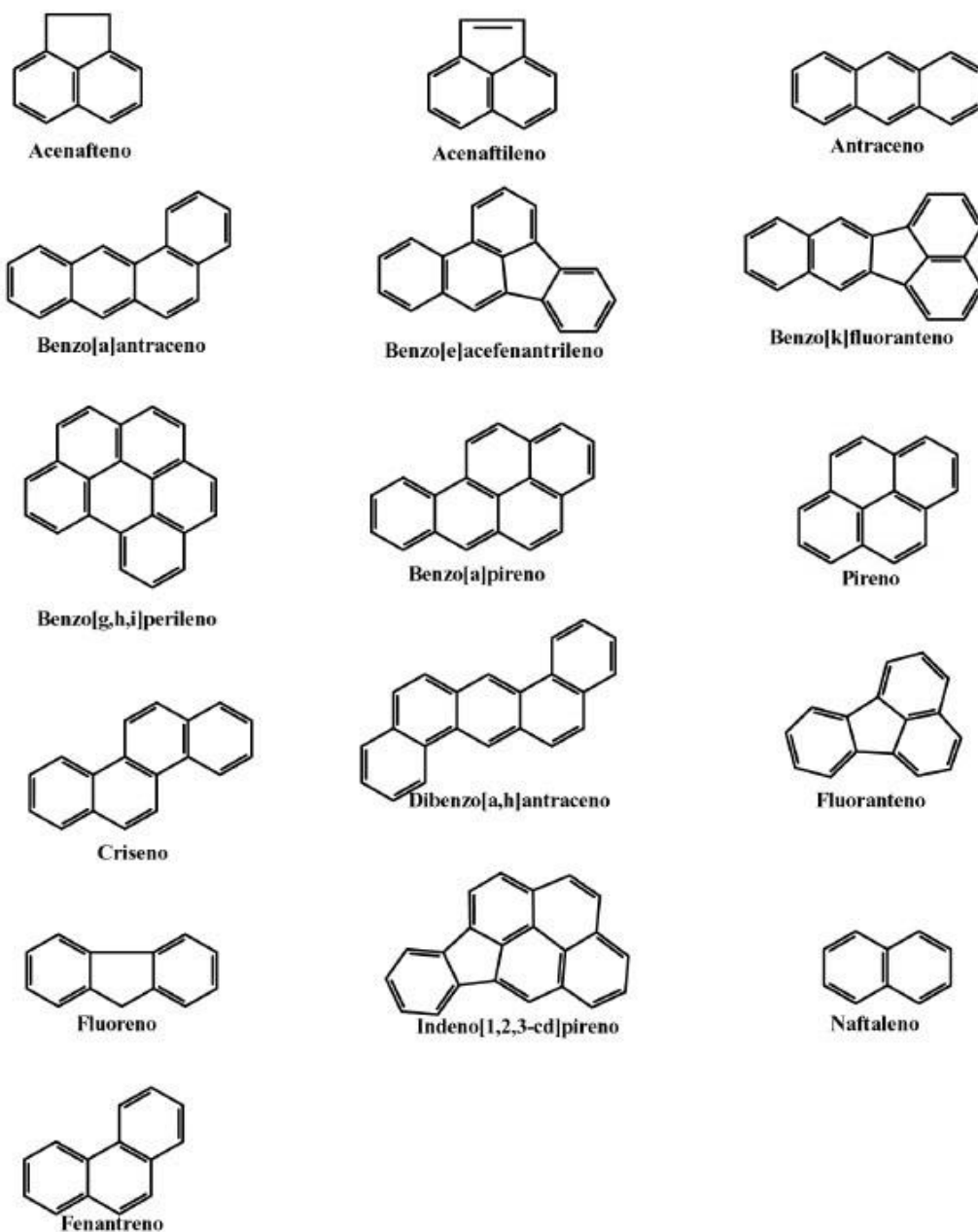
Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são um conjunto de compostos constituídos pela fusão de dois ou mais anéis aromáticos e que podem ser originados de diversas fontes, principalmente durante a formação de combustíveis fósseis e combustão incompleta de compostos orgânicos (NEFF, 2002). Essencialmente, os HPAs podem ser emitidos por todos os tipos de combustão, como os incêndios florestais que ocorrem espontaneamente, erupções vulcânicas, causados naturalmente, e processos de combustão de material orgânico, queima de combustíveis como diesel ou gasolina e queima de biomassa vegetal, de origem antrópica (SETTE et al., 2013). O petróleo bruto contém de 0,2 a 7% de HPAs, e a abundância de cada HPA é inversamente proporcional ao seu peso molecular, ou seja, quanto mais anéis aromáticos o composto possuir, menor sua concentração (NEFF, 2002). Apesar da pequena porcentagem, os HPAs são os componentes do petróleo que despertam maior preocupação ambiental atualmente por serem ubíquos nos ambientes aquáticos e pela sua alta toxicidade na biota (Aas et al., 2000).

A tendência de um composto químico se particionar entre a água e o octanol é expressa pelo coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) (O'FLAHERTY, 2003). O octanol é considerado um modelo razoável para os lipídeos animais, e desta forma, quanto maior o K_{ow} , maior a solubilidade lipídica e, conseqüentemente, maior a tendência do composto em se bioconcentrar ou bioacumular em organismos (ERICKSON et al., 2008). Em HPAs, com o aumento da quantidade de anéis aromáticos, a solubilidade em água diminui e o K_{ow} aumenta (SETTE et al., 2013).

A USEPA, Agência de Proteção Ambiental do EUA, listou 16 HPAs considerados como poluentes prioritários (Figura 1) pela sua onipresença em ambientes contaminados, e pelo seu potencial de toxicidade, os quais têm sido amplamente estudados e avaliados no monitoramento de áreas contaminadas (USEPA, 2015). Estes 16 HPAs prioritários de características diversas manifestam sua toxicidade através de diferentes mecanismos de toxicidade, que podem ocasionar efeitos tóxicos em diferentes parâmetros avaliados em peixes. Estes parâmetros incluem desde medidas suborganísmicas ao nível bioquímico, genético, histológico, até avaliações ao nível de indivíduos afetando comportamento, desenvolvimento, crescimento e recrutamento, que por sua vez pode afetar populações como um todo.

Alterações em escala populacional devido a exposição por HPAs já foi relatado anteriormente na literatura. Payne et al. (2003) faz uma revisão com inúmeros efeitos dos HPAs em peixes, tanto relatados em análises em campo e laboratório, quanto efeitos de HPAs individuais e misturas. Nesta revisão são relatados efeitos subcelulares, como alterações enzimáticas, imUNológicas e genéticas, a efeitos em maiores níveis de organização biológica, como alterações histopatológicas, reprodutivas, comportamentais e no crescimento. Alguns casos particulares facilitam a observação de efeitos de grande relevância ecológica associados aos HPAs, que muitas vezes estão associados a outros contaminantes num certo local. Por exemplo, o derrame de petróleo do navio Exxon Valdez, no oceano Pacífico em 1989, que causou grandes danos a populações de peixes da região, com intenso declínio populacional nos 4 anos seguintes (MARTY, 2008). Outro exemplo é o estuário Puget, nos EUA, com alta contaminação por HPAs devido as altas taxas de efluentes domésticos e industriais na região, em que Johnson et al. (2008) relatou diversos efeitos dos HPAs nos peixes da região, durante os últimos 20 anos, como a presença de metabólitos biliares de HPAs, indução do gene CYP1A, danos ao DNA nuclear, câncer no fígado e alterações imUNológicas, reprodutivas e no crescimento dos indivíduos.

Figura 1. Estrutura molecular dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos considerados prioridade em pesquisa pela agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA). Adaptado de USEPA (2015).



2.1.1. NAFTALENO

O naftaleno é um HPA formado por dois anéis aromáticos, com solubilidade em água de $31,7 \text{ mg L}^{-1}$, fórmula química C_{10}H_8 , peso molecular de 128 g mol^{-1} e $\log K_{ow}$ de 3,36 (CCME, 2014). É considerado um HPA de baixo peso molecular, e é o principal HPA encontrado em diversos ambientes contaminados por petróleo bruto (RADKE et al., 1994; ASAGBRA et al.,

2015; FAKSNESS et al., 2015; MASHROOFEH et al., 2015). Entre os efeitos relatados do naftaleno na biota aquática estão o aumento da lipoperoxidação (AHMAD et al., 2003) e de enzimas de estresse oxidativo (ALI E LIU, 2013), entre outros.

2.1.2. FENANTRENO

O Fenantreno é um HPA formado por três anéis aromáticos, com solubilidade em água de $1,15 \text{ mg L}^{-1}$, fórmula química $\text{C}_{14}\text{H}_{10}$, peso molecular de $178,22 \text{ g mol}^{-1}$ e $\log K_{ow}$ de 4,46 (CCME, 2014). É considerado um HPA prioritário pela EPA, e é um dos principais hidrocarbonetos encontrados em amostras de petróleo bruto e no ambiente, assim como seus derivados alquilados (SETTE et al., 2013; UNEP, 1991). A detecção deste composto em organismos em um ambiente natural sugere uma contaminação local por fontes petrolíferas (CORREIA et al., 2007; Mashroofeh et al., 2015). Entre os efeitos relatados do fenantreno na biota aquática estão o aumento da atividade da EROD e de enzimas de estresse oxidativo, em associação com modificações no comportamento natatório (CORREIA et al., 2007), diminuição de interações sociais (GONÇALVES et al., 2008), disfunção cardíaca (INCARDONA et al., 2004), efeito letárgico (Torreiro-Melo et al., 2015), diminuição da acuidade visual e da captura de presas (carvalho et al., 2008), entre outros.

2.1.3. CRISENO

O criseno é um HPA formado por quatro anéis aromáticos, com solubilidade em água de $2 \text{ a } 6,3 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$, fórmula química $\text{C}_{18}\text{H}_{12}$, peso molecular de 228 g mol^{-1} e $\log K_{ow}$ de 5,7 (CCME, 2014). É considerado um HPA de alto peso molecular e alto potencial carcinogênico, inclusive em humanos (CCME, 2014). Entre os efeitos relatados do criseno na biota aquática estão o aumento da atividade da EROD (BOLS et al., 1999), GST e enzimas de estresse oxidativo (REN et al., 2015; XIU et al., 2015), lipoperoxidação (REN et al., 2015), genotoxicidade (MEYER et al., 2014), entre outros.

2.2. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA

2.2.1. BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS

No processo de metabolização de contaminantes químicos orgânicos como os HPAs estão associados diversos componentes enzimáticos responsáveis por diferentes funções ao longo do

processo. Os HPAs ou outros contaminantes, ao entrar em um sistema biológico, geram uma série de respostas nas vias metabólicas, e a intensidade destas respostas pode estar relacionada de modo dose-dependente ao grau de contaminação do ambiente e ao tempo de exposição desses indivíduos a estes compostos (ROMÉO E GIAMBÉRINI, 2013). Assim, enzimas como biomarcadores de poluição tem sido amplamente utilizadas no monitoramento ambiental, possibilitando avaliação dos efeitos a nível bioquímico entre locais com diferentes graus de contaminação.

2.2.1.1. Enzimas de Biotransformação

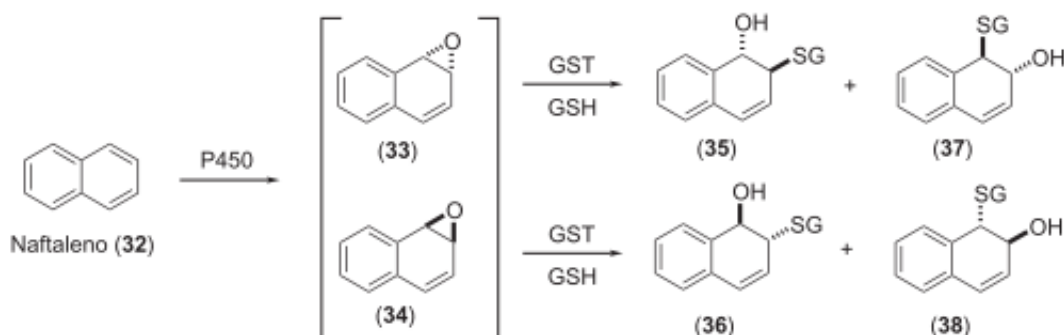
A biotransformação de xenobióticos pode ser dividida em duas fases, e tem como objetivo principal o aumento da hidrofília dos compostos para excretá-los mais facilmente (SCHLENK et al., 2008). Na fase I ocorre a adição de radicais polares como hidroxilas (-OH), sulfidrilas (-SH) e aminas (-NH₂) aos xenobióticos. Essas reações são conduzidas por enzimas do citocromo P450 do gene CYP1A1 (SETTE et al., 2013). A fase II, caracterizada por reações de conjugação, é catalisada principalmente pela glutathione S-transferase (GST) (SCHLENK et al., 2008). Estas reações envolvem por exemplo a união de HPAs hidroxilados após a fase I com a glutathione (GSH), formando uma molécula conjugada altamente hidrofílica. Essas reações podem ocorrer com diversos xenobióticos, como o HPA naftaleno, representado na Figura 2. Após essas reações de biotransformação e consequente aumento da hidrofília dos HPAs, essas moléculas são direcionadas a excreção. Essas reações podem ocorrer dentro de todas as células do indivíduo, entretanto a maior parte destas reações ocorrem em células hepáticas, e os produtos metabólitos são direcionadas a vesícula biliar para excreção (SCHLENK et al., 2008).

2.2.1.1.1. Citocromo P450

O gene CYP consiste numa superfamília de genes que codificam enzimas do grupo P450, ou monooxigenases, que tipicamente catalisam reações oxigenação no processo de detoxificação endógena e exógena (UNO et al., 2012). Na análise do genoma do peixe fugu (*Takifugu rubripes*) foram encontradas 54 famílias do gene CYP (NELSON, 2003). A família CYP1 já foi isolada em várias espécies de peixes e possui 4 subfamílias: CYP1A, CYP1B, CYP1C e CYP1D (UNO et al., 2012). As enzimas resultantes da transcrição e tradução do gene CYP1A catalisam a oxidação de HPAs e outros contaminantes orgânicos, são responsáveis por suas vias de detoxificação e excreção, e metabolizam uma grande variedade de substratos, como

a 7-etoxioresorufina orto-deetilase (EROD). As atividades das enzimas codificadas pelo CYP1A são comumente estimadas pela atividade da EROD há décadas (BUHLER E WILLIAMS, 1988; CORREIA et al., 2007; NAHRGANG et al., 2013).

Figura 2. Representação da biotransformação do hidrocarboneto aromático naftaleno por enzimas de fase I (P450) e fase II (Glutathione S-transferase - GST), adaptado de HUBER et al. (2008). GSH: glutathione na forma oxidada; SG: radical da glutathione.



A EROD pode ser induzida por quatro classes de contaminantes: dioxinas, furanos, bifenilas policloradas (PCBs) e HPAs, em ordem decrescente de potencial indutivo (SAFE, 1990). Essa indução ocorre pela ligação de compostos aromáticos planares, principalmente dioxinas, no receptor Ah (*Aryl hydrocarbon receptor* ou AhR), presente no citoplasma celular. O complexo dioxina-AhR se desloca para o núcleo celular, promovendo a ativação do gene CYP1A (UNO et al., 2012). A EROD pode ser induzida por todas estas classes de contaminantes, e tem sido utilizada como biomarcador de efeitos bioquímicos para dioxinas, furanos, PCBs e HPAs (UNO et al., 2012).

Os HPAs vêm se mostrando potenciais indutores de CYP1A, tanto em experimentos laboratoriais (CORREIA et al., 2007; NAHRGANG et al., 2009) quanto em campo (TAIROVA et al., 2012; DÉVIER et al., 2013; NAHRGANG et al., 2013). Há um significativo conjunto de trabalhos que utilizam a análise de metabólitos de HPAs biliares em conjunto com a análise da EROD no fígado de peixes (DÉVIER et al., 2013; TAIROVA et al., 2012; WESSEL et al., 2010; PIKKARAINEN, 2006; FUENTES-RIOS et al., 2005), reafirmando o potencial destas moléculas induzirem alterações na biotransformação de fase I, a partir da indução da transcrição e tradução do gene CYP1A.

2.2.1.1.2. Glutathione S-Transferase (GST)

As glutathione S-transferases (GSTs) compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam a conjugação da glutathione na forma reduzida (GSH) com compostos endógenos e exógenos dos organismos (HUBER et al., 2008). As GSTs possuem dois sítios de ligação ativos, um específico a GSH e outro com menor especificidade para eletrófilos, podendo se ligar a haletos de alquila, epóxidos, aldeídos, cetonas, entre outros compostos (HUBER et al., 2008).

Vários contaminantes orgânicos são responsáveis por alterar as taxas da GST, como pesticidas (PEEBUA et al., 2007; EZEMONYE E TONGO, 2010), bifenilas policloradas (PCBs) (Pereira Trídico et al., 2010), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (CORREIA et al., 2007; NAHRGANG et al., 2008; NAHRGANG et al., 2009; NAHRGANG et al., 2010) e metais (ZHANG et al., 2012; BENEDETTI et al., 2015). Essa alta variedade de ligantes promove a GST capacidade de biotransformar uma grande diversidade de contaminantes químicos em invertebrados e vertebrados, tornando-as o maior grupo de enzimas de detoxificação (BASTOS et al., 2013), e promovendo sua ampla utilização no monitoramento de poluição ambiental.

2.2.1.2. Enzimas de Defesa Antioxidante

O metabolismo básico dos organismos aeróbicos envolve a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), moléculas altamente reativas como o radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\cdot$) (Figura 3). Estimativas revelam que entre 1 e 3% do oxigênio (O_2) consumido por um sistema biológico de um ambiente não contaminado é convertido em EROs (LIVINGSTONE, 2001) e, desta porção, 2-3% das EROs escapam dos mecanismos de defesa antioxidante e promovem danos celulares aos organismos (VALAVANIDIS et al., 2006). Além da respiração aeróbica, grande parte das EROs são produzidos por reação das enzimas do grupo P450 (LUSHCHAK, 2011), responsáveis pela biotransformação de fase I. O aumento de contaminantes nos organismos promovem um aumento na produção de P450 e, conseqüentemente, as taxas de EROs aumentam drasticamente (LUSHCHAK, 2011; REGOLI E GIULIANI, 2014).

induzindo o aumento da síntese de enzimas antioxidantes para diminuir os danos oxidativos (VALAVANIDIS et al., 2006).

2.2.1.2.1. Glutathione Redutase (GR)

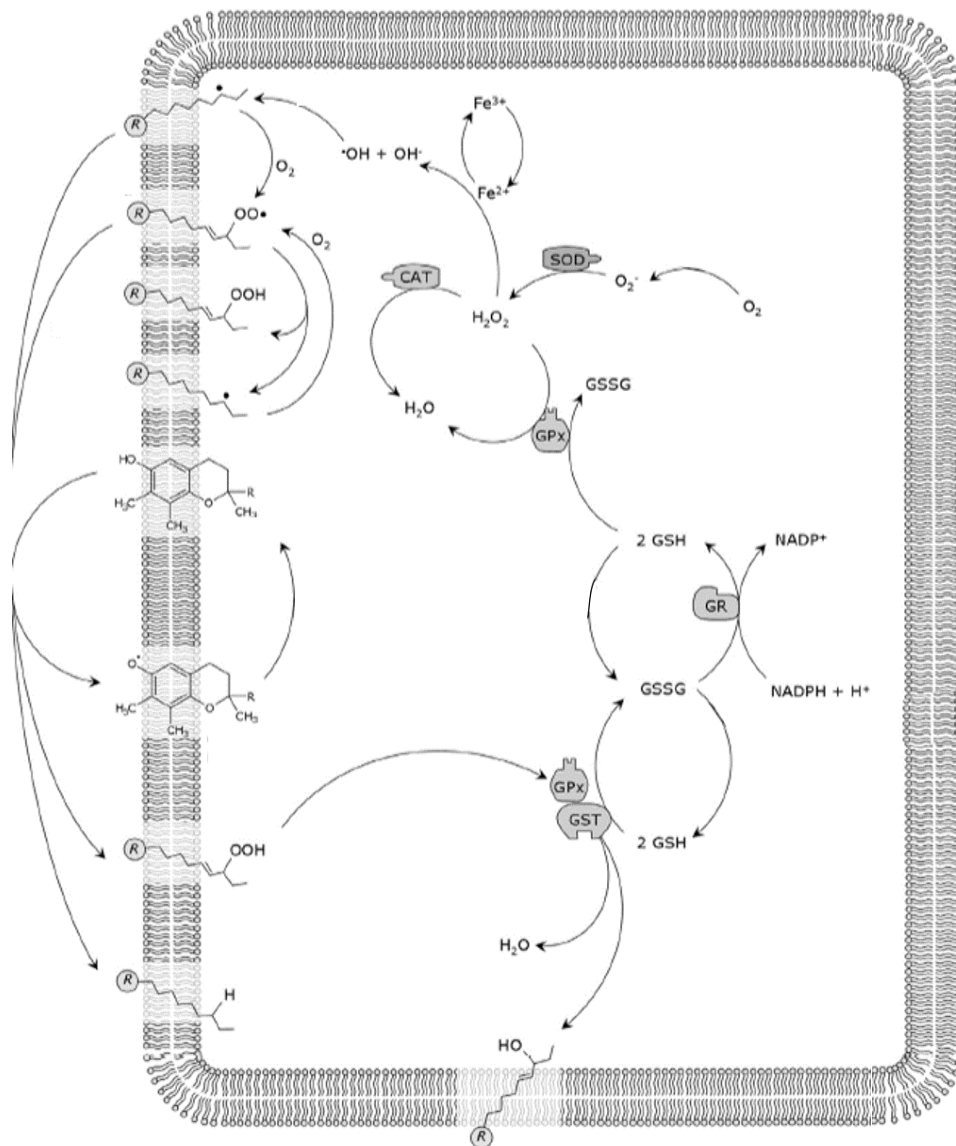
A glutathione redutase (GR) é membro da família de flavoenzimas, responsável pela conversão da glutathione oxidada (GSSG) em glutathione reduzida (GSH) com gasto energético (consumo de NADPH) (ARIAS et al., 2010; CARLBERG E MANNERNIK, 1985). A GR é uma enzima chave no metabolismo da glutathione e necessária na proteção contra agente oxidativos, como EROs (TEKMAN et al., 2008). A GR estabelece o potencial redox nas células mantendo grupos sulfidrilas das proteínas intracelulares na forma reduzida (TEKMAN et al., 2008). A atividade da GR pode ser alterada na presença de vários xenobióticos, incluindo HPAs, como evidenciado por Koenig et al. (2013) no peixe *Alepocephalus rostratus* do Mar do Mediterrâneo e por Oliveira et al. (2012) no peixe *Pomatoschistus microps* exposto a pireno.

2.2.1.2.2. Catalase (CAT)

A catalase (CAT) é uma enzima produzida por organismos eucariontes e procariontes, responsável pela oxidação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LI E SCHELLHORN, 2007) e oxidação de compostos hydrogenados, como o metanol, etanol, ácido fórmico e outros (AEBI, 1984; ROMÉO E GIAMBÉRINI, 2013). A CAT é uma das enzimas com maior poder catalítico da natureza, oxidando o H_2O_2 extremamente rápido, com uma taxa de aproximadamente 10^7 min^{-1} (SCANDALIOS, 2005).

Esta enzima pode agir de duas maneiras: (1) em baixa concentração de H_2O_2 , ocorre a oxidação através de diversas moléculas doadoras de hidrogênio (como etanol, metanol, etc): $RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + H_2O$; (2) em alta concentração de H_2O_2 , ocorre a rápida decomposição em H_2O e O_2 (SCANDALIOS, 2005). A sua quantificação está relacionada à velocidade de consumo do H_2O_2 , como demonstrado por Aebi (1984) e Li e Schellhorn (2007). Uma série de trabalhos vem mostrando o potencial indutor de HPAs na atividade da CAT, como evidenciado por Sun et al. (2006), Correia et al. (2007), Nahrgang et al. (2009) e Nahrgang et al. (2010), se tornando assim um viável marcador para exposição de HPAs.

Figura 4. Metabolismo da glutathiona (GSH) e enzimas de biotransformação e defesa antioxidante: glutathiona S-transferase (GST), glutathiona Redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD). Abreviaturas: glutathiona oxidada (GSSG), fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida (NADPH) e oxidada (NADP⁺). Adaptado de Regoli e Giuliani (2014).



2.2.1.3. Biomarcador anticolinesterásico: Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima com alta especificidade para a hidrólise da acetilcolina (AChI) nas fendas sinápticas de sinapses colinérgicas e junções neuromusculares (PESSOA et al., 2011). A AChI está presente em mamíferos, aves, peixes, répteis e insetos, e

em união com a noradrenalina, são os principais neurotransmissores em vertebrados (MUSHIGERI E DAVID, 2005).

A exposição a organofosforados (OFs) e carbamatos (CBs) inibe a atividade da acetilcolinesterase, essencial para a interrupção da transmissão neural, e esta inibição é o mecanismo de ação tóxica desses contaminantes (WOREK et al., 1999; PESSOA et al., 2011). Estes compostos formam uma classe importante de inseticidas, que em 2011 representavam 35% de todos os inseticidas utilizados no EUA (ASSIS et al., 2012). No caso dos organofosforados, a fosforilação da AChE é modificada e pode se tornar irreversível (FUKUTO, 1990). A problemática ambiental envolvendo estes pesticidas é a sua alta toxicidade em organismos não-alvo, principalmente na biota aquática. A análise da inibição da AChE em peixes é largamente relatada na literatura como biomarcador de OFs e CBs, e frequentemente envolvem outros efeitos nos indivíduos (CORSI et al., 2003; PESSOA et al., 2011; AL-GHAIS, 2013). Pessoa et al. (2011) verificou que a exposição de alevinos de tilápia *Oreochromis niloticus* ao carbamato carbofuran inibiu a AChE, em associação com uma diminuição da capacidade natatória e de captura de presas, aumento da acuidade visual e diminuição da habilidade de fuga de predadores. Assim, a análise da atividade da acetilcolinesterase em peixes é um relevante biomarcador da exposição a pesticidas anticolinesterásicos, comumente utilizados no agronegócio, incluindo o litoral sul de Pernambuco.

2.2.2. METABÓLITOS BILIARES

A exposição de peixes a HPAs diluídos na água permite a entrada destes compostos no sistema biológico do organismo, por absorção através das células das brânquias, da pele e do trato digestivo (RUDDOCK et al., 2002). Estes contaminantes são levados à corrente sanguínea dos peixes e distribuídos por todo o organismo, podendo gerar efeitos a nível bioquímico e comportamental (CORREIA et al., 2007). Ao chegar ao fígado, HPAs são biotransformados e seus produtos armazenados na vesícula biliar para posterior excreção pelo trato digestivo (NAHRGANG et al., 2010), como descrito anteriormente. O conteúdo biliar, assim, é um compartimento biológico concentrador dos HPAs presentes na água aos quais os peixes foram expostos (RUDDOCK et al., 2002).

Tanto os HPAs na forma pura, como seus metabólitos hidrofílicos, possuem anéis aromáticos em sua estrutura, e por este motivo são passíveis de detecção através da análise de

sua fluorescência (ARIESE et al., 1997). A fluorescência é um fenômeno físico em que uma molécula é excitada com fótons de determinado comprimento de onda e, ao voltar ao estado original, ela emite fótons em outro comprimento de onda menos energético. Cada molécula possui comprimentos de onda específicos, em que se excitam mais e emitem mais energia. Assim, existem pares de comprimentos de onda que maximizam a emissão de fluorescência para diferentes compostos fluorescentes, facilitando a sua detecção (AAS et al., 2000).

Há vários métodos de detecção de HPAs por fluorescência, e um dos mais comuns e mais baratos é o método de Fluorescência Fixa (FF). Esta técnica considera um par de comprimentos de ondas específico que maximiza a detecção de HPAs específicos, sendo assim possível sua quantificação na amostra. Para o fenantreno, o par de comprimentos de onda ideal é de 260/380 nm (excitação/emissão) (LIN et al., 1996; AAS et al., 2000). No caso do naftaleno o par é 290/335 nm (LIN et al., 1996), e para o criseno utiliza-se 310/360 nm (LEMOS et al., 2014). Alguns compostos biológicos ou outros HPAs, por também possuírem anéis aromáticos, podem gerar fluorescência neste par específico para o fenantreno quando suas moléculas estão dissolvidas juntamente com o fenantreno, e por isso esta técnica é classificada como semi-quantitativa. Apesar do método de FF ser semi-quantitativo, ele apresenta uma boa correlação com análises feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (LIN et al., 1996; VUONTISJÄRVI et al., 2004), que é considerado um teste mais preciso para quantificação de HPAs específicos na bile de peixes, uma vez que as moléculas presentes na mistura são separadas antes da leitura da fluorescência. Entretanto, a técnica de FF também pode ser utilizada com misturas, e pode-se estimar numa amostra a concentração de HPAs equivalentes de um HPA específico, supondo-se que toda a fluorescência quantificada no par específico de comprimentos de onda utilizado seja devida a este HPA específico escolhido. Assim, a detecção da fluorescência biliar de HPAs por FF apresenta um excelente custo-benefício, e se tornou um método importante para estudos de monitoramento de ambientes impactados com petróleo e seus derivados. A FF biliar permite estimar a que concentrações de HPAs os peixes foram expostos, e desta forma investigar as ligações entre estas concentrações internas de exposição e efeitos biológicos associados, em diferentes níveis de organização biológica (AAS et al., 2000; Ariele et al., 1997).

2.3. ÁREAS DE ESTUDO

Os sistemas estuarinos do rio Ariquindá, rio Massangana, de Barra de Jangadas e da bacia do Pina estão localizados no litoral sul de Pernambuco, no nordeste do Brasil (Figura 5). Nesta região o clima ao longo do ano apresenta uma divisão entre um período chuvoso (entre março e agosto) e um período seco (entre setembro e fevereiro), com temperatura média de 24°C e 30°C, respectivamente (LEAL et al., 2015; FEITOSA et al., 2012; SOUZA E TUNDISI, 2003).

O complexo estuarino da bacia do Pina (CEBP) é formado pelos rios Capibaribe, Tejupió, Jordão e Pina (Figura 5a). A bacia do rio Capibaribe, maior rio do CEBP, possui uma área de 7.500 km² e mais de 1,3 milhões de habitantes (CPRH, 2013). Uma quantidade significativa de efluentes domésticos e industriais sem tratamento lançados no rio Capibaribe fluem em direção ao CEBP. Adicionalmente, existe um constante tráfego de embarcações de pesca e esportivas de pequeno e médio porte no Porto do Recife, localizado na parte final do CEBP. Essa região também possui relevância socioeconômica para a população de baixa renda, como fonte produtora de alimentos para pescadores e catadores de moluscos e crustáceos, que dependem destas atividades como principal fonte de renda (SANTOS et al., 2009; RECIFE, 1995).

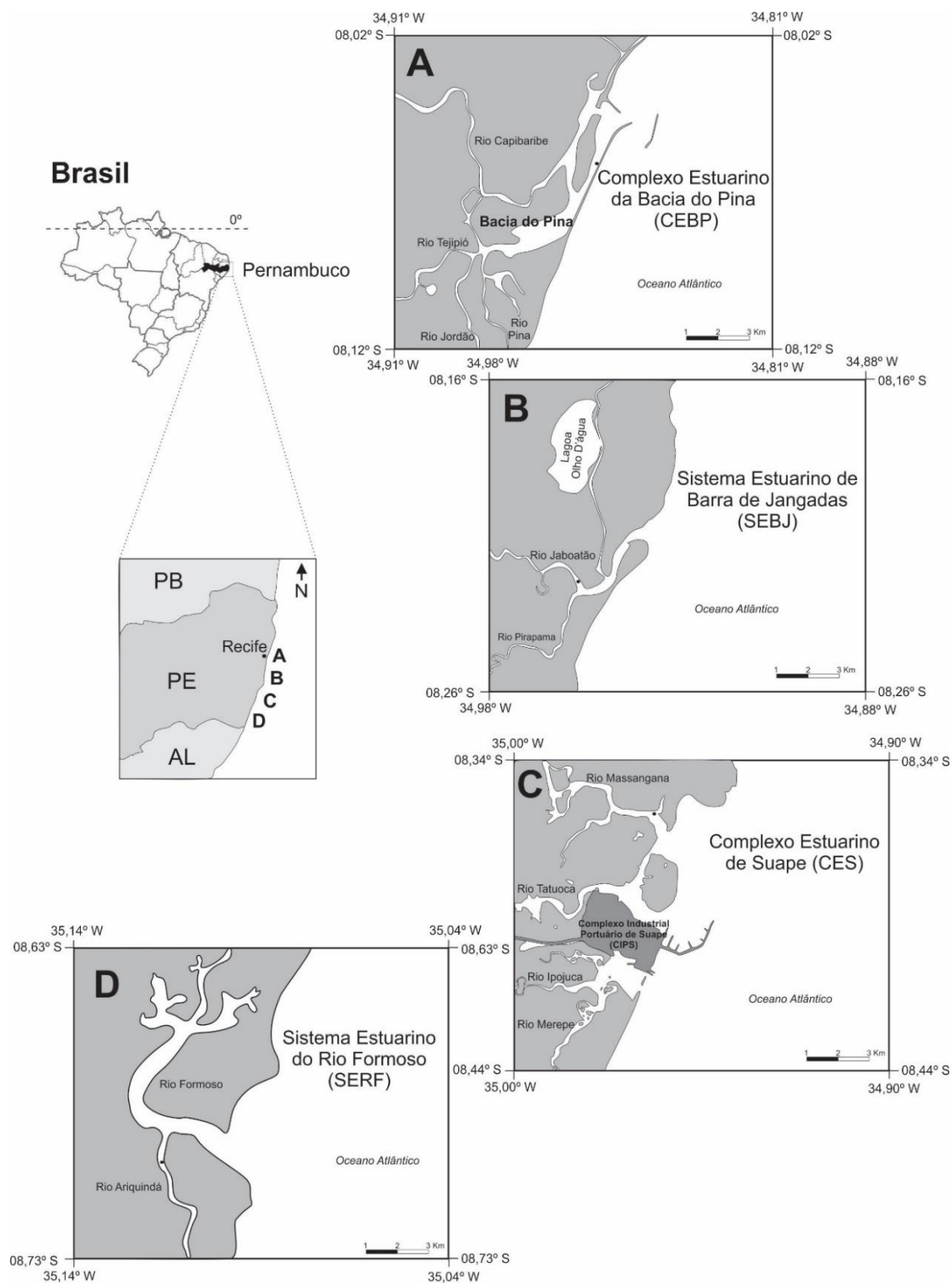
O sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ) recebe as águas dos rios Jaboatão e Pirapama, com áreas de drenagem de 422 e 600 km², respectivamente (CPRH, 2013) (Figura 5b). A água do SEBJ vem dos municípios de Vitória de Santo Antão, Cabo de Santo Agostinho, São Lourenço da Mata, Escada, Ipojuca, Pombos, Moreno, Jaboatão dos Guararapes e Recife. Este sistema estuarino também conta com a presença da lagoa Olho D'água, distante 15 km da praia de Piedade, em Jaboatão, e a Barragem do Pirapama (BRANCO, 2007). Branco (2007) descreve o rio Jaboatão como o segundo mais poluído de Recife. Dentre as causas da poluição estão o lixo urbano, ocupação desordenada nas margens do rio, além do efluente doméstico não tratado de uma população de aproximadamente 1,4 milhões de pessoas (CPRH, 2013), e efluentes provenientes de mais de 100 indústrias ao longo do rio, como a usina de açúcar Bulhões, e a fábrica de papel e celulose Portella (SOUZA e TUNDISI, 2003).

O estuário do Rio Massangana, parte do Complexo Estuarino de Suape (MA-CES), em Ipojuca, se encontra a 40 km ao sul de Recife (LEMOS et al., 2014) (Figura 5c). Este estuário abriga o Complexo Industrial Portuário de Suape (CIPS), apresenta mais de 100 empresas instaladas, incluindo um estaleiro, petroquímicas e distribuidoras de combustível e derivados de petróleo, além de outras 35 em fase de implantação, incluindo uma refinaria de petróleo

(SUAPE, 2015). Lemos et al (2014) mostrou que na maioria dos pontos amostrados no CIPS as concentrações de HPAs equivalentes de criseno na água eram relativamente baixas e inferiores a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de criseno, sugerindo uma influência ainda relativamente pequena das atividades industriais no CIPS. A presença da Refinaria de Abreu e Lima, com previsão de atividade para 2015, além de outras indústrias petroquímicas e grande quantidade de tráfego de navios, representam risco potencial da elevação das concentrações de HPAs neste ecossistema aquático estuarino.

O rio Ariquindá, parte do sistema estuarino do rio Formoso (AR-SERF), em Tamandaré, se encontra mais ao sul em relação aos quatro sistemas estuarinos analisados, a 110 km da capital Recife (LEAL et al., 2015) (Figura 5d). A região costeira e estuarina de Tamandaré está incluída na Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais (APA Costa dos Corais), criada em 1997, e que possui 135 km de extensão, de Tamandaré, em Pernambuco, a Paripueira no norte do estado de Alagoas (LEAL et al., 2015). Pela presença da APA e baixa densidade populacional, 17 mil habitantes permanentes (ARAÚJO E COSTA, 2007), o AR-SERF está incluso numa região de baixo impacto antrópico, como verificado por Grego et al. (2009), analisando a produtividade fitoplanctônica e variáveis ambientais.

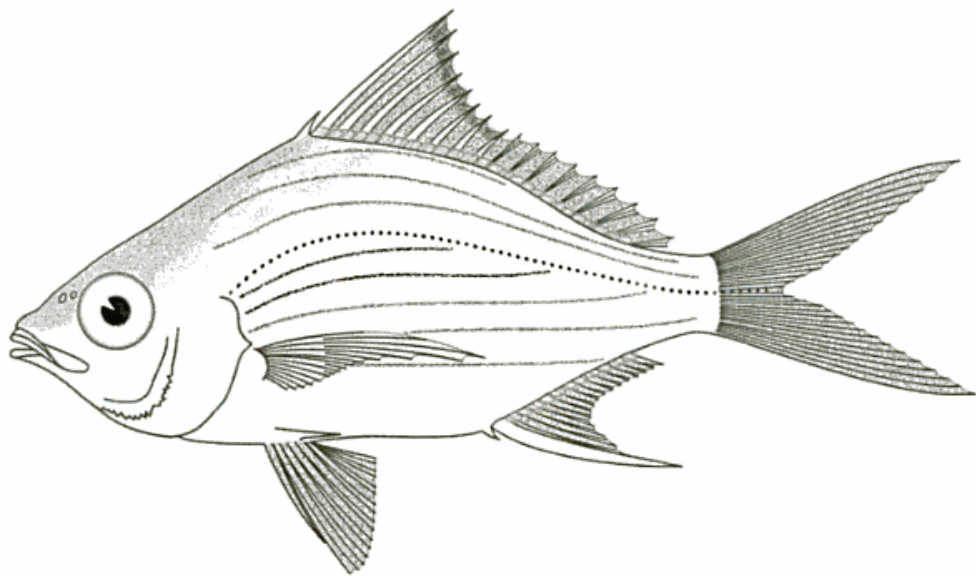
Figura 5. Localização dos pontos de coleta da carapeba *Eugerres brasiliensis* em 4 estuários do litoral sul de Pernambuco: (a) complexo estuarino da bacia do Pina (CEBP), Recife; (b) sistema estuarino de Barra de Jangada (SEBJ), Jaboatão; (c) rio Massangana, no complexo estuarino de Suape (MA-CES), Ipojuca; e (d) rio Ariquindá, sistema estuarino do rio Formoso (AR-SERF), Tamandaré.



2.4. MODELO EXPERIMENTAL: *Eugerres brasilianus*

A carapeba listrada *Eugerres brasilianus* (Cuvier, 1830) é a maior espécie da família Gerreidae, podendo atingir até 40 cm de comprimento (Figura 6). Está presente desde a Carolina do Sul (EUA), passando pelo México, Belize, Costa Rica, e todo litoral brasileiro (Passini et al., 2013). Apresenta grande abundância no litoral brasileiro, sendo um dos peixes com maior abundância em recentes estudos ecológicos em Pernambuco (RAMOS et al., 2012), Bahia (NEVES et al., 2013), Rio de Janeiro (ERLER et al., 2015) e Paraná (CONTENTE et al., 2011).

Figura 6. Vista lateral da espécie *Eugerres brasilianus* (Teleostei, Gerreidae) Araújo et al. (2004).



E. brasilianus possui uma boca protusível utilizada para capturar pequenos organismos (PASSINI et al., 2013). Sua alimentação é composta por 69% de poliquetas como *Nereis sp.* e outros da família Terebellidae, 33% de crustáceos (copépodos e anfípodos), 3,3% de larvas de insetos como *Asterope sp.*, além de bivalves como *Anomalocardia brasiliana*, gastrópodes da família Littorinidae, e algas (GONZÁLEZ-ACOSTA et al., 2007; RAMOS et al. 2014). Há registro de que a *E. brasilianus* é predada por golfinhos das espécies *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* (CREMER et al., 2012).

A espécie *E. brasiliensis* apresenta grande importância ecológica e econômica (ERLER et al., 2015). Foi recentemente incluída entre as espécies que possuem maior potencial para piscicultura no Brasil por ser onívora, se alimentar no substrato e apresentar alta tolerância a salinidade (CALADO et al., 2013; PASSINI et al., 2013). Passini et al. (2013) e Alvarez-Lajonchère et al. (1996) analisaram formas de indução artificial da desova para viabilização do cultivo.

Brigitte Berthet, no livro *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects* (2012) conceitua espécies sentinela como espécies representativas localmente que possam ser utilizadas para refletir a intensidade da sua exposição aos contaminantes presentes no seu habitat, através da avaliação dos efeitos deletérios causados por esta exposição. Estas espécies sentinela idealmente deveriam apresentar características relevantes para viabilizar o seu uso na avaliação de poluição ambiental, como: (a) residência na área estudada; (b) fácil identificação e coleta ao longo do ano; (c) biologia e ecologia bem conhecida; (d) grande abundância populacional; (e) larga distribuição espacial conhecida; e (f) longevidade ao longo de anos e relativa resistência aos contaminantes, para avaliação dos efeitos ao longo de grandes períodos e em situações de maior contaminação. Assim, a espécie *E. brasiliensis* apresenta várias dessas características que evidenciam seu potencial como organismo sentinela para avaliação de efeitos deletérios decorrentes da contaminação química no litoral brasileiro.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o nível de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) pelo método de Fluorescência Fixa na bile, e alterações biológicas através de biomarcadores bioquímicos, em peixes da espécie carapeba *E. brasiliianus* (Teleostei, Gerreidae), coletados nos sistemas estuarinos do litoral sul de Pernambuco do Rio Formoso, de Suape, de Barra de Jangadas e da Bacia do Pina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar variações sazonais e espaciais no nível de contaminação por HPAs na bile, e na resposta de biomarcadores bioquímicos no fígado e cérebro de *E. brasiliianus*, coletados trimestralmente nos sistemas estuarinos do Rio Formoso (Tamandaré-PE) e de Suape (Ipojuca-PE), durante um ano.
- Avaliar variações espaciais no nível de contaminação por HPAs na bile e biomarcadores bioquímicos no fígado e cérebro de *E. brasiliianus*, coletados nos sistemas estuarinos do Rio Formoso (Tamandaré-PE), de Suape (Ipojuca-PE), de Barra de Jangadas (Jaboatão-PE) e da Bacia do Pina (Recife).
- Comparar os resultados obtidos para as diferentes regiões estudadas e elaborar um diagnóstico da poluição por HPAs nestes diferentes estuários.

4. METODOLOGIA

4.1. COLETA DOS PEIXES NOS SISTEMAS ESTUARINOS

Para a abordagem espaço-temporal deste trabalho, peixes da espécie *Eugerres brasiliianus* foram coletados no estuário do Rio Ariquindá, parte do sistema estuarino do Rio Formoso (AR-SERF), em Tamandaré (8°42'26,9"S 35°06'08,8"W) (Figura 5d), e no estuário do Rio Massangana, parte do Complexo Estuarino de Suape (MA-CES), em Ipojuca (8°21'35,2"S 34°58'09,5"W) (Figura 5c). Foram realizadas 4 coletas trimestrais nestes dois sistemas estuarinos, em agosto de 2013, novembro de 2013, março de 2014 e julho/setembro de 2014. Para as últimas coletas, em AR-SERF aconteceu em julho de 2014, enquanto que em MA-CES aconteceu em setembro de 2014, para que o tamanho dos peixes utilizados estivesse padronizado entre 15 e 25 cm. Os peixes foram coletados vivos na maré baixa em currais na porção final de redes de *gamboa* instaladas no dia anterior.

Para a abordagem espacial mais ampla do litoral sul de Pernambuco, peixes da espécie *Eugerres brasiliianus* também foram coletados na porção final do sistema estuarino de Barra de Jangadas (SEBJ), em Jaboatão (8°14'29,4"S 34°56'32,0"W) (Figura 5b) e na área do canal de entrada do porto no complexo estuarino da Baía do Pina (CEBP), em Recife (8°04'24,0"S 34°52'23,9"W) (Figura 5a). As coletas no CEBP foram realizadas em dezembro de 2014 e no SEBJ em abril de 2015, para que o tamanho dos peixes utilizados estivesse padronizado entre 15 e 25 cm, utilizando-se redes tipo tarrafa.

Os indivíduos de *E. brasiliianus* coletados das regiões de Tamandaré, Suape, Pina e Jaboatão apresentaram comprimento padrão de $133,3 \pm 34,9$ mm (média $\pm$ desvio padrão), aparência e coloração externa prateada, equivalente ao padrão natural da espécie, ausência de parasitas visuais, e órgãos internos com coloração normal. Após a coleta, os peixes foram colocados em gelo e transportados para o Laboratório de Ecotoxicologia da UFPE, onde foi realizada a dissecação para a retirada da vesícula biliar, fígado e cérebro. Todos os indivíduos coletados eram imaturos, com as gônadas ainda não bem desenvolvidas, e portanto não foram separados entre machos e fêmeas. As amostras de bile e dos tecidos coletados foram armazenadas em microtubos de 2mL e mantidas em freezer à -80 °C até as análises. O número de indivíduos utilizados nas análises de HPAs biliares em cada coleta variou de 6 a 17

indivíduos. Para as análises bioquímicas enzimáticas foi padronizado um total de 8 réplicas (indivíduos) aleatoriamente para cada enzima em cada coleta.

4.2. HPAs NA BILE

Para obtenção de uma medida da exposição a HPAs ao nível interno dos peixes, foi quantificada a fluorescência biliar pelo método de Fluorescência Fixa (FF) (AAS et al., 2000; LIN et al., 1996), com leitura direta da fluorescência da bile extraída dos peixes após diluição em metanol/água ultrapura (50% v/v) na proporção de 1:500. As amostras foram analisadas em espectrofluorímetro Spectramax M3 (Molecular Devices, EUA) utilizando-se os pares de excitação/emissão de 290/335, 260/380 e 310/360 para naftaleno, fenantreno e criseno, respectivamente (AAS et al., 2000; PATHIRATNE et al., 2010; LEMOS et al., 2014). As quantificações da fluorescência das amostras de bile por FF foram realizadas em placas pretas de 96 poços para fluorescência Fluotrac 200 (Greiner, EUA), pipetando-se 100 µL em cada poço, em duplicata. Para estimar a concentração em equivalentes de cada um destes HPAs presentes nas amostras de bile, foram preparadas curvas analíticas relacionando as concentrações isoladas de naftaleno (Naf), fenantreno (Fen) e criseno (Cris) em metanol/água ultrapura 50% (v/v), e as respectivas unidades relativas de fluorescência (URFs) quantificadas, utilizando-se metanol/água ultrapura 50% como branco. As soluções de HPAs para preparar as curvas analíticas foram feitas com compostos de pureza $\geq 95\%$ da SigmaAldrich, dissolvidos em metanol puro, e posteriormente diluídos em metanol/água ultrapura 50% (v/v). Foram geradas regressões lineares para cada curva analítica entre URFs e concentrações dos HPAs (ANEXO I), listadas abaixo.

1. $URF = 0,19 + 30,11 \text{ Naf}; (R^2 = 0,99)$, com intervalo de concentrações entre 14,6 e 15000 $\mu\text{g.L}^{-1}$;
2. $URF = 2,10 + 0,53 \text{ Fen}; (R^2 = 0,99)$, com intervalo de concentrações entre 1,9 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$;
3. $URF = 5,33 + 0,43 \text{ Cris}; (R^2 = 0,99)$, com intervalo de concentrações entre 1,9 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Após cálculo da concentração em equivalentes dos HPAs, amostras com valores negativos de concentração foram consideradas com concentração igual a 0 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

4.3.BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

As amostras de tecido do fígado e do cérebro dos peixes coletados foram homogeneizadas numa diluição 1:5 (m/v) em solução tampão fosfato com pH 7,4 utilizando-se o homogeneizador de tecidos para microtubos *Tissue Master 125*, da Omni International. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos à 9.000 g à 4°C, e o sobrenadante foi armazenado a -80 °C até as análises. Os ensaios de cinética enzimática foram realizados utilizando-se microplacas adequadas a cada tipo de ensaio no leitor de microplacas Spectramax M3 (Molecular Devices, EUA).

4.3.1. Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada em amostras do fígado pelo método adaptado para microplaca de Habig et al. (1974), a partir da conjugação de GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), produzindo um composto que pode ser detectado a 340nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O ensaio enzimático de 3 minutos foi realizado à 25 °C em KPi 100 mM, pH 7,4 contendo GSH 1 mM, tendo como substrato iniciador o CDNB 1 mM. Os resultados foram expressos em nmol de CNDB.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

4.3.2. Glutathione Redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada em amostras do fígado pelo método adaptado para microplaca de Carlberg e Mannervik (1981), a partir do consumo do NADPH, que foi detectado a 340nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O ensaio enzimático de 3 minutos foi realizado à 25 °C em KPi 100 mM, 0,1 mM de EDTA, pH 7,5 e 0,1 mM de NADPH, tendo como substrato iniciador o GSSG a 1 mM. Os resultados foram expressos em nmol de NADPH.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

4.3.3. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada em amostras do fígado pelo método de Beers e Sizer (1952) adaptado para microplaca por Li e Schelhorn (2007), a partir da decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em H₂O e O₂ pela ação da catalase. Esta reação foi detectada a 240nm ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática é proporcional a velocidade de decomposição do H₂O₂. O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado à 25 °C em KPi 0,05

mM, pH 7,4, contendo 5 mM de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

4.3.4. Etoxiresorufina orto-deetilase (EROD)

A atividade da EROD foi determinada em amostras do fígado pelo método de Burke e Mayer (1974), adaptado para microplaca. O método é baseado na detecção fluorimétrica da resorufina, produzida a partir da etoxiresorufina pela enzima P450 CYP1A presente nas amostras de fígado. Esta reação foi monitorada fluorimetricamente por 5 min, utilizando-se o par de comprimentos de onda de excitação/emissão de 530/590nm, e a quantidade de resorufina formada foi estimada a partir de uma curva analítica relacionando fluorescência e concentração de resorufina em pmol nos poços da microplaca preta Fluotrac 200 (Greiner, EUA) utilizada nos ensaios. A atividade enzimática é proporcional a velocidade de produção de resorufina. O ensaio de 5 min é realizado à 25°C, KPI 100mM, 133,6 μM de NADPH e 2 μM de Etoxiresorufina, no pH de 7,4. Os resultados foram expressos em pmol de resorufina. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

4.3.5. Acetilcolinesterase

A atividade da Acetilcolinesterase foi determinada em amostras do cérebro pelo método adaptado para microplaca de Ellman et al. (1961), a partir da hidrólise do iodeto de acetilcolina (AChI) em acetato e tiocolina. O grupo tiol reage com o DTNB, formando o ⁻TNB que é detectado à 412nm ($\epsilon = 14.150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O ensaio enzimático de 2 minutos foi realizado à 25 °C em KPi 100 mM, 0,5 mM de DTNB, pH 7,4 e 1,5 mM de AChI. Os resultados foram expressos em nmol de ⁻TNB. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹. Como a análise da acetilcolinesterase é um biomarcador de pesticidas anticolinesterásicos, este ensaio foi realizado para verificar se há interferência de outros contaminantes além dos HPAs, como pesticidas, nos ensaios enzimáticos.

4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises espaço-temporais dos dados relativos ao rio Ariquindá em Tamandaré (AR-SERF) e ao rio Massangana em Suape (MA-CES), foram comparadas as 4 amostragens trimestrais de AR-SERF e MA-CES por ANOVA de 2 vias considerando como fatores o local e os meses amostrados. Para a ANOVA de 2 vias, quando foram detectadas diferenças

significativas, foi utilizado o teste *a posteriori* de Holm-Sidak para identificar diferenças entre os locais e os meses analisados. Para as análises espaciais comparando-se os quatro sistemas estuarinos amostrados (AR-SERF, MA-CES, SEBJ e CEBP), foi utilizada ANOVA de 1 via. A normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foi avaliada com os métodos de Kolmogorov–Smirnov e teste de medianas de Levene, respectivamente. Quando não foi observada a normalidade ou heterogeneidade de variâncias, para a ANOVA de 1 via foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste *a posteriori* de Dunn para identificação de diferenças significativas. Todas as análises foram realizadas pelo *software* SigmaPlot® Versão 11 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany).

5. RESULTADOS

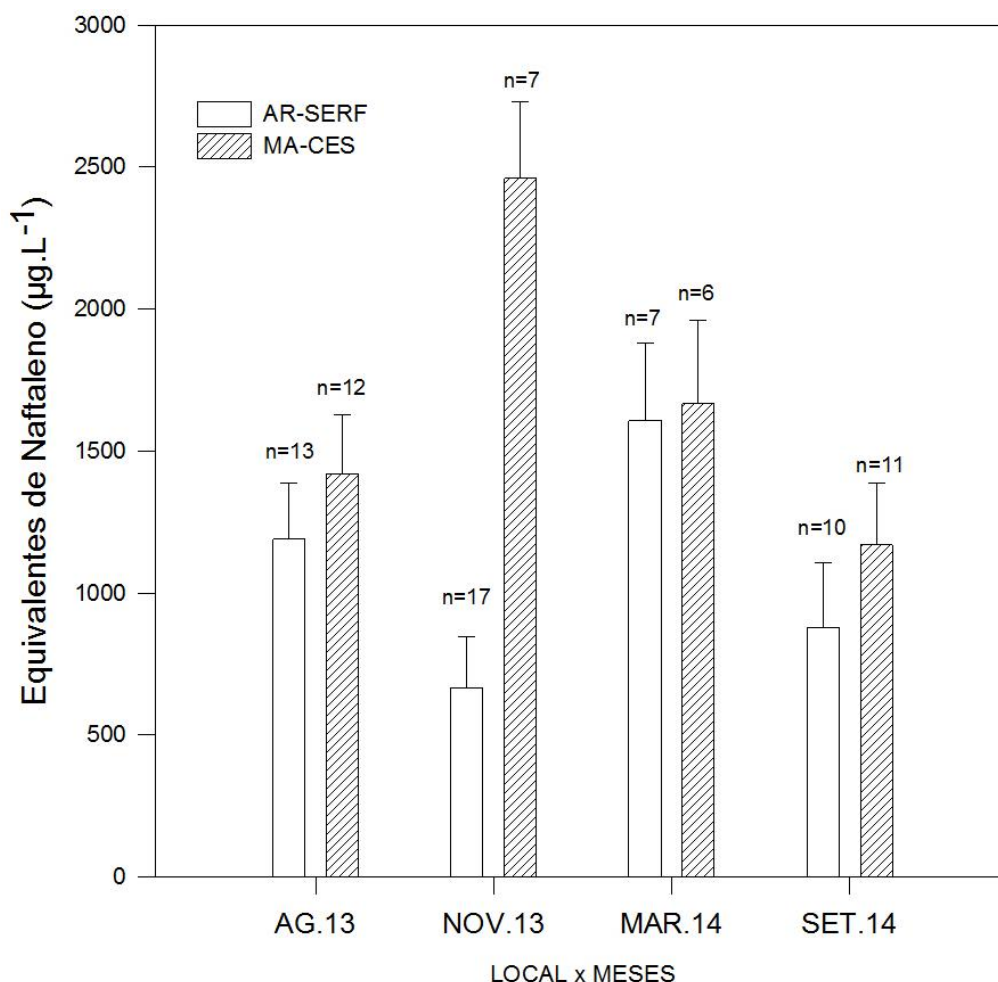
5.1. ABORDAGEM ESPAÇO-TEMPORAL NO SERF E CES

5.1.1. HPAs NA BILE

A análise por FF dos HPAs presentes na bile dos peixes coletados nas regiões do Rio Ariquindá (AR-SERF) e do Rio Massangana (MA-CES) indicou a presença dos HPAs naftaleno, fenantreno e criseno em ambos sistemas estuarinos.

As concentrações de HPAs na bile em equivalentes de naftaleno (Naf_{bile}) foram submetidas a uma análise de variância de 2 fatores, e foram detectados efeitos significativos para o efeito principal local ($F_{1,74} = 12,6$), $p < 0,001$. Também foram detectados efeitos significativos para o efeito principal meses ($F_{3,74} = 2,7$), $p = 0,049$; e para interações entre local e meses ($F_{3,74} = 5,9$), $p < 0,001$. Desta forma, a análise das interações local e meses de amostragem evidenciaram maior Naf_{bile} (Holm-Sidak, $p < 0,05$) no rio Massangana em Suape (MA-CES) em comparação com o rio Ariquindá (AR-SERF) na 2ª amostragem, em novembro de 2013 (Figura 7). Comparando-se cada local amostrado ao longo dos meses, no rio Ariquindá (AR-SERF) Naf_{bile} foi significativamente maior no mês de março 2014 comparado com novembro 2013 (Holm-Sidak, $p < 0,05$). Adicionalmente, no rio Massangana (MA-CES) Naf_{bile} foi maior em novembro 2013 do que em agosto de 2013 e setembro 2014 (Holm-Sidak, $p < 0,05$) (Figura 7).

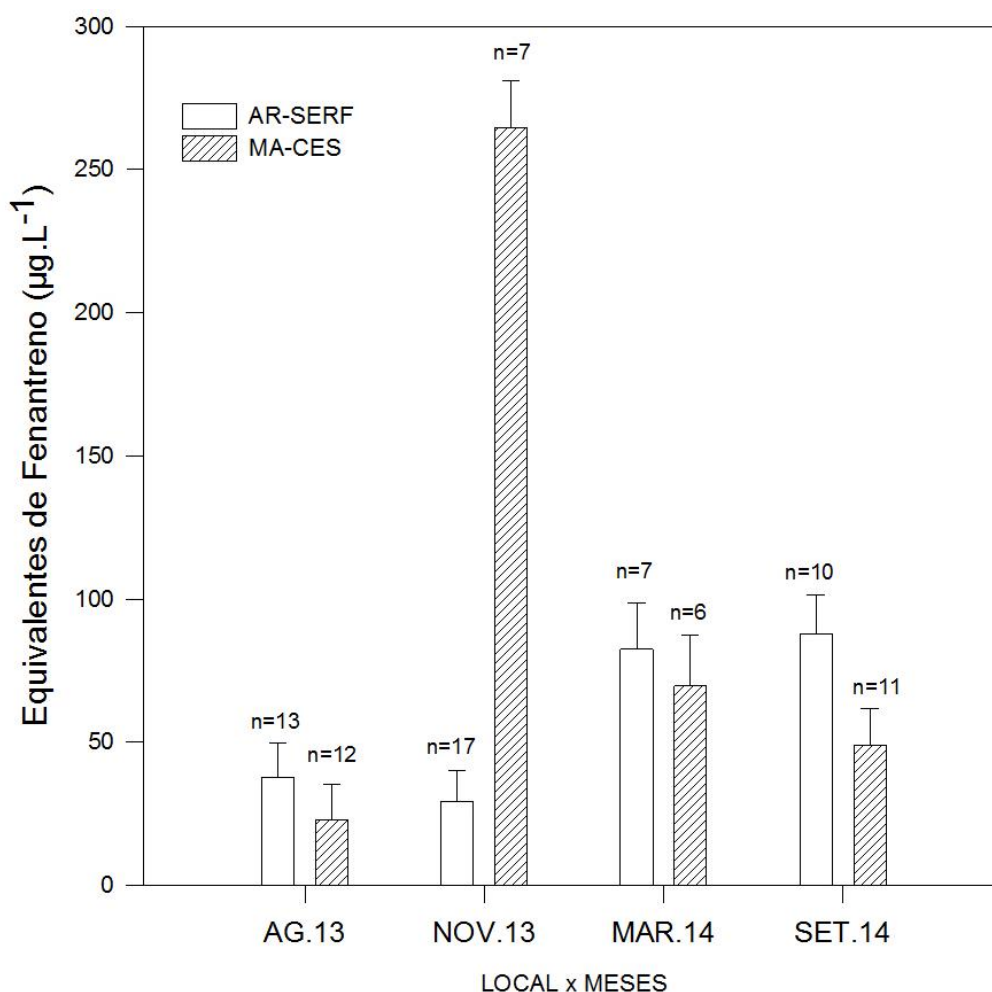
Figura 7. Concentração em equivalentes de Naftaleno (média $\pm$ desvio padrão), em $\mu\text{g.L}^{-1}$, obtidas nas biles diluídas 1:500 de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados trimestralmente nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF) e no rio Massangana em Suape (MA-CES), Pernambuco.



As concentrações de HPAs na bile em equivalentes de fenantreno (Fen_{bile}) foram submetidas a uma análise de variância de 2 fatores, e foram detectados efeitos significativos para o efeito principal local ($F_{1,74} = 27,0$), $p < 0,001$. Também foram detectados efeitos significativos para o efeito principal meses ($F_{3,74} = 17,5$), $p < 0,001$; e para interações entre local e meses ($F_{3,74} = 43,9$), $p < 0,001$. Desta forma, a análise das interações local e meses de amostragem evidenciaram maior Fen_{bile} (Holm-Sidak, $p < 0,05$) no rio Massangana em Suape (MA-CES) em comparação com o rio Ariquindá (AR-SERF) na 2ª amostragem, em novembro de 2013. Entretanto, em setembro de 2014 foi detectada maior Fen_{bile} no rio Ariquindá comparada com o rio Massangana (Holm-Sidak, $p < 0,05$) (Figura 8). Comparando-se cada local amostrado ao longo dos meses, no rio Ariquindá (AR-SERF) Fen_{bile} foi significativamente

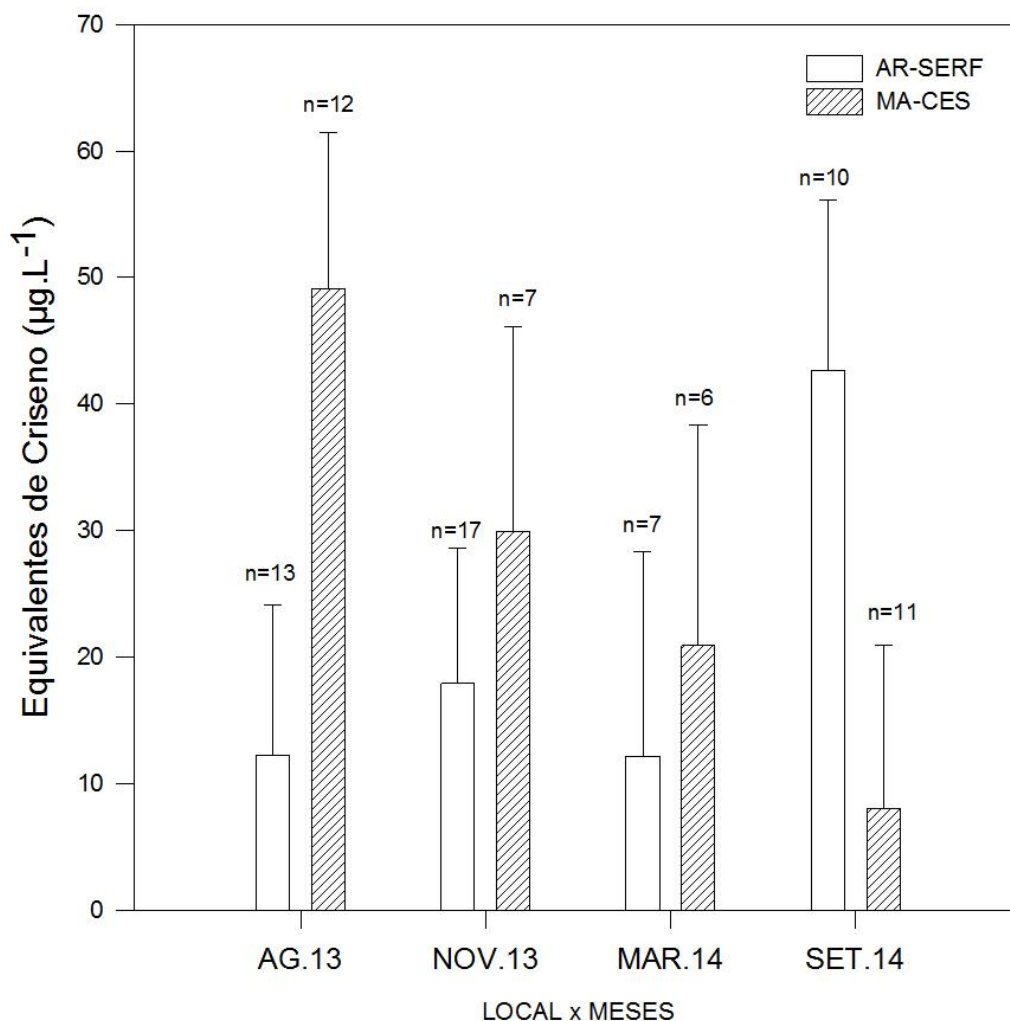
maior no mês de setembro 2014 comparado com agosto e novembro 2013 (Holm-Sidak, $p < 0,05$). Adicionalmente, no rio Massangana (MA-CES) Fen_{bile} foi maior em novembro 2013 comparado com agosto de 2013 e março e setembro 2014 (Holm-Sidak, $p < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8. Concentração em equivalente de Fenantreno (média $\pm$ desvio padrão), em $\mu g.L^{-1}$ obtidas nas biles diluídas 1:500 de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados trimestralmente nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF) e no rio Massangana em Suape (MA-CES), Pernambuco.



As concentrações de HPAs na bile em equivalentes de criseno ($Cris_{bile}$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para os efeitos principais local ($F_{1,74} = 0,3$), $p = 0,589$; meses ($F_{3,74} = 0,8$), $p = 0,807$; e nem para interações entre os fatores ($F_{3,74} = 2,6$), $p = 0,055$ (Figura 9).

Figura 9. Concentração em equivalente de Criseno (média $\pm$ desvio padrão), em $\mu\text{g.L}^{-1}$, obtidas nas biles diluídas 1:500 de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados trimestralmente nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF) e no rio Massangana em Suape (MA-CES), Pernambuco.



5.1.2. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

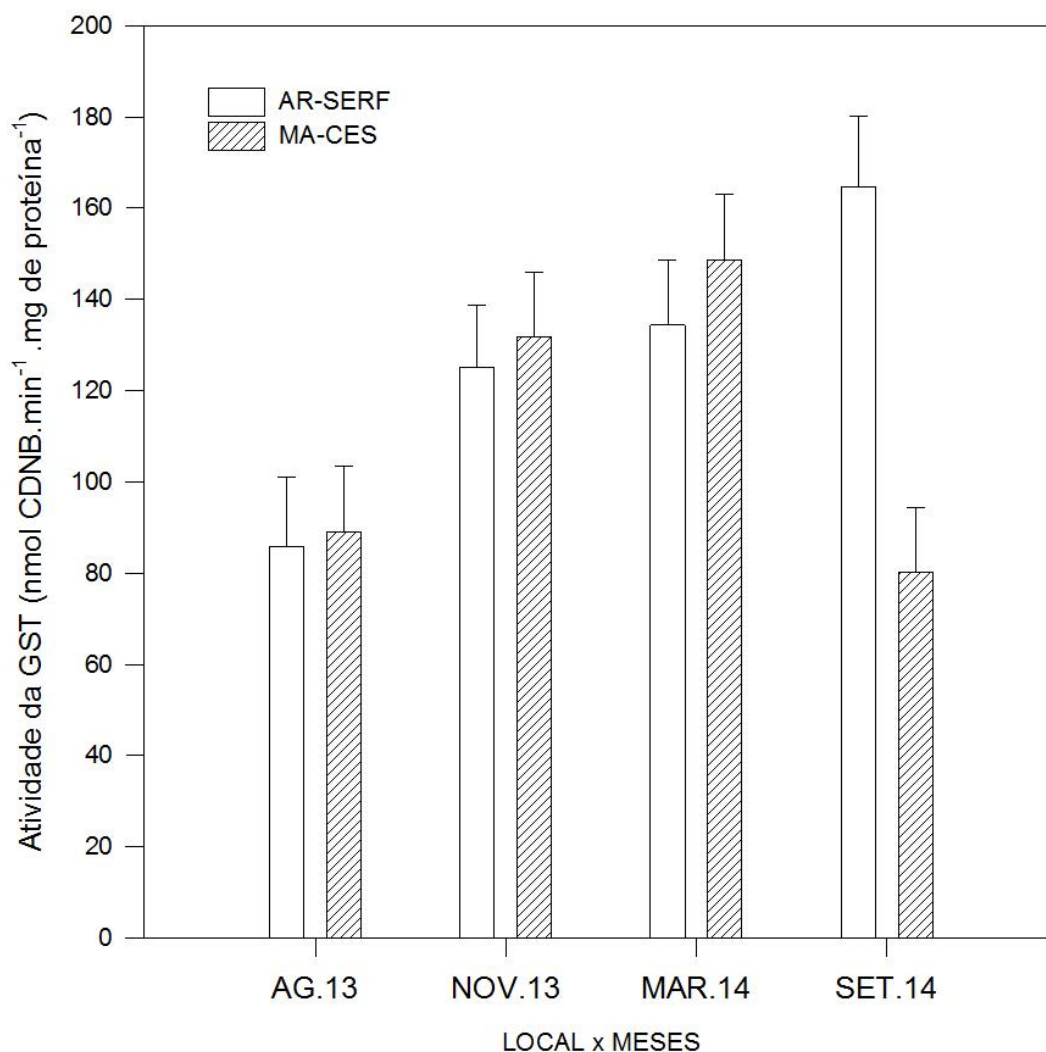
Para as enzimas GST, EROD e Catalase foi possível observar no rio Ariquindá (AR-SERF) um aumento em relação a Suape em setembro 2014. Para o rio Ariquindá (AR-SERF) observou-se uma tendência de aumento das atividades enzimáticas ao longo das 4 amostragens, enquanto que em Suape ocorreu um aumento nas atividades enzimáticas da GST, EROD e

Catalase nas primeiras amostragens seguido de um decréscimo na última amostragem, em setembro 2014.

5.1.2.1. Glutathione S-Transferase

As cinéticas enzimáticas da GST foram submetidas a uma análise de variância de 2 fatores, e não foram detectados efeitos significativos para o efeito principal local ($F_{1,55} = 2,6$), $p = 0,110$. Entretanto, foram detectados efeitos significativos para o efeito principal meses ($F_{3,55} = 5,6$), $p = 0,002$; e para interações entre local e meses ($F_{3,55} = 5,0$), $p = 0,004$. Desta forma, a análise das interações local e meses de amostragem evidenciaram maior atividade da GST (Holm-Sidak, $p < 0,05$) no rio Ariquindá (AR-SERF) em comparação com o rio Massangana em Suape (MA-CES) na 4ª amostragem, em setembro de 2014 (Figura 10). Comparando-se cada local amostrado ao longo dos meses, no rio Ariquindá (AR-SERF) a GST foi significativamente maior no mês de setembro 2014 comparado com agosto 2013 (Holm-Sidak, $p < 0,05$). Adicionalmente, a GST no rio Massangana (MA-CES) foi maior em março 2014 comparado com agosto de 2013 e setembro 2014; e novembro 2013 foi maior que setembro 2014 (Holm-Sidak, $p < 0,05$).

Figura 10. Atividade da Glutathiona S-Transferase (GST) (média $\pm$ desvio padrão), em nmol de CNDB.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, em fígado de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* (n=8) coletados trimestralmente nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF) e no rio Massangana em Suape (MA-CES), Pernambuco.

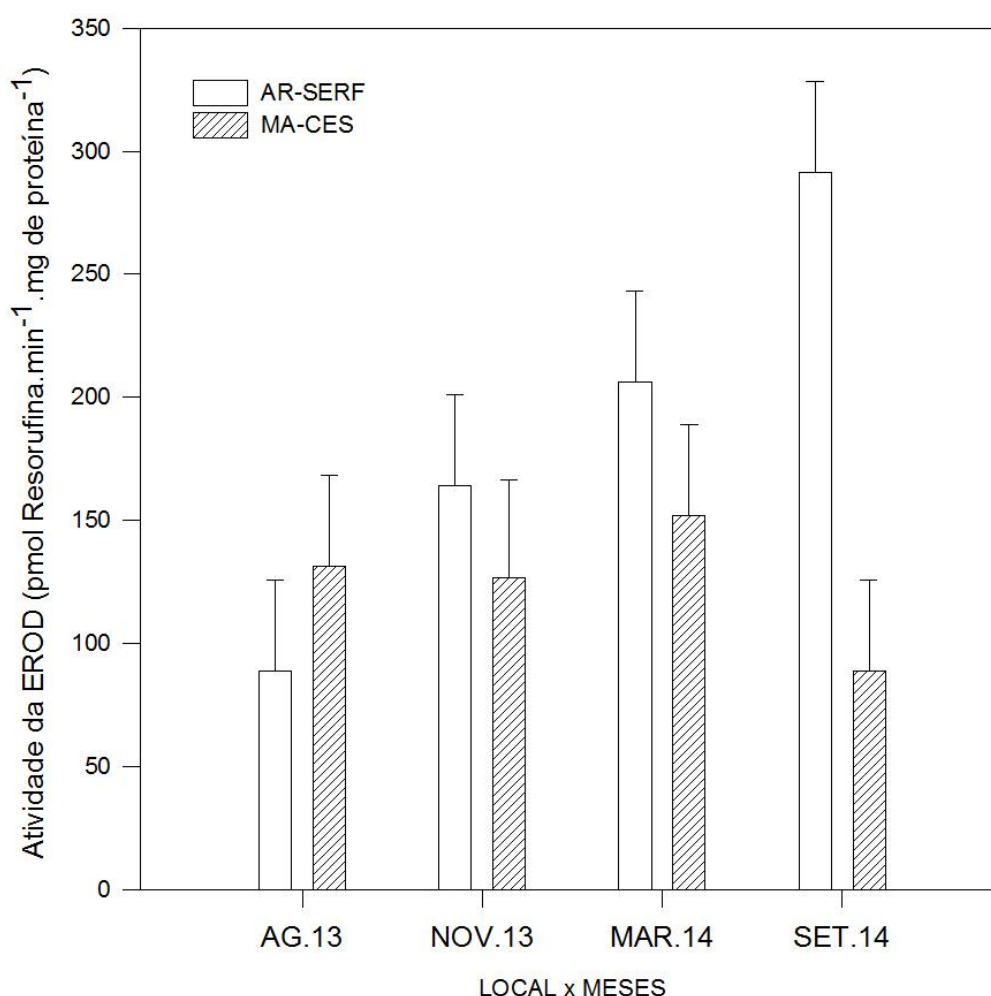


5.1.2.2. EROD

As cinéticas enzimáticas da EROD foram submetidas a uma análise de variância de 2 fatores, e não foram detectados efeitos significativos para o efeito principal meses ($F_{3,55} = 1,9$), $p = 0,140$. Entretanto, foram detectados efeitos significativos para o efeito principal local ($F_{1,55} = 5,6$), $p = 0,021$; e para interações entre local e meses ($F_{3,55} = 3,8$), $p = 0,015$. Desta forma, a análise das interações local e meses de amostragem evidenciaram maior atividade da EROD

(Holm-Sidak, $p < 0,05$) no rio Ariquindá (AR-SERF) em comparação com o rio Massangana em Suape (MA-CES) na 4ª amostragem, em setembro de 2014 (Figura 11). Comparando-se cada local amostrado ao longo dos meses, no rio Ariquindá (AR-SERF) a EROD foi significativamente maior no mês de setembro 2014 comparado com agosto 2013 (Holm-Sidak, $p < 0,05$). No rio Massangana (MA-CES) não foi possível observar diferenças significativas ao longo dos meses (Holm-Sidak, $p < 0,05$).

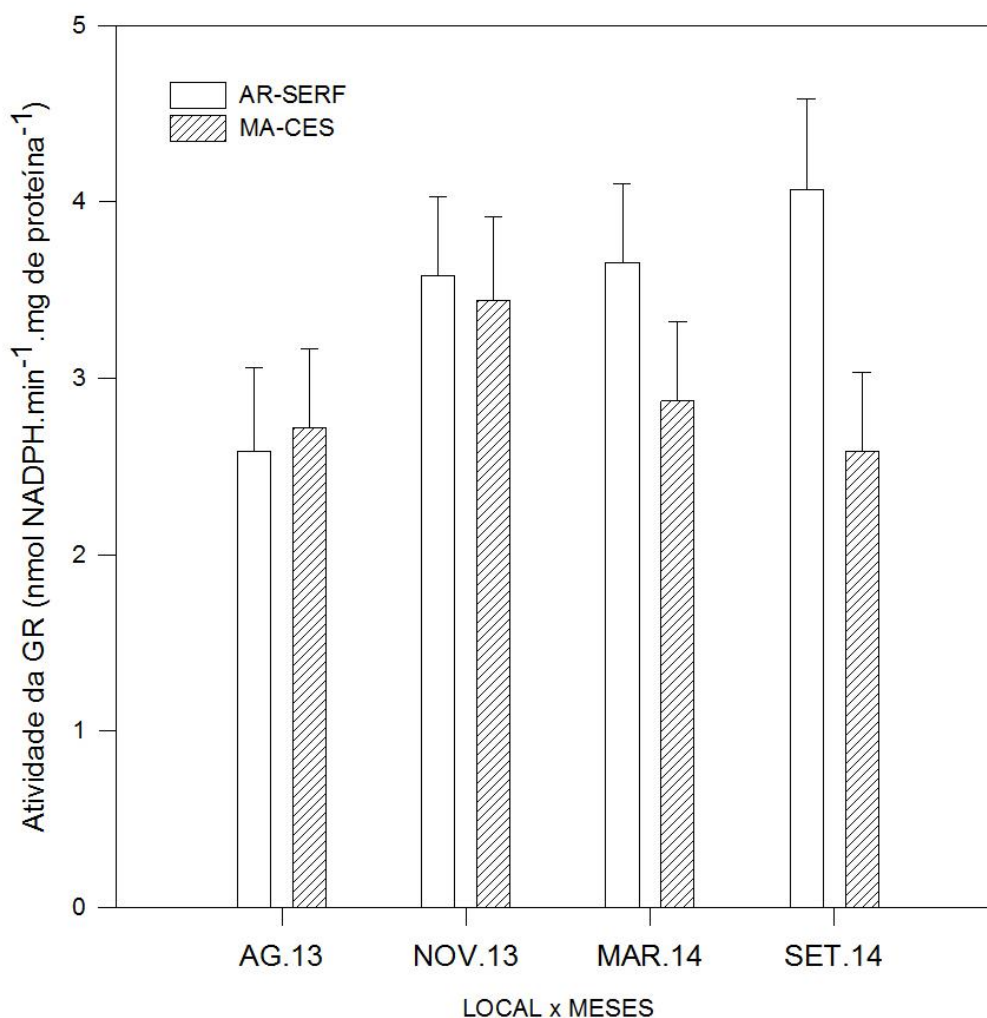
Figura 11. Atividade da EROD (média $\pm$ desvio padrão), em pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, em fígado de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* (n=8) coletados trimestralmente nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF) e no rio Massangana em Suape (MA-CES), Pernambuco.



5.1.2.3. Glutationa Redutase

As cinéticas enzimáticas da GR foram submetidas a uma análise de variância de 2 fatores, e não foram detectados efeitos significativos para o efeito principal local ($F_{1,55} = 3,0$), $p = 0,089$; para o efeito principal meses ($F_{3,55} = 1,2$), $p = 0,289$; e nem para interações entre local e meses ($F_{3,55} = 1,1$), $p = 0,332$ (Figura 12).

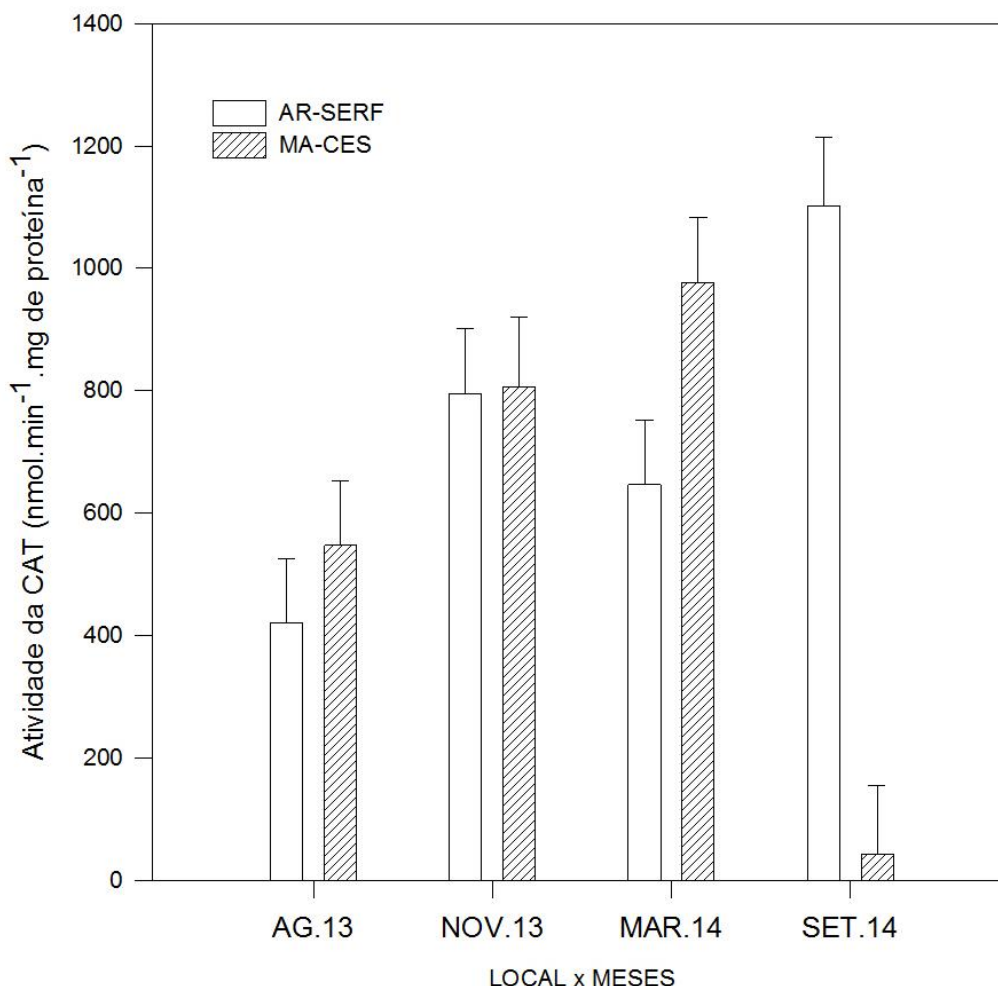
Figura 12. Atividade da Glutationa Redutase (GR) (média $\pm$ desvio padrão), em nmol de NADPH.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, em fígado de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* (n=8) coletados trimestralmente nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF) e no rio Massangana em Suape (MA-CES), Pernambuco.



5.1.2.4. Catalase

As cinéticas enzimáticas da CAT foram submetidas a uma análise de variância de 2 fatores, e não foram detectados efeitos significativos para o efeito principal local ($F_{1,55} = 3,7$), $p = 0,058$. Entretanto, foram detectados efeitos significativos para o efeito principal meses ($F_{3,55} = 4,7$), $p = 0,005$; e para interações entre local e meses ($F_{3,55} = 15,8$), $p < 0,001$ (Figura 13). Desta forma, a análise das interações local e meses de amostragem evidenciaram maior atividade da CAT (Holm-Sidak, $p < 0,05$) no rio Massangana em Suape (MA-CES) em comparação com o rio Ariquindá (AR-SERF), em março de 2014. Em setembro de 2014, ocorreu uma inversão, em que o rio Ariquindá (AR-SERF) tem maior atividade da CAT em comparação com o rio Massangana em Suape (MA-CES). Comparando-se cada local amostrado ao longo dos meses, a CAT foi significativamente maior no rio Ariquindá (AR-SERF) no mês de setembro 2014 comparado com agosto 2013 e março de 2014 (Holm-Sidak, $p < 0,05$). Adicionalmente, a CAT no rio Massangana (MA-CES) foi menor em setembro 2014 comparado com agosto e novembro de 2013 e setembro 2014; e março 2014 maior que agosto 2013 (Holm-Sidak, $p < 0,05$).

Figura 13. Atividade da Catalase (CAT) (média $\pm$ desvio padrão), em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$, em fígado de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* (n=8) coletados trimestralmente nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF) e no rio Massangana em Suape (MA-CES), Pernambuco.

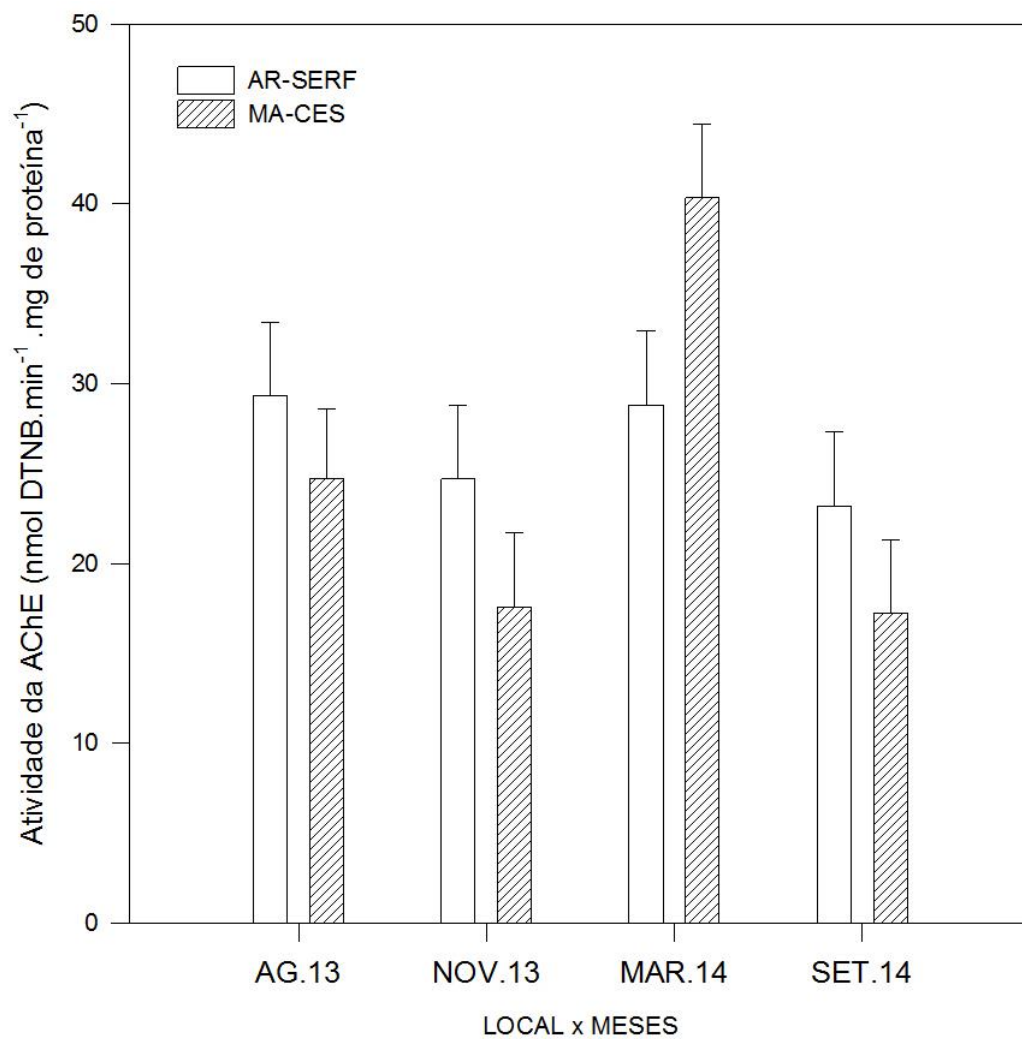


5.1.2.5. Acetilcolinesterase

As cinéticas enzimáticas da acetilcolinesterase (AChE) cerebral foram submetidas a uma análise de variância de 2 fatores, e não foram detectados efeitos significativos para o efeito principal local ($F_{1,74} = 0,2$), $p = 0,594$; e nem para interações entre local e meses ($F_{3,74} = 2,2$), $p = 0,089$ (Figura 14). Entretanto, foram detectados efeitos significativos para o efeito principal meses ($F_{3,74} = 5,1$), $p = 0,003$. Comparando-se cada local amostrado ao longo dos meses, a AChE foi significativamente maior no rio Massangana (MA-CES) no mês de março 2014 comparado com agosto e novembro 2013 e setembro de 2014 (Holm-Sidak, $p < 0,05$). No rio

Ariquindá (AR-SERF) não foi possível observar diferenças significativas ao longo dos meses (Holm-Sidak, $p < 0,05$).

Figura 14. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) (média $\pm$ desvio padrão), nmol de $\text{TNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, em cérebro de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* ($n=8$) coletados trimestralmente nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF) e no rio Massangana em Suape (MA-CES), Pernambuco.



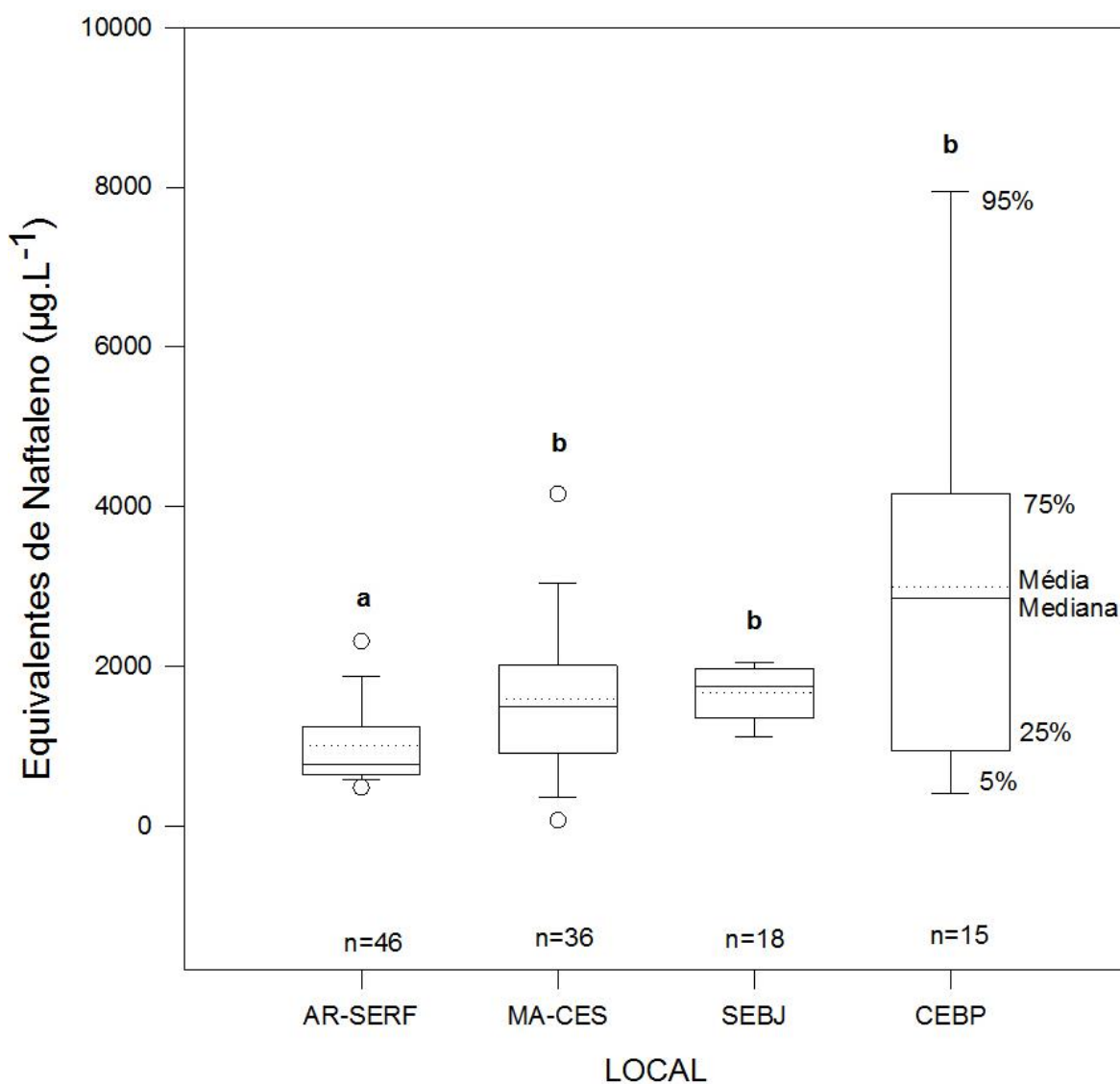
5.2. ABORDAGEM ESPACIAL: SERF, CES, SEBJ E CEBP

5.2.1. HPAs NA BILE

A análise por FF dos HPAs presentes na bile dos peixes coletados no rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP) indicou a presença dos HPAs naftaleno, fenantreno e criseno em todos os sistemas estuarinos. Os resultados indicaram maiores concentrações destes HPAs nas regiões do SEBJ e CEBP.

As concentrações em equivalentes de naftaleno encontrados na bile (Naf_{bile}) foram submetidas a uma análise de variância de 1 fator e verificou-se diferenças significativas entre os sistemas estuarinos (K-W, $H_3 = 24,3$, $p < 0,001$). As médias de Naf_{bile} foram iguais a $1003 \mu g.L^{-1}$, $1586 \mu g.L^{-1}$, $1670 \mu g.L^{-1}$ e $3001 \mu g.L^{-1}$ para o rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), respectivamente. As concentrações em Naf_{bile} no rio Ariquindá (AR-SERF) são significativamente menores que em todas as outras regiões (Dunn, $p < 0,05$) (Figura 15).

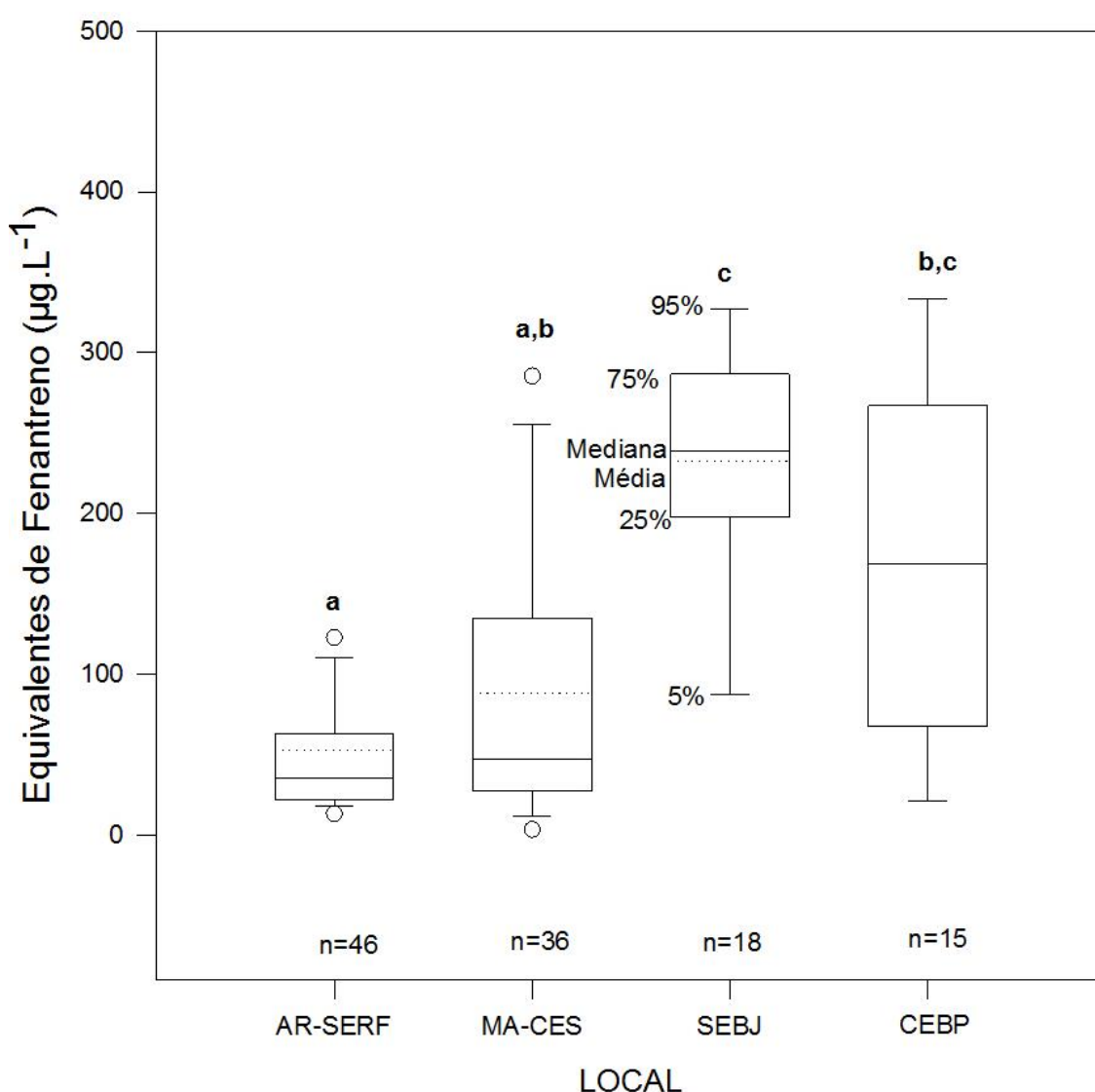
Figura 15. Concentração em equivalentes de Naftaleno (média, mediana e quartis), em $\mu\text{g.L}^{-1}$, obtidas nas bile diluídas 1:500 de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), Pernambuco. Letras diferentes representam diferenças significativas (Dunn, $p < 0,05$).



As concentrações em equivalentes de fenantreno encontrados na bile (Fen_{bile}) foram submetidas a uma análise de variância de 1 fator e verificou-se diferenças significativas entre os sistemas estuarinos (K-W, $H_3 = 37,4$; $p < 0,001$). As médias de Fen_{bile} foram iguais a $59 \mu\text{g.L}^{-1}$, $101 \mu\text{g.L}^{-1}$, $232 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $168 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), respectivamente. Fen_{bile} no rio Ariquindá (AR-SERF) foi significativamente menor comparado ao rio Jaboatão (SEBJ) e a

bacia do Pina (CEBP); Dunn, $p < 0,05$) (Figura 16). Observou-se também que o rio Jaboatão (SEBJ) possui concentrações maiores de Fen_{bile} em comparação ao rio Massangana em Suape (MA-CES) (Dunn, $p < 0,05$).

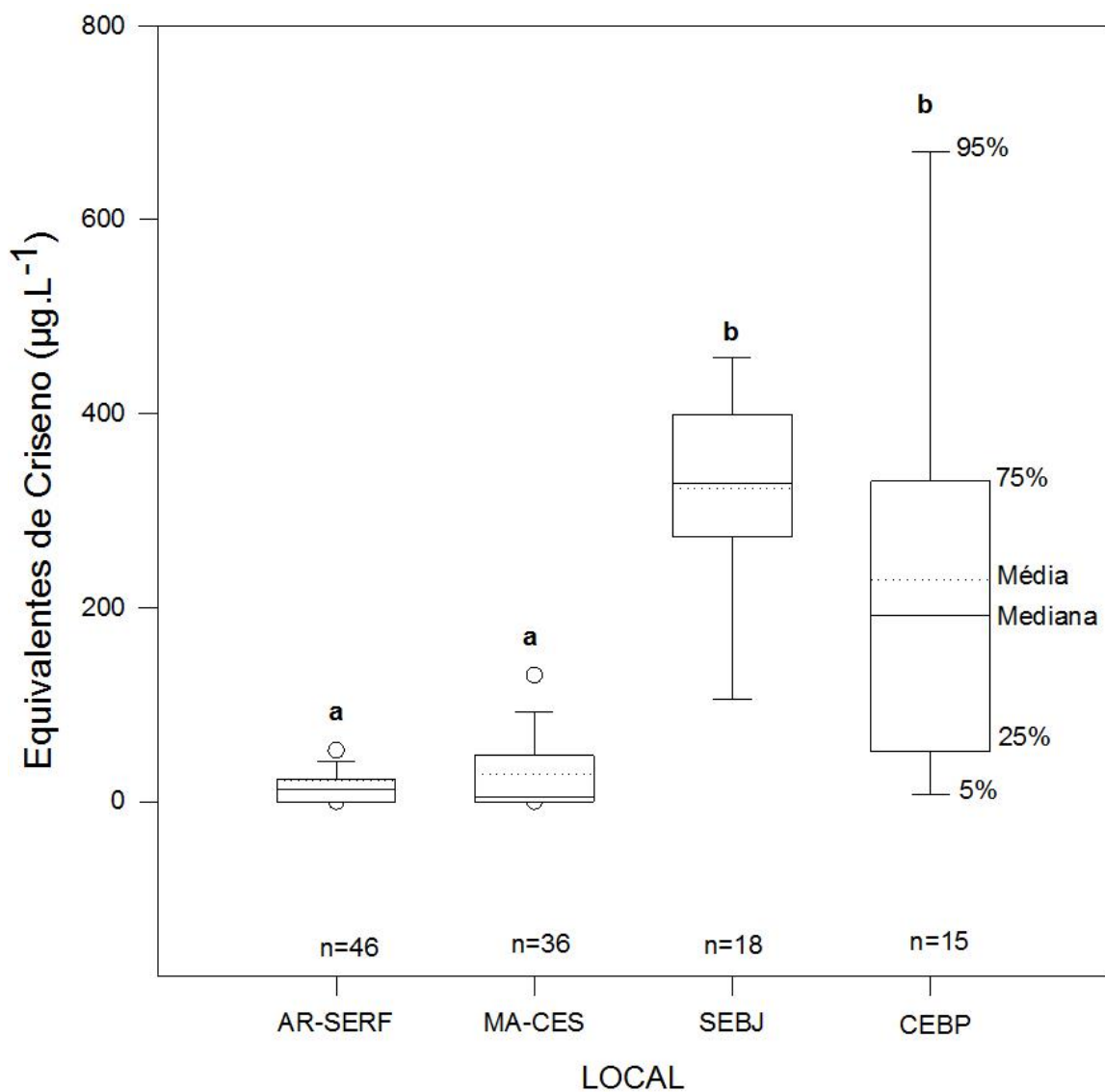
Figura 16. Concentração em equivalente de Fenantreno (média, mediana e quartis), em $\mu\text{g.L}^{-1}$, obtidas nas bile diluídas 1:500 de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), Pernambuco. Letras diferentes representam diferenças significativas (Dunn, $p < 0,05$).



As concentrações em equivalentes de criseno encontrados na bile (Cris_{bile}) foram submetidas a uma análise de variância de 1 fator e verificou-se diferenças significativas entre os sistemas estuarinos (K-W, $H_3 = 55,9$; $p < 0,001$). As médias de Cris_{bile} foram iguais a 17

$\mu\text{g.L}^{-1}$, $15 \mu\text{g.L}^{-1}$, $323 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $227 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), respectivamente. Crisbile nos rios Ariquindá (AR-SERF) e Massangana (MA-CES) foi menor significativamente do que no rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP) (Dunn, $p < 0,05$) (Figura 17).

Figura 17. Concentração em equivalente de Criseno (média, mediana e quartis), em $\mu\text{g.L}^{-1}$, obtidas nas biles diluídas 1:500 de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), Pernambuco. Letras diferentes representam diferenças significativas (Dunn, $p < 0,05$).



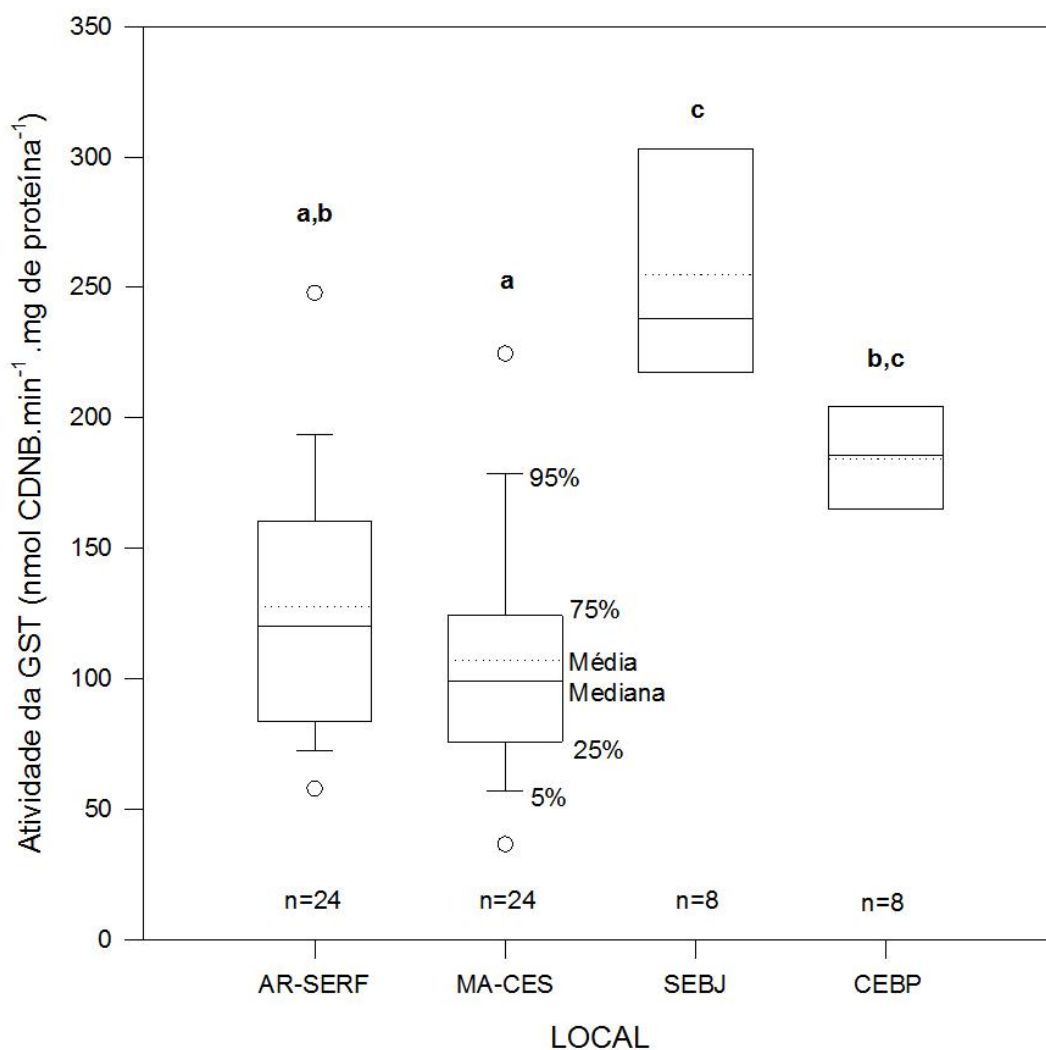
5.2.2. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

As atividades enzimáticas da GST, EROD e CAT dos peixes do rio Jaboatão (SEBJ) e da bacia do Pina (CEBP) foram significativamente maiores em comparação ao rio Ariquindá (AR-SERF) e rio Massangana em Suape (MA-CES). A atividade da GR foi maior no rio Jaboatão (SEBJ), e não foram observadas diferenças entre as regiões na atividade da AChE.

5.2.2.1. Glutathione S-Transferase

As cinéticas enzimáticas da GST foram submetidas a uma análise de variância de 1 fator e verificou-se que peixes do rio Jaboatão (SEBJ) apresentaram a maior atividade da GST em comparação as outras regiões, com média de 254,89 nmol de CNDB.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (K-W, $H_3 = 30,0$; $p < 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) (Figura 18). A GST foi induzida aproximadamente 1,7 x na bacia do Pina (CEBP) e 2,3 x no rio Jaboatão (SEBJ) em comparação com o rio Massangana em Suape (MA-CES) (Dunn, $p < 0,05$), onde foram verificadas as menores atividades, juntamente com o rio Ariquindá (AR-SERF).

Figura 18. Atividade da Glutathione S-Transferase (GST) (média, mediana e quartis), em nmol de CNDB.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, em fígado de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), Pernambuco. Letras diferentes representam diferenças significativas (Dunn, $p < 0,05$).

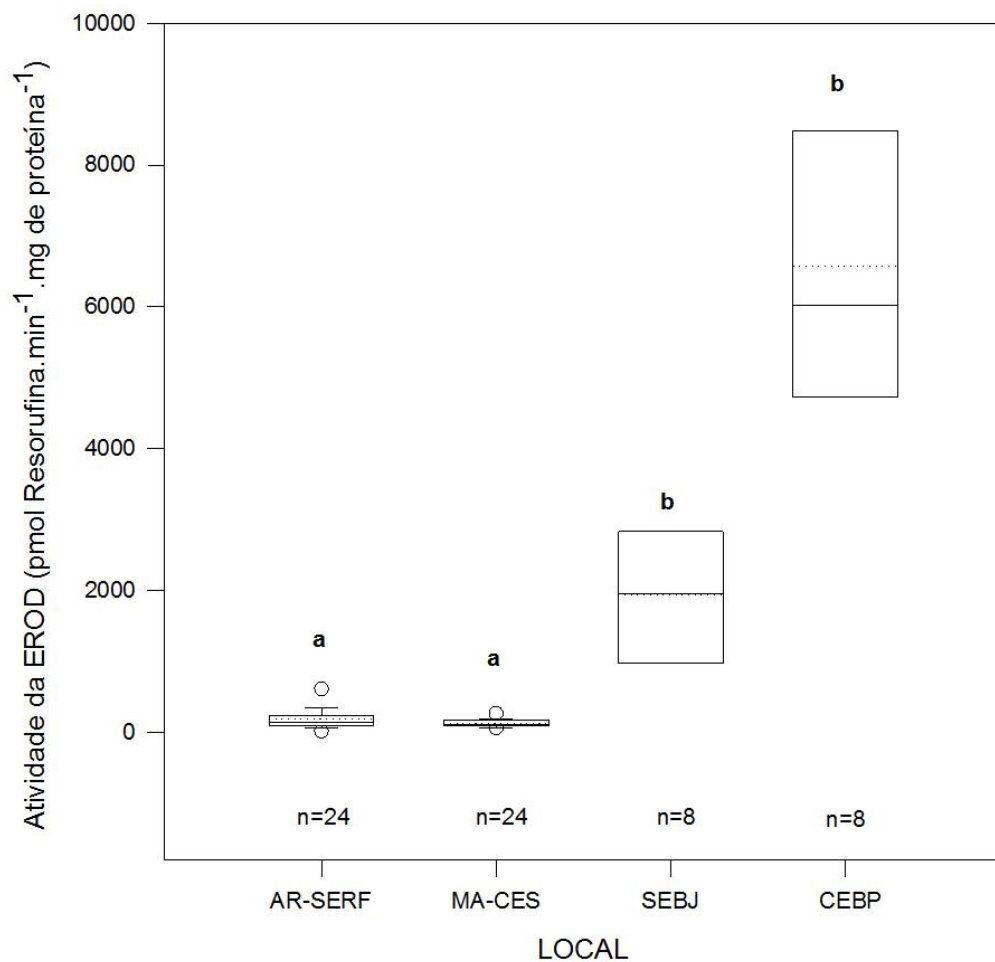


5.2.2.2. EROD

As cinéticas enzimáticas da EROD foram submetidas a uma análise de variância de 1 fator e verificou-se que peixes da bacia do Pina (CEBP) apresentaram maior atividade enzimática da EROD em comparação com as outras regiões, com 6572 pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (K-W, $H_3 = 39,1$; $p < 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) (Figura 19). A atividade da EROD foi induzida cerca de 30 x no CEBP e 10 x no SEBJ relativamente ao rio Ariquindá

(AR-SERF), com atividade semelhante ao rio Massangana em Suape (MA-CES) (Dunn, $p < 0,05$).

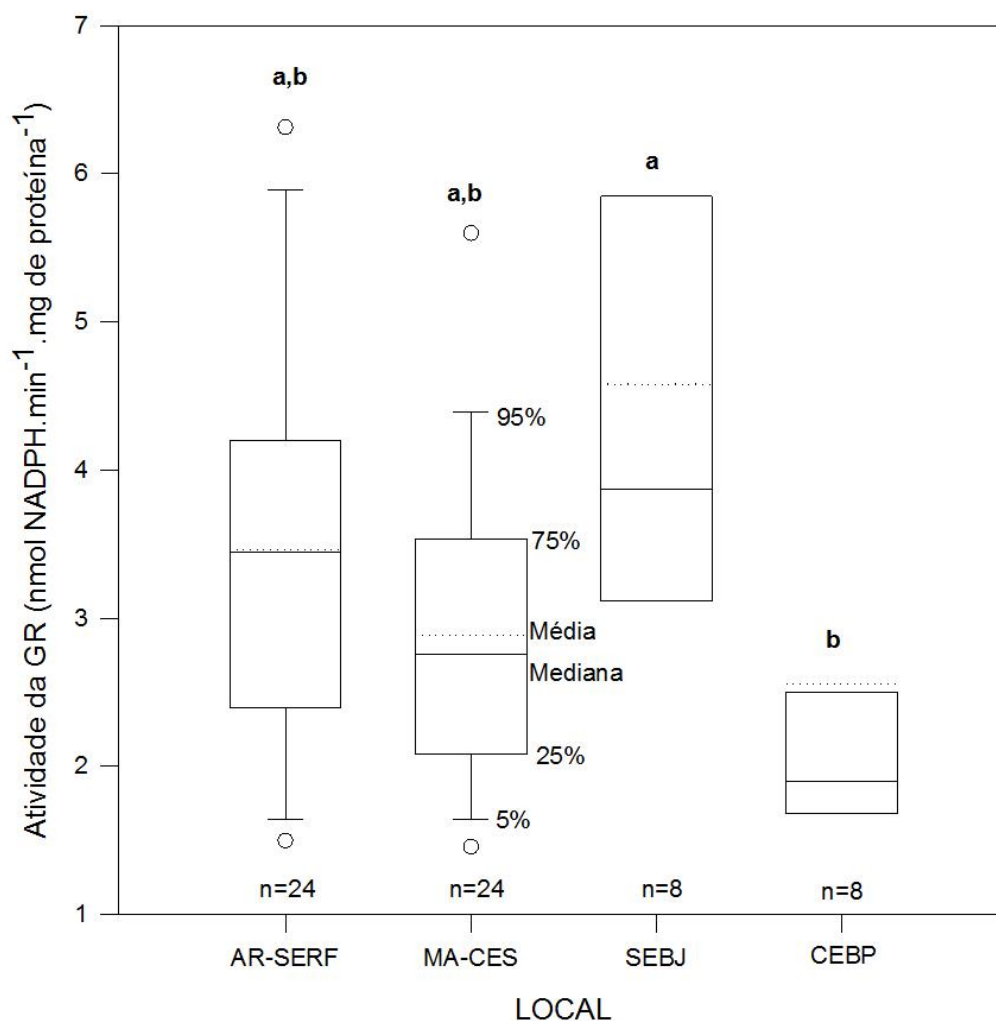
Figura 19. Atividade da EROD (média, mediana e quartis), em pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, em fígado de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), Pernambuco. Letras diferentes representam diferenças estatísticas (Dunn, $p < 0,05$).



5.2.2.3. Glutathione Redutase

As cinéticas enzimáticas da GR foram submetidas a uma análise de variância de 1 fator e verificou-se que peixes do rio Jaboatão (SEBJ) apresentaram atividade da GR maior estatisticamente em comparação com a bacia do Pina (CEBP) (K-W, $H_3 = 11,4$; $p = 0,009$; Dunn, $p < 0,05$), mas sem diferença em relação ao rio Ariquindá (AR-SERF) ou ao rio Massangana (MA-CES) (Figura 20).

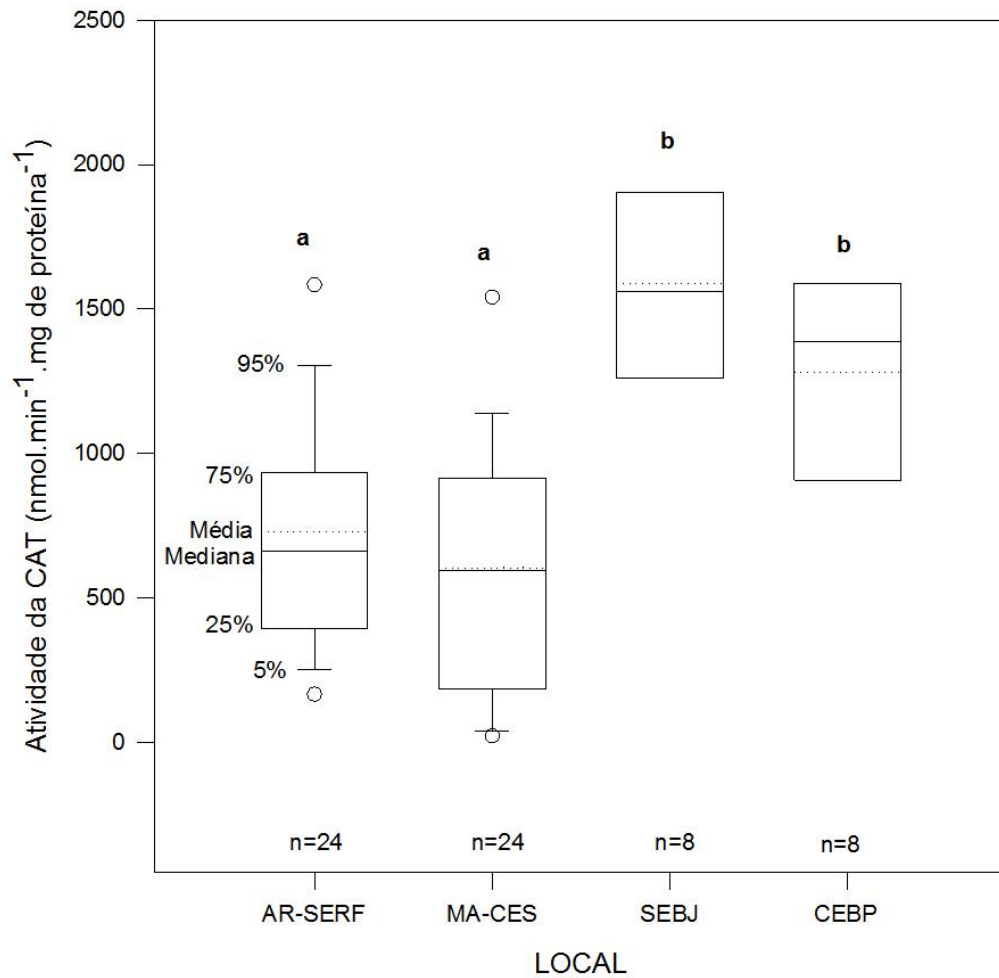
Figura 20. Atividade da Glutathiona Redutase (GR) (média, mediana e quartis), em nmol de NADPH.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, em fígado de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), Pernambuco. Letras diferentes representam diferenças significativas (Dunn, $p < 0,05$).



5.2.2.4. Catalase

As cinéticas enzimáticas da CAT foram submetidas a uma análise de variância de 1 fator e verificou-se maiores atividades da CAT em peixes do rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), que foram induzidas cerca de 2,6 x e 2,1 x, respectivamente, em comparação ao rio Massangana em Suape (MA-CES) que apresentou menor atividade de CAT juntamente com o rio Ariquindá (AR-SERF) (K-W, $H_3 = 26,064$; $p < 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) (Figura 21).

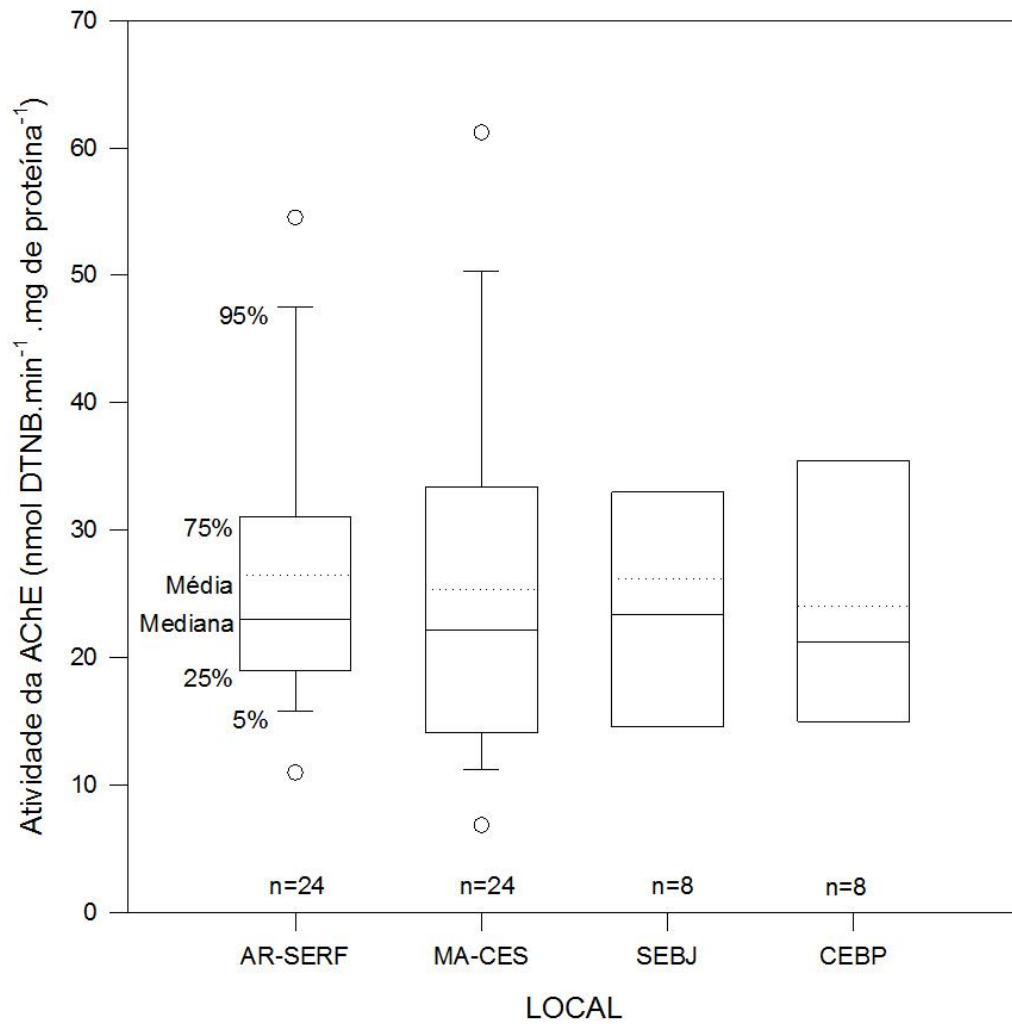
Figura 21. Atividade da Catalase (CAT) (média, mediana e quartis), em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹, em fígado de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), Pernambuco. Letras diferentes representam diferenças estatísticas (Dunn, $p < 0,05$).



5.2.2.5. Acetilcolinesterase

As cinéticas enzimáticas da acetilcolinesterase foram submetidas a uma análise de variância de 1 fator e verificou-se que não há diferenças significativas entre as regiões amostradas (K-W, $H_3 = 0,7$; $p = 0,853$; Dunn, $p < 0,05$) (Figura 22).

Figura 22. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) (média, mediana e quartis), nmol de $\text{TNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, em cérebro de indivíduos de *Eugerres brasiliensis* coletados nos sistemas estuarinos do rio Ariquindá (AR-SERF), rio Massangana em Suape (MA-CES), rio Jaboatão (SEBJ) e bacia do Pina (CEBP), Pernambuco.



6. DISCUSSÃO

A análise espaço-temporal da bioconcentração de HPAs na bile de carapebas *E. Brazilianus* indica que a contaminação por HPAs biodisponíveis na região do Rio Massangana no Complexo Estuarino de Suape (MA-CES) encontra-se em níveis semelhantes aos do rio Ariquindá no sistema estuarino do Rio Formoso (AR-SERF). Foram detectados picos dos HPAs naftaleno (Figura 7) e fenantreno (Figura 8) na bile de peixes de MA-CES cerca de 4 a 5 vezes superiores às concentrações de peixes coletados em AR-SERF em novembro de 2013, envolvendo possíveis descargas pontuais de contaminantes. Além disso, esta semelhança nos níveis de HPAs bioconcentrados na bile entre MA-CES e AR-SERF também é corroborada pela semelhança nas atividades dos biomarcadores enzimáticos EROD, GST, GR e CAT analisados nos peixes coletados nestas duas regiões. Levando em consideração que os peixes coletados em AR-SERF habitam uma região relativamente preservada, sem influência antrópica significativa, estes resultados indicam que a região onde foram coletados os peixes no rio Massangana, no interior do Complexo Estuarino de Suape, ainda não apresenta contaminação significativa por HPAs, apesar deste sistema estuarino abrigar o Complexo Industrial Portuário de Suape, onde ocorrem atividades industriais, de construção de navios e tráfego intenso de embarcações. Estes resultados estão coerentes com as concentrações relativamente baixas de hidrocarbonetos de petróleo dispersos e/ou dissolvidos (HPDDs) detectadas na água ($< 1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de equivalentes de criseno) por Lemos et al (2014), em vários pontos ao longo da região portuária de Suape e no rio Massangana, tanto na estação chuvosa quanto na seca.

A análise espacial da bioconcentração de HPAs na bile de *E. brasiliensis* levando em conta os quatro sistemas estuarinos avaliados indica concentrações biliares em equivalentes de naftaleno (Figura 15), fenantreno (Figura 16) e criseno (Figura 17) significativamente superiores em SEBJ e CEBP do que em AR-SERF e MA-CES, o que pode estar associado a densa urbanização destas regiões. O SEBJ e CEBP são sistemas estuarinos localizados no centro da Região Metropolitana do Recife (RMR), com cerca de 3,8 milhões habitantes (IBGE, 2014). O SEBJ recebe águas de dois rios, Jaboatão e Pirapama, que possuem a extensão de 75 e 80 km, respectivamente (BRANCO, 2007), e o CEBP recebe água dos rios Capibaribe, Tejió, Jordão e Pina (CPRH, 2013). Nestes dois sistemas estuarinos, a ocupação desordenada nas margens dos rios e os efluentes domésticos e industriais lançados sem tratamento contribuem significativamente com o aumento da contaminação química, inclusive por HPAs. Em contraste, as regiões de MA-CES e AR-SERF, a 40 e 110 km ao sul de Recife, respectivamente,

se encontram em áreas com baixa densidade populacional, em que o SERF situa-se parcialmente numa área de proteção ambiental, o que contribui para uma baixa contaminação dessa região. As menores concentrações de Naf_{bile} (Figura 15), Fen_{bile} (Figura 16), e $\text{Cris}_{\text{bile}}$ (Figura 17) foram detectadas no AR-SERF, coerente com a hipótese inicial do sistema estuarino do Rio Formoso ser o menos contaminado dentre os estudados. As concentrações de Naf_{bile} em AR-SERF foram aumentadas entre 1,5 x, 1,5 x e 2,7x em MA-CES, SEBJ e CEBP, respectivamente. Com relação a Fen_{bile} , as médias em AR-SERF foram aumentadas entre 1,7 x, 4 x e 2,8 x em MA-CES, SEBJ e CEBP, respectivamente. Em termos de $\text{Cris}_{\text{bile}}$ as médias em AR-SERF foram aumentadas entre 19 x e 13 x em SEBJ e CEBP, respectivamente.

Estes aumentos significativos de HPAs biliares em SEBJ e CEBP estão relacionados com um aumento da atividade da EROD em cerca de 30 x no CEBP e 10 x no SEBJ relativamente ao rio Ariquindá (AR-SERF) (Figura 19). Dévier et al. (2013) também associou a presença de HPAs biliares ao aumento da atividade da EROD no peixe *Limanda limanda* no monitoramento do estuário do rio Siena, França, trimestralmente e meio de análises. A EROD pode ser induzida por quatro classes de contaminantes: dioxinas, furanos, bifenilas policloradas (PCBs) planas e HPAs, em ordem decrescente de potencial indutivo (SAFE, 1990). Dentre os HPAs biliares estimados, o criseno apresenta o maior potencial de indução da EROD, cerca de 16% do potencial indutor do benzo[a]pireno, um dos HPAs mais potentes (BOLS et al., 1999). Apesar de HPAs apresentarem potencial indutor da EROD pequeno quando comparado a dioxinas e PCBs (SAFE, 1990), a indução da EROD detectada neste estudo em associação com os HPAs biliares estimados em SEBJ e CEBP corrobora a relevância deste parâmetro para o monitoramento de ecossistemas aquáticos contaminados por HPAs (PAYNE et al., 1987, WHYTE et al., 2000).

A GST é responsável pela biotransformação de fase II de contaminantes, conjugando-os com glutathione para facilitar a excreção (HUBER et al., 2008). Apesar da GST ser bem menos específica do que a EROD, podendo ser induzida por diversos contaminantes (BASTOS et al., 2013), Lu et al. (2009) associou o aumento da atividade da GST com a exposição a diversos HPAs. A atividade da GST neste trabalho aumentou 1,9 x a 1,4 x nos peixes coletados no SEBJ e no CEBP (Figura 18) em comparação com peixes do AR-SERF. Esta maior atividade da GST detectada nos estuários em que os peixes apresentaram maiores concentrações internas de $\text{Cris}_{\text{bile}}$ e Fen_{bile} sugere que HPAs estejam implicados nesta indução.

O mecanismo de toxicidade de HPAs inclui o desencadeamento de um estado de estresse oxidativo a nível celular, que pode ser provocado pelo consumo de glutathione no metabolismo de fase II catalisado pela GST mencionado acima, ou pelas reações de biotransformação de fase I. Estas reações podem gerar um aumento de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como O_2^- , H_2O_2 e OH^- , que possuem alta reatividade, e produzem uma série de efeitos deletérios nas células, como a oxidação em moléculas de DNA, em proteínas e lipoperoxidação (LUSHCHAK, 2011). Sun et al. (2009), Correia et al. (2007) e Nahrgang et al. (2009) mostraram a relação direta da exposição a HPAs e o aumento da atividade da CAT, enzima antioxidante responsável pela redução de H_2O_2 (REGOLI E GIULIANI, 2014), no fígado de peixes. Neste trabalho, a atividade da CAT foi induzida 2,6 e 2,1X nos peixes coletados respectivamente no SEBJ e no CEBP (Figura 21) em comparação com peixes do AR-SERF, o que sugere um aumento do estado de estresse oxidativo no fígado dos peixes com maiores concentrações internas de Crisbile e Fenbile coletados nestes estuários. A GR é outra enzima antioxidante responsável pela regeneração da glutathione oxidada durante a reação catalisada pela GST. Apesar de ter sido verificada uma indução da atividade de GST no SEBJ e CEBP, a atividade da GR nestas regiões se manteve nos mesmos níveis de AR-SERF (Figura 20). A exposição a HPAs associada ao aumento da atividade da GR já foi reportado anteriormente (ERIYAMREMU et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012; KOENIG et al., 2013). Entretanto, Eriyamremu et al. (2008) relatou a indução da GR em baixas concentrações de petróleo bruto e sua inibição em altas concentrações. Apesar das estimativas de HPAs biliares indicarem que os peixes do SEBJ e CEBP apresentam nível semelhante de contaminação, ambos superiores aos peixes de AR-SERF, não foi detectada indução da GR em SEBJ, mas foi detectada uma inibição da GR de 55% em relação a média de CEBP em comparação a AR-SERF, o que está parcialmente coerente com inibição em maiores concentrações de HPAs citada acima.

Não foram detectadas diferenças na atividade da AChE entre as regiões avaliadas (Figuras 14 e 22), sugerindo que os peixes dessas regiões não estão expostos significativamente a contaminantes anticolinesterásicos, como pesticidas carbamatos e organofosforados, considerando que a atividade detectada nos peixes coletados na área menos impactada do SERF seja normal.

A maior presença de HPAs biliares encontrados em SEBJ e CEPB em associação com a indução das atividades enzimáticas da EROD, GST e CAT, sugerem uma maior taxa de biotransformação e defesa antioxidante em *E. brasiliensis* relacionadas ao conhecido

mecanismo de ação de HPAs (JOHNSON et al., 2008). A detecção de HPAs biliares e indução destas atividades enzimáticas em peixes tem sido detectada também correlacionada a outros parâmetros de maior relevância ecológica, como: (1) diminuição da capacidade natatória no peixe *Pomatoschistus microps* exposto ao HPA pireno (OLIVEIRA et al. (2012); (2) aumento da letargia, diminuição da natação e diminuição das interações sociais no peixe *Sparus aurata* exposto ao fenantreno (CORREIA et al. 2007); e (3) diminuição do crescimento e alterações na função reprodutiva em peixes no estuário Puget, EUA (JOHNSON et al. 2008).

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a utilidade da espécie *E. brasiliensis* na avaliação ecotoxicológica de estuários costeiros. A comparação da concentração de HPAs biliares detectados nos peixes dos quatro estuários amostrados, em conjunto com a atividade da EROD, GST e CAT, indica um gradiente de contaminação e efeitos dos HPAs em *E. brasiliensis*. Verificou-se menor exposição e efeitos bioquímicos nos peixes coletados no AR-SERF e MA-CES, enquanto que peixes do CEBP e SEBJ apresentam maiores concentrações internas de HPAs biliares e maior atividade de EROD, GST e CAT. Será importante avaliar se efeitos mais ecologicamente relevantes também estão acontecendo nesta espécie, em especial nos estuários mais contaminados. Além disso, as quantificações de HPAs biliares e biomarcadores bioquímicos obtidas neste estudo com *E. brasiliensis* na região do CES podem ser utilizadas como nível base para o monitoramento da poluição por HPAs na região, tendo em vista que uma refinaria de petróleo e outras indústrias petroquímicas entrarão em atividade na região em breve.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, E., BAUSSANT, T., BALK, L., LIEWENBORG, B., ANDERSEN, O.K., 2000. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: A laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology* 51, 241-258.
- AEBI, H., 1984. [13] Catalase in vitro. pp. 121-126.
- AHMAD, I., PACHECO, M., SANTOS, M.A., 2003. Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocyte induction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 7-15.
- AL-GHAIS, S.M., 2013. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine Pollution Bulletin* 74, 183-186.
- ALI, S., LIU, G., 2013. Antioxidant enzyme activities in *exopalaemon carinicauda*, holthuis, 1950, (Decapoda: Palaemonidae) in response to naphthalene. *Advanced Science Letters* 19, 3655-3659.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L., PÉREZ SÁNCHEZ, L., HERNÁNDEZ MOLEJÓN, O.G., TORRES GÓMEZ, E., 1996. Mass production of striped patao *Eugerres brasiliensis* juveniles in Cuba. *Journal of the World Aquaculture Society* 27, 347-352.
- AMIARD-TRIQUET, C. AND J.-C. AMIARD, 2013. Introduction. *Ecological Biomarkers*, CRC Press: 1-14.
- AMIARD-TRIQUET, C., C. COSSU-LEGUILLE AND C. MOUNEYRAC, 2013. Biomarkers of Defense, Tolerance, and Ecological Consequences. *Ecological Biomarkers*, CRC Press: 45-74.
- ARAÚJO, M.E.D., TEXEIRA, J.M.C., OLIVEIRA, A.M.E.D., 2004. Peixes estuarinos marinhos do nordeste brasileiro: guia ilustrado. Editora UFC, Fortaleza.
- ARAÚJO, M.C.B., DA COSTA, M.F., 2007. Visual diagnosis of solid waste contamination of a tourist beach: Pernambuco, Brazil. *Waste Management* 27, 833-839.
- ARIAS, D.G., MARQUEZ, V.E., BECCARIA, A.J., GUERRERO, S.A., IGLESIAS, A.A., 2010. Purification and Characterization of a *Glutathione Reductase* from *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist* 161, 91-101.
- ARIESE, F., BURGERS, I., OUDHOFF, K., RUTTEN, T., STROOMBERG, G., VETHAAK, D., 1997. Comparison of Analytical Approaches for PAH Metabolites in Fish Bile Samples for Marine and Estuarine Monitoring. Institute for Environmental Studies, v.9, 40 p.

- ASAGBRA, M.C., ADEBAYO, A.S., ANUMUDU, C.I., UGWUMBA, O.A., UGWUMBA, A.A.A., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment and fish from the Warri River at Ubeji, Niger Delta, Nigeria. *African Journal of Aquatic Science*.
- ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., OLIVEIRA, V.M., FRANÇA, R.C.P., CARVALHO, E.V.M.M., BEZERRA, R.S., DE CARVALHO JR, L.B., 2012. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. *Science of The Total Environment* 441, 141-150.
- BAINY, A.C.D., SAITO, E., CARVALHO, P.S.M., JUNQUEIRA, V.B.C., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology* 34, 151-162.
- BASTOS, F.F., HAUSER-DAVIS, R.A., TOBAR, S.A.L., CAMPOS, R.C., ZIOLLI, R.L., BASTOS, V.L.F.C., BASTOS, J.C., 2013. Enzymatic GST levels and overall health of mullets from contaminated Brazilian Lagoons. *Aquatic Toxicology* 126, 414-423.
- BEERS JR, R.F., SIZER, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of biological chemistry* 195, 133-140.
- BEBIANNO, M. J., C. G. PEREIRA, F. REY, A. CRAVO, D. DUARTE, G. D'ERRICO AND F. REGOLI, 2015. "Integrated approach to assess ecosystem health in harbor areas." *Science of the Total Environment* 514: 92-107.
- BENEDETTI, M., GIULIANI, M.E., REGOLI, F., 2015. Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: Molecular and biochemical biomarkers in environmental toxicology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1340, 8-19.
- BERTHET, B., 2012. Sentinel Species. *Ecological Biomarkers*. CRC Press, pp. 155-186.
- BEYER, J., JONSSON, G., PORTE, C., KRAHN, M.M., ARIESE, F., 2010. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30, 224-244.
- BILLIARD, S. M., M. E. HAHN, D. G. FRANKS, R. E. PETERSON, N. C. BOLS AND P. V. HODSON. 2002. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 133(1): 55-68.
- BOLS, N.C., SCHIRMER, K., JOYCE, E.M., DIXON, D.G., GREENBERG, B.M., WHYTE, J.J., 1999. Ability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Induce 7-Ethoxyresorufin-o-

deethylase Activity in a Trout Liver Cell Line. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 118-128.

BRANCO, ES. 2007. *Influência das Variáveis Ambientais na Comunidade Fitoplanctônica Estuarina*. Recife, Editora Universitária. 266p.

BRINKMANN, M., HUDJETZ, S., KAMMANN, U., HENNIG, M., KUCKELKORN, J., CHINORAKS, M., COFALLA, C., WISEMAN, S., GIESY, J.P., SCHÄFFER, A., HECKER, M., WÖLZ, J., SCHÜTTRUMPF, H., HOLLERT, H., 2013. How flood events affect rainbow trout: Evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquatic Toxicology* 128-129, 13-24.

BUHLER, D.R., WILLIAMS, D.E., 1988. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquatic Toxicology* 11, 19-28.

BURKE, M. D. E. MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, v.2, p. 583-8, 1974.

CALADO, L.L., BERTOLLO, L.A.C., COSTA, G.W.W.F.D., MOLINA, W.F., 2013. Cytogenetic studies of Atlantic mojarra (*Perciformes - Gerreidae*): Chromosomal mapping of 5S and 18S ribosomal genes using double FISH. *Aquaculture Research* 44, 829-835.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* VOL. 113, 484-490.

CARVALHO, P.S.M., KALIL, D.D.C.B., NOVELLI, G.A.A., BAINY, A.C.D., FRAGA, A.P.M., 2008. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis*. *Marine Environmental Research* 66, 205-207.

CCME Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environmental and Human Health Effects). Scientific Supporting Document, 218 p., 2014.

CONTENTE, R.F., STEFANONI, M.F., SPACH, H.L., 2011. Fish assemblage structure in an estuary of the Atlantic Forest biodiversity hotspot (southern Brazil). *Ichthyological Research* 58, 38-50.

CORREIA, A.D., GONÇALVES, R., SCHOLZE, M., FERREIRA, M., HENRIQUES, M.A.R., 2007. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347, 109-122.

- CORSI, I., MARIOTTINI, M., SENSINI, C., LANCINI, L., FOCARDI, S., 2003. Cytochrome P450, acetylcholinesterase and gonadal histology for evaluating contaminant exposure levels in fishes from a highly eutrophic brackish ecosystem: the Orbetello Lagoon, Italy. *Marine Pollution Bulletin* 46, 203-212.
- CPRH - Agência Estadual de Meio Ambiente, Pernambuco. 2013. Relatório de Monitoramento da Qualidade da água de bacias hidrográficas do estado de Pernambuco em 2013. Disponível em < http://www.cprh.pe.gov.br/Controle_Ambiental/monitoramento/qualidade_da_agua/bacias_hidrograficas/relatorio_bacias_hidrograficas/41786%3B63044%3B4803010202%3B0%3B0.asp Acessado em Junho de 2015.
- CREMER, M.J., PINHEIRO, P.C., SIMÕES-LOPES, P.C., 2012. Prey consumed by Guiana dolphin *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae) and franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) in an estuarine environment in southern Brazil. *Iheringia - Serie Zoologia* 102, 131-137.
- DÉVIER, M., LE DÛ-LACOSTE, M., AKCHA, F., MORIN, B., PELUHET, L., LE MENACH, K., BURGEOT, T., BUDZINSKI, H., 2013. Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research* 20, 708-722.
- DI GIULIO, R.T., HINTON, D.E., 2008. Introduction. *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, pp. 3-7.
- EISLER, R., 1987. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Hazards to Fish, Wildlife and Invertebrates: A Synoptic Review. *Contaminant Hazard Reviews*, Laurel, MD.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES JR, V., FEATHERSTONE, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- ERIYAMREMU, G. E., V. E. OSAGIE, S. E. OMOREGIE AND C. O. OMOFOMA, 2008. "Alterations in glutathione reductase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to Bonny Light crude oil and its fractions." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(1): 284-290.
- ERICKSON, R.J., NICHOLS, J.W., COOK, P.M., ANKLEY, G.T., 2008. Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, pp. 9-54.
- ERLER, D.M., LIMA, D.P., JR., SCHIAVETTI, A., 2015. Ecological fishing networks in a marine protected area: One possibility for evaluating objectives. *Ocean and Coastal Management* 104, 106-114.

- EZEMONYE, L., TONGO, I., 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere* 81, 214-217.
- FAKSNESS, L.G., ALTIN, D., NORDTUG, T., DALING, P.S., HANSEN, B.H., 2015. Chemical comparison and acute toxicity of water accommodated fraction (WAF) of source and field collected Macondo oils from the Deepwater Horizon spill. *Marine Pollution Bulletin* 91, 222-229.
- FEITOSA, J.L.L., CONCENTINO, A.M., TEIXEIRA, S.F., FERREIRA, B.P., 2012. Food resource use by two territorial damselfish (Pomacentridae: Stegastes) on South-Western Atlantic algal-dominated reefs. *Journal of Sea Research* 70, 42-49.
- FUENTES-RIOS, D., ORREGO, R., RUDOLPH, A., MENDOZA, G., GAVILÁN, J.F., BARRA, R., 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): Biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere* 61, 192-199.
- FUKUTO, T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives* 87, 245-254.
- FULTON, M.H., KEY, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 37-45.
- GENKINGER, J. M., L. STIGTER, W. JEDRYCHOWSKI, T.-J. HUANG, S. WANG, E. L. ROEN, R. MAJEWSKA, A. KIELTYKA, E. MROZ AND F. P. PERERA, 2015. "Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure, antioxidant levels and behavioral development of children ages 6–9." *Environmental Research* 140(0): 136-144.
- GONÇALVES, R., SCHOLZE, M., FERREIRA, A.M., MARTINS, M., CORREIA, A.D., 2008. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research* 108, 205-213.
- GONZÁLEZ-ACOSTA, A.F., DE LA CRUZ-AGÜERO, J., CASTRO-AGUIRRE, J.L., 2007. A review of the marine western atlantic species of the genus *Eugerres* (Perciformes: Gerreidae). *Bulletin of Marine Science* 80, 109-124.
- GREGO, C.K.S., FEITOSA, F.A.N., SILVA, M.H., CUNHA, M.G.G.S., NASCIMENTO FILHO, G.A., 2007. Fitoplankton do ecossistema estuarino do rio Arinquiná (Tamandaré, PERNAMBUCO, Brazil) Variáveis ambientais, biomassa e produtividade primária. *Atlântica, Rio Grande*, 31 (2,183-198).

- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139.
- HARMAN, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300.
- HUBER, P.C., ALMEIDA, W.P., FÁTIMA, Â.D., 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova* 31, 1170-1179.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. Estimativas da população residente no Brasil e unidades da federação com data de referência em 1º de julho de 2014. Diretoria de Pesquisas - DPE - Coordenação de População e Indicadores Sociais - COPIS. Disponível em < ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2014/estimativa_dou_2014.pdf >. Acessado em junho de 2015.
- INCARDONA, J.P., COLLIER, T.K., SCHOLZ, N.L., 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 191-205.
- JOHNSON, L. L., M. R. ARKOOSH, C. F. BRAVO, T. K. COLLIER, M. M. KRAHN, J. P. MEADOR, M. S. MYERS, W. L. REICHERT AND J. E. STEIN, 2008. The Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish from Puget Sound, Washington. *The Toxicology of Fishes*, CRC Press: 877-923.
- KOENIG, S., PORTE, C., SOLÉ, M., STURVE, J., 2013. Biliary PAH and alkylphenol metabolites, biomarker enzyme activities, and gene expression levels in the deep-sea fish *alepocephalus rostratus*. *Environmental Science and Technology* 47, 2854-2861.
- LEAL, I.C.S., ARAÚJO, M.E.D., CUNHA, S.R.D., PEREIRA, P.H.C., 2015. The influence of fire-coral colony size and agonistic behaviour of territorial damselfish on associated coral reef fish communities. *Marine Environmental Research* 108, 45-54.
- LEMOES, R.T.D.O., CARVALHO, P.S.M.D., ZANARDI-LAMARDO, E., 2014. Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. *Marine Pollution Bulletin* 82, 183-188.
- LI, Y., Schellhorn, H.E., 2007. Rapid kinetic microassay for catalase activity. *Journal of Biomolecular Techniques* 18, 185-187.
- LIN, E.L.C., CORMIER, S.M., TORSELLA, J.A., 1996. Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence: Comparison with HPLC-fluorescent detection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35, 16-23.

- LIVINGSTONE, D.R., 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42, 656-666.
- LU, G. H., C. WANG AND Z. ZHU, 2009. "The dose-response relationships for EROD and GST induced by polyaromatic hydrocarbons in *carassius auratus*." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82(2): 194-199.
- LUSHCHAK, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13-30.
- LUZARDO, O. P., N. RUIZ-SUÁREZ, L. A. HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, P. F. VALERÓN, M. CAMACHO, M. ZUMBADO AND L. D. BOADA, 2014. "Assessment of the exposure to organochlorine pesticides, PCBs and PAHs in six species of predatory birds of the Canary Islands, Spain." *Science of The Total Environment* 472(0): 146-153.
- MARTY, G. D., 2008. Effects of the Exxon Valdez Oil Spill on Pacific Herring in Prince William Sound, Alaska. *The Toxicology of Fishes*, CRC Press: 925-932.
- MASHROOFEH, A., BAKHTIARI, A.R., POURKAZEMI, M., 2015. Distribution and composition pattern of polycyclic aromatic hydrocarbons in different tissues of sturgeons collected from Iranian coastline of the Caspian Sea. *Chemosphere* 120, 575-583.
- MEYER, W., SEILER, T.B., CHRIST, A., REDELSTEIN, R., PU"TTMANN, W., HOLLERT, H., ACHTEN, C., 2014. Mutagenicity, dioxin-like activity and bioaccumulation of alkylated picene and chrysene derivatives in a *German lignite*. *Science of the Total Environment* 497, 634-641
- MME - Ministério de Minas e Energia, 2014. BEN – Balanço Energético Nacional 2014: Ano base 2013. Empresa de Pesquisa Energética, Rio de Janeiro, 2014.
- MUSHIGERI, S.B., DAVID, M., 2005. Fenvalerate induced changes in the Ach and associated AchE activity in different tissues of fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) under lethal and sub-lethal exposure period. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20, 65-72.
- NAHRGANG, J., BROOKS, S.J., EVENSET, A., CAMUS, L., JONSSON, M., SMITH, T.J., LUKINA, J., FRANTZEN, M., GIARRATANO, E., RENAUD, P.E., 2013. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)-Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquatic Toxicology* 127, 21-35.
- NAHRGANG, J., CAMUS, L., BROMS, F., CHRISTIANSEN, J.S., HOP, H., 2010. Seasonal baseline levels of physiological and biochemical parameters in polar cod (*Boreogadus saida*): Implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1336-1345.

- NAHRGANG, J., CAMUS, L., GONZALEZ, P., GOKSØYR, A., CHRISTIANSEN, J.S., HOP, H., 2009. PAH biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to benzo(a)pyrene. *Aquatic Toxicology* 94, 309-319.
- NAHRGANG, J., CHRISTIANSEN, J.S., HOP, H., SVA, E., CAMUS, L., 2008. Seasonal variability of PAH biomarkers in the polar cod (*Boreogadus saida*) with applications for oil toxicity testing. *Marine Environmental Research* 66, 178-179.
- NEFF, J.M., 2002. Chapter 15 - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ocean. in: Neff, J.M. (Ed.). *Bioaccumulation in Marine Organisms*. Elsevier, Oxford, pp. 241-318.
- NELSON, D.R., 2003. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 409, 18-24.
- NEVES, L.M., TEIXEIRA, T.P., FRANCO, T.P., PEREIRA, H.H., ARAÚJO, F.G., 2013. Fish composition and assemblage structure in the estuarine mixing zone of a tropical estuary: Comparisons between the main channel and an adjacent lagoon. *Marine Biology Research* 9, 661-675.
- O'FLAHERTY, E.J., 2003. Absorption, Distribution, and Elimination of Toxic Agents. *Principles of Toxicology*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 35-55.
- OLIVEIRA, M., GRAVATO, C., GUILHERMINO, L., 2012. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecological Indicators* 19, 206-214.
- PAIVA, A. C. G. D., M. F. V. LIMA, J. R. B. D. SOUZA AND M. E. D. ARAÚJO, 2009. "Spatial distribution of the estuarine ichthyofauna of the rio formoso (pernambuco, Brazil), with emphasis on reef fish." *Zoologia* 26(2): 266-278.
- PAYNE, J. F., A. MATHIEU AND T. K. COLLIER, 2003. *Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish. PAHs: An Ecotoxicological Perspective*, John Wiley & Sons, Ltd: 191-224.
- PAYNE JF, FANCEY LL, RAHIMTULA A AND PORTER EL, 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86 (2), 233-245.
- PASSINI, G., DE CARVALHO, C.V.A., COSTA, W.M., CERQUEIRA, V.R., 2013. Induced spawning of Brazilian mojarra *Eugerres Brasiliensis* in captivity. *Boletim do Instituto de Pesca* 39, 433-438.
- PATHIRATNE, A. AND C. K. HEMACHANDRA, 2010. "Modulation of ethoxyresorufin O-deethylase and glutathione S-transferase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by

polycyclic aromatic hydrocarbons containing two to four rings: implications in biomonitoring aquatic pollution." *Ecotoxicology* 19(6): 1012-1018.

PATHIRATNE, A., HEMACHANDRA, C.K., PATHIRATNE, K.A.S., 2010. Assessment of bile fluorescence patterns in a tropical fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to naphthalene, phenanthrene, pyrene and chrysene using fixed wavelength fluorescence and synchronous fluorescence spectrometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84, 554-558.

PEEBUA, P., KOSIYACHINDA, P., POKETHITIYOOK, P., KRUATRACHUE, M., 2007. Evaluation of alachlor herbicide impacts on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using biochemical biomarkers. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 78, 138-141.

PEREIRA TRÍDICO, C., A. C. FERREIRA RODRIGUES, L. NOGUEIRA, D. C. DA SILVA, A. BENEDITO MOREIRA AND E. A. DE ALMEIDA (2010). "Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(5): 858-863.

PESSOA, P.C., LUCHMANN, K.H., RIBEIRO, A.B., VERAS, M.M., CORREA, J.R.M.B., NOGUEIRA, A.J., BAINY, A.C.D., CARVALHO, P.S.M., 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquatic Toxicology* 105, 312-320.

PIKKARAINEN, A.-L., 2006. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and bile metabolites as contamination indicators in Baltic Sea perch: Determination by HPLC. *Chemosphere* 65, 1888-1897.

RADKE, M., RULLKÖTTER, J., VRIEND, S.P., 1994. Distribution of naphthalenes in crude oils from the Java Sea: Source and maturation effects. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 3675-3689.

RAMOS, J.A.A., BARLETTA, M., COSTA, M.F., 2012. Ingestion of nylon threads by gerreidae while using a tropical estuary as foraging grounds. *Aquatic Biology* 17, 29-34.

RECIFE, P.D.C.D., 1995. Recuperação ambiental das bacias dos rios Jordão e Pina- Conceção geral. Recife, p. 148.

REGOLI, F., GIULIANI, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research* 93, 106-117.

REN, X., PAN, L., WANG, L., 2015. The detoxification process, bioaccumulation and damage effect in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to chrysene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 114, 44-51.

- ROMÉO, M., GIAMBÉRINI, L., 2013. History of Biomarkers, Ecological Biomarkers. CRC Press, pp. 15-44.
- RUDDOCK, P.J., BIRD, D.J., MCCALLEY, D.V., 2002. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn estuary. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 97-105.
- SAFE, S., 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology* 21, 51-88.
- SANTOS, M.M., SOLÉ, M., LIMA, D., HAMBACH, B., FERREIRA, A.M., REIS-HENRIQUES, M.A., 2010. Validating a multibiomarker approach with the shanny *Lipophrys pholis* to monitor oil spills in European marine ecosystems. *Chemosphere* 81, 685-691.
- SCANDALIOS, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defence. *Brasilian Journal Of Medical and Biological Research* 38, 955-1014
- SCHLENK, D., M. CELANDER, E. P. GALLAGHER, S. GEORGE, M. JAMES, S. W. KULLMAN, P. V. D. HURK AND K. WILLETT, 2008. Biotransformation in Fishes. *The Toxicology of Fishes*, CRC Press: 153-234.
- SETTE, C.B., PEDRETE, T.D.A., FELIZZOLA, J., NUDI, A.H., SCOFIELD, A.D.L., WAGENER, A.D.L.R., 2013. Formation and identification of PAHs metabolites in marine organisms. *Marine Environmental Research* 91, 2-13.
- SHAILAJA, M. S. AND C. D'SILVA, 2003. "Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers." *Chemosphere* 53(8): 835-841.
- SIDDENS, L. K., K. L. BUNDE, T. A. HARPER JR, T. J. MCQUISTAN, C. V. LÖHR, L. M. BRAMER, K. M. WATERS, S. C. TILTON, S. K. KRUEGER, D. E. WILLIAMS AND W. M. BAIRD, 2015. "Cytochrome P450 1b1 in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-induced skin carcinogenesis: Tumorigenicity of individual PAHs and coal-tar extract, DNA adduction and expression of select genes in the Cyp1b1 knockout mouse." *Toxicology and Applied Pharmacology* (0).
- SIGMAPLOT para Windows Versão 11, 2008. Copyright, Systat Software Inc.
- SILVA, E.M., PESO-AGUIAR, M.C., DE FÁTIMA TEIXEIRA NAVARRO, M., DE BARROS E AZEVEDO CHASTINET, C., 1997. Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 112-118.

- SOUZA, A.D.G., TUNDISI, J.G. 2003. Water quality in watershed of the jaboatão river (Pernambuco, Brazil): a case study. *Brazilian archives of biology and technology*. 46 (4,711-721)
- SUAPE – Complexo Industrial portuário. Disponível em: www.suape.pe.gov.br, acessado em junho de 2015.
- SUN, Y., YU, H., ZHANG, J., YIN, Y., SHI, H., WANG, X., 2006. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere* 63, 1319-1327.
- SANTOS, M.M.F. 2002. Impactos ambientais no estuário do rio Formoso a partir da confluência dos rios Arinquiná/Formoso, Tamandaré (PE). Universidade federal de pernambuco. Mestrado em Gestão e políticas ambientais, 115 p.
- TAIROVA, Z.M., STRAND, J., CHEVALIER, J., ANDERSEN, O., 2012. PAH biomarkers in common eelpout (*Zoarces viviparus*) from Danish waters. *Marine Environmental Research* 75, 45-53.
- TEKMAN, B., OZDEMIR, H., SENTURK, M., CIFTCI, M., 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 148, 117-121.
- TORREIRO-MELO, A.G.A.G., SILVA, J.S., BIANCHINI, A., ZANARDI-LAMARDO, E., CARVALHO, P.S.M.D., 2015. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. *Chemosphere* 132, 17-23.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 1, p. 151-173, 1977.
- UNEP – United Nations Environment Programme. Determinations of petroleum hydrocarbons in sediment. Reference methods for marine pollution studies, n.20, p.97, 1991.
- UNO, T., Ishizuka, M., Itakura, T., 2012. Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34, 1-13.
- USEPA – U.S. Environmental Protection Agency. 126 Priority Pollutants. Disponível em: < <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm> > Acesso em Junho de 2015.
- VALAVANIDIS, A., VLAHOIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 178-189.

- VAN DER OOST, R., J. BEYER AND N. P. E. VERMEULEN, 2003. "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2): 57-149.
- VUONTISJÄRVI, H., KEINÄNEN, M., VUORINEN, P.J., PELTONEN, K., 2004. A comparison of HPLC with fluorescence detection and fixed wavelength fluorescence methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. *Polycyclic Aromatic Compounds* 24, 333-342.
- WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S.P.; PEAKALL, D.B. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis Group, Londres, 2005.
- WESSEL, N., SANTOS, R., MENARD, D., LE MENACH, K., BUCHET, V., LEBAYON, N., LOIZEAU, V., BURGEOT, T., BUDZINSKI, H., AKCHA, F., 2010. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Marine Environmental Research* 69, Supplement 1, S71-S73.
- WHYTE, J.J., JUNG, R., SCHMITT, C., TILLITT, D., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 30, 347-570.
- WOREK, F., MAST, U., KIDERLEN, D., DIEPOLD, C., EYER, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta* 288, 73-90.
- XIU, M., PAN, L., JIN, Q., MIAO, J., 2015. Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 170, 50-59.
- ZHANG, L., QIU, L., WU, H., LIU, X., YOU, L., PEI, D., CHEN, L., WANG, Q., ZHAO, J., 2012. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 155, 517-527.

ANEXO I

Curvas analíticas dos HPAs naftaleno, fenantreno e criseno.

