

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Zoologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



BIOMARCADORES ECOTOXICOLÓGICOS EM *Poecilia vivipara* PARA O
MONITORAMENTO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

Anny Gabrielle Araújo Graf Torreiro Melo

RECIFE
2015

Anny Gabrielle Araújo Graf Torreiro Melo

**BIOMARCADORES ECOTOXICOLÓGICOS EM
Poecilia vivipara PARA O MONITORAMENTO DE
ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco (PPGBA-UFPE), como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

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

Coorientadora: **Profa. Dra. Eliete Zanardi Lamardo**

RECIFE
2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Melo, Anny Gabrielle Araújo Graf Torreiro

Biomarcadores ecotoxicológicos em *Poecilia vivipara* para o monitoramento de ecossistemas aquáticos / Anny Gabrielle Araújo Graf Torreiro Melo. – Recife: O Autor, 2015.

110 f.: il.

Orientadora: Paulo Sérgio Martins de Carvalho, Eliete Zanardi Lamardo
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, 2015.
Inclui referências

1. Peixes 2. Toxicologia ambiental I. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (orient.) II. Lamardo, Eliete Zanardi (coorient.) III. Título.

597
180

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-

BIOMARCADORES ECOTOXICOLÓGICOS EM *Poecilia
vivipara* PARA O MONITORAMENTO DE ECOSISTEMAS
AQUÁTICOS

Anny Gabrielle Araújo Graf Torreiro Melo

APROVADA em 20/02/2015

Folha de Aprovação - Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho (Orientador)
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Profa. Dra. Eliete Zanardi Lamardo (Coorientadora)
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre – Titular Externo
(Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC)

Profa. Dra. Cristiane Maria Varela de Araújo Castro – Titular Externo
(Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFPE)

Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos – Titular Externo
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Prof. Dr. Ralf Schwamborn – Titular Externo
(Universidade Federal de Pernambuco – UFRPE)

Prof. Dr. Antonio da Silva Souto – Titular Interno
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Prof. Dr. Jessor Fidelis de Souza Filho – Suplente Externo
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Prof. Dr. José Roberto Botelho de Souza – Suplente Interno
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

*“Mera mudança não é crescimento.
Crescimento é a síntese de mudança e
continuidade, e onde não há continuidade não
há crescimento.”*
C. S. Lewis

*“Tudo posso naquele que me fortalece”
(Filipenses 4.13).*

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo que Ele é e o que faz por mim.

Agradeço à minha família amada, por cada um e cada palavra de incentivo. Pela compreensão da minha ausência e por apostarem tanto em mim. Em especial, agradeço à minha mãe, pelo coração gigante e força de guerreira, que me orgulham e me inspiram todos os dias.

Aos amores da minha vida, meu marido e meu filhote, por terem sentido mais que todos e terem suportado a minha ausência, mesmo estando pertinho de mim. Pelos tantos momentos de renúncia que vocês compreenderam e me apoiaram, e melhor que tudo, me amaram. Ao meu marido ainda agradeço a imensa disposição em me ajudar e em participar de todas as etapas do planejamento, execução e conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos, por serem minha família também, aquela que eu escolhi. E pelas tantas vezes que entenderam meus dias corridos.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Paulo Carvalho (Paulito), pelos mais de 4 anos de orientação, confiança, amizade e compreensão. Pelas risadas e por me ensinar que não se pode ter todos os brinquedos da estante.

À minha queridona, Profa. Dra. Eliete Zanardi-Lamardo, pela sua sabedoria científica, emocional e espiritual que tanto foi necessária. Agradeço imensamente pela sua amizade.

Aos meus ninos do Labecotox (Labeco), por serem uma equipe maravilhosa, e por tornarem o trabalho possível. Já estou com saudades!

Aos vários pesquisadores integrantes do INCT-TA, por me proporcionarem o enriquecimento de conhecimento através da troca de experiências e metodologias de trabalho. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Alcir Dafre (e aos seus alunos Daiane Acosta e Rafael Trevisan), ao Prof. Dr. Adalto Bianchini (e aos seus alunos Mari Basso, Mariana Lauer e Abel Machado), e ao Prof. Dr. Paulo Meletti. A todos o meu muito obrigada.

Ao Dr. Silvio Sasaki, à Dra. Satie Taniguchi e à Profa. Dra. Márcia Bícego, do Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico de São Paulo (Lab-QOM - IOUSP), por possibilitarem a realização das análises de metabólitos biliares. Muito obrigada por toda a ajuda.

A todos do Organomar, em especial à Daniele Maciel e Amandinha, pela realização da extração e análises de HAPDDs.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFPE, em especial aos seus coordenadores durante o período em curso, o Prof. Dr. Paulo Santos e o Prof. Dr. André Esteves.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do “Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática - INCT-TA”.

À Capes e ao INCT-TA pela concessão da bolsa de estudos.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	17
Manuscrito I	
ABSTRACT	24
1. INTRODUCTION.....	25
2. METHODOLOGY	28
2.1. Animal collection and laboratory acclimation	28
2.2. Phenanthrene treatments preparation	28
2.3. Exposure.....	28
2.4. Determination of metabolites in bile.....	29
2.5. Behavioral Biomarkers.....	30
2.5.1. Swimming Resistance	30
2.5.2. Spontaneous swimming speeds.....	30
2.5.3. Prey capture.....	31
2.6. Statistical analyses	31
3. RESULTS	32
3.1. Phenanthrene and metabolites in bile.....	32
3.2. Swimming resistance	32
3.3. Spontaneous swimming speeds.....	33
3.4. Prey capture.....	34
4. DISCUSSION	37
5. CONCLUSION	41
6. ACKNOWLEDGEMENTS	42
Manuscrito II	
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. METODOLOGIA	48
2.1. Animais e desenho experimental.....	48
2.2. Preparo das soluções e exposição.....	48
2.3. Avaliação da atividade Natatória Espontânea.....	48
2.4. Determinação de metabólitos na bile	49
2.4.1. Fluorescência Fixa (FF)	49

2.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de fluorescência (CLAE/F)	50
2.4.3. Fator de Bioconcentração Biliar.....	51
2.5. Análises estatísticas.....	51
3. RESULTADOS.....	52
3.1. Velocidade Natatória Espontânea	52
3.2. Metabólitos na bile.....	52
4. DISCUSSÃO.....	57
5. CONCLUSÃO	61
6. ANEXOS.....	62
ANEXO I	62
ANEXO II	64
ANEXO III.....	65
<i>Manuscrito III</i>	
RESUMO	66
ABSTRACT	67
1. INTRODUÇÃO	68
2. METODOLOGIA	72
2.1. Coleta e manutenção dos peixes em laboratório	72
2.2. Experimentos de exposição <i>in situ</i>	72
2.3. Coleta de animais residentes nos estuários	73
2.4. Hidrocarbonetos aromáticos de petróleo dissolvidos e/ou dispersos na água (HAPDDs).....	74
2.5. Determinação de metabólitos biliares	74
2.6. Biomarcadores Bioquímicos de Exposição.....	75
2.6.1. Atividade da EROD	76
2.6.2. Atividade da Glutathione S-Transferase (GST).....	76
2.6.3. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	76
2.6.4. Quantificação de proteínas	76
2.7. Biomarcadores Comportamentais	77
2.7.1. Velocidade Natatória.....	77
2.7.2. Resistência Natatória.....	77
2.8. Análises estatísticas.....	77
3. RESULTADOS.....	79

3.1. Parâmetros físico químicos	79
3.2. HAPDDs	79
3.3. Metabólitos biliares	80
3.4. Sobrevivência	81
3.5. Biomarcadores Bioquímicos de Exposição	81
3.6. Atividade Natatória Espontânea	84
3.7. Resistência Natatória	84
4. DISCUSSÃO	86
4.1. Parâmetros físico químicos	86
4.2. HAPDDs	87
4.3. Metabólitos biliares e bioconcentração	87
4.4. Biomarcadores bioquímicos	88
4.5. Biomarcadores comportamentais	91
5. CONCLUSÕES	94
CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	97

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1 - Posição das espécies sentinelas nos vários níveis de organização biológica em resposta a poluentes. Adaptado de Berthet (2012). 20

Figura 2 - Representação esquemática da tese. Manuscrito I – Representado pelas linhas verdes; Manuscrito II – Representado pelas linhas vermelhas; Manuscrito III – Representado pelas linhas azuis. 23

Manuscrito I

Figure 1 - Relative fluorescence units (RFUs) (median, percentiles and mean, n = 10 to 13 fish) in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control, n=10; (0') DMSO solvent control (*): statistically different relative to control. 33

Figure 2 – Swimming resistance index (mean $\pm$ standard deviation, n = 15) in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control; (0') solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control. 34

Figure 3 - Spontaneous swimming speed (mean $\pm$ standard deviation, n = 15) in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control; (0') solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control. 34

Figure 4 - Spontaneous swimming speed in absence and presence of prey (median, percentiles and mean, n = 15) in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control; (0') solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control. 35

Figure 5 - Swimming trajectories during 5 min in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control; (0') solvent control (DMSO). 35

Figure 6 - Total number of prey captured (*Artemia nauplii*) (median, percentiles and mean, n = 15) in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control; (0') solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control. 36

Manuscrito II

Figura 1 - Velocidade de natação espontânea (mediana $\pm$ quartis, n = 20) em *Poecilia vivipara* após 96 h de exposição à mistura dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno em diferentes concentrações. (0): controle; (0'): controle de solvente (DMSO); (*): Significativamente diferente em relação ao controle. 52

Figura 2 - Concentração em equivalentes de naftaleno (a), fenantreno (b) e pireno (c) quantificada através das técnicas de FF e HPLC/F em *Poecilia vivipara* (n = 20) após 96 h de exposição à mistura de HPAs nas concentrações 15, 30, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de HPA total na

água (1:1:1 de naftaleno, fenantreno e pireno). (0): controle; (0'): controle de solvente (DMSO); (*): Significativamente diferente em relação ao controle. 54

Figura 3 - Volume total da vesícula biliar (μL) (mediana $\pm$ quartis padrão, $n = 20$) em *Poecilia vivipara* após 96 h de exposição à mistura de HPAs nas concentrações 15, 30, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de HPA total na água (1:1:1 de naftaleno, fenantreno e pireno). (0): controle; (0'): controle de solvente (DMSO); (*): Significativamente diferente em relação ao controle..... 56

Manuscrito III

Figura 1 - Mapa da região de estudo em que o barrigudinho *Poecilia vivipara* foi utilizado em experimentos de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e coletado como organismo sentinela residente (RE) em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2)..... 69

Figura 2 - Fluorescência da bile em unidades de fluorescência relativa (UFRs) (medianas e percentis, $n = 20-24$) de fenantreno e criseno no barrigudinho *Poecilia vivipara*, após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). (*): Significativamente diferente em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório) (K-W, $H_4 = 56,2$; $p = 0,001$; Dunn, $p < 0,05$). 80

Figura 3 - Atividade da Etoxiresorufina-orto-deetilase (EROD) (mediana e quartis, $n = 8$) em fígado do barrigudinho *Poecilia vivipara*, após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). (*): Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório)..... 82

Figura 4 - Atividade da Glutathione-S-transferase (GST) (média $\pm$ desvio padrão, $n = 8$) em fígado do barrigudinho *Poecilia vivipara*, após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). (*): Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório). 83

Figura 5 - Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) (média $\pm$ 95% confiança; $n = 15$) em cérebros de indivíduos do barrigudinho *Poecilia vivipara*, após 96 h de exposição *in*

situ (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). s.e.m.: significância estatística marginal em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório); (Anova 1, F4,70 = 2,27, p = 0,068). 83

Figura 6 - Velocidade média de natação espontânea (medianas e percentis, n = 20-24) no barrigudinho *Poecilia vivipara*, após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). (*): Significativamente diferente (p < 0,05) em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório). 84

Figura 7 - Índice de resistência natatória (média ± desvio padrão, n = 20-24) no barrigudinho *Poecilia vivipara* após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). (*): Significativamente diferente (p < 0,05) em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório). 85

Lista de Tabelas

Manuscrito I

Table 1 - Gallbladder total volume (μL) in *Poecilia vivipara* exposed for 96 h to water phenanthrene concentrations of 10, 50, 200 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$; bile phenanthrene equivalent metabolites in diluted bile (500x) and nondiluted bile ($\mu\text{g L}^{-1}$); bioconcentration factor ($\text{BCF}_{\text{bile}} = [\text{PHE}_{\text{bile}}]/[\text{PHE}_{\text{water}}]$) and log BCF_{bile}33

Manuscrito II

Tabela 1 - Volume total da vesícula biliar (μL), metabólitos equivalentes na bile após correção de diluição (x500) ($\mu\text{g L}^{-1}$), fator de bioconcentração ($\text{FBC}_{\text{bile}} = [\text{HPA}_{\text{bile}}]/[\text{HPA}_{\text{água}}]$), e logaritmo do FBC_{bile} de naftaleno, fenantreno e pireno em peixes da espécie *Poecilia vivipara* após 96 h de exposição às concentrações 5, 10, $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno na água, sendo respectivamente de 15, 30, $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de HPA total.55

Manuscrito III

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos registrados nas áreas de estudo dos sistemas estuarinos da Bacia do Pina (SEBP) e de Barra das Jangadas (SEBJ). Variação exibida (valores mínimos e máximos) durante o experimento *in situ* (IS-1 e IS-2) e valores registrados no momento da coleta dos residentes (RE-1 e RE-2).79

Tabela 2 - Concentração na água de hidrocarbonetos aromáticos de petróleo dissolvidos e dispersos (HAPDDs) expressos em equivalentes de fenantreno e criseno ($\mu\text{g L}^{-1}$); concentração em metabólitos equivalentes dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile fenantreno ($\text{HPA}_{\text{bile-Fen}}$) e criseno ($\text{HPA}_{\text{bile-Cri}}$) ($\mu\text{g L}^{-1}$), Log fator de bioconcentração biliar ($\text{FBC}_{\text{bile}}^a$) de fenantreno e criseno; em peixes da espécie *Poecilia vivipara*. Resultados (média $\pm$ D.P.) envolvem indivíduos expostos por 96 h *in situ* (IS) nos sistemas estuarinos Bacia do Pina (SEBP-IS1) e de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em exemplares residentes (RE) coletados nestas áreas (SEBP-RE1 e SEBJ-RE2).81

Resumo

Abordagens integradas usando respostas biológicas em múltiplos níveis de organização são essenciais para o monitoramento ambiental de estuários tropicais com ferramentas ecologicamente relevantes. Biomarcadores químicos, bioquímicos e comportamentais foram quantificados para avaliar o risco ecológico da exposição do peixe *Poecilia vivipara* a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Foram avaliados a bioconcentração de metabólitos de HPAs na bile, biomarcadores bioquímicos e comportamentais, nas situações de exposição: (i) ao fenantreno em laboratório, seguida de quantificação dos metabólitos por fluorescência fixa (FF), e avaliação da captura presas, da resistência e velocidade natatórias; (ii) a mistura dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno em laboratório, seguida da quantificação dos metabólitos por FF e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE/F), e avaliação da velocidade natatória; (iii) em campo no sistema estuarino da Bacia do Pina (SEBP), e no sistema estuarino de Barra de Jangadas (SEBJ), em gaiolas (*in situ* - IS) ou livres (coleta de residentes - RE), com medidas de concentração de HPAs na água, seguida da quantificação dos metabólitos biliares por FF, da atividade das enzimas etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glutathione-S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE), e da resistência e velocidade natatórias. Concentrações internas de HPAs na bile dos peixes expostos aumentaram em padrão dose-dependente em laboratório, o que reflete parcialmente previsões de bioconcentração a partir do coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), sendo a técnica FF adequada para ambos laboratório e campo. A exposição ao fenantreno reduziu significativamente a captura de presas e a resistência natatória, e provocou alterações significativas na velocidade natatória e na trajetória dos peixes. A exposição à mistura de HPAs alterou a velocidade e resistência natatórias. No estudo de campo, foi evidenciada contaminação significativa de ambos sistemas estuarinos por HPAs, com maiores concentrações de fenantreno e criseno na bile dos peixes residentes no SEBP, em acordo com a significativa indução da EROD e GST nestes indivíduos. Três dos quatro pontos apresentaram concomitante indução da GST e perda da resistência natatória dos indivíduos, o que sugere uma possível correlação preditiva entre GST e este efeito comportamental relevante para a espécie. Não foram detectados indícios de pesticidas inibidores da AChE, exceto na região interna do SEBP. Este estudo desenvolveu e testou metodologias que permitem o uso de *Poecilia vivipara* no

monitoramento ambiental, relacionando concentrações internas de exposição a HPAs na bile, biomarcadores bioquímicos e alterações comportamentais ecologicamente relevantes. As informações fornecidas por este estudo corroboram a viabilidade e coerência dos resultados sobre a concentração de metabólitos de HPAs obtidos por fluorescência fixa, e facilitam o uso da espécie no monitoramento da contaminação a partir da análise de HPAs na bile de *P. vivipara*. Este estudo demonstra a viabilidade e potencial da utilização do barrigudinho *P. vivipara* em estratégias relacionando concentrações internas de exposição a HPAs na bile, biomarcadores bioquímicos e alterações comportamentais ecologicamente relevantes, para a avaliação e monitoramento da poluição em estuários ao longo da costa brasileira.

Palavras-chave: peixes; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; metabólitos biliares; fluorescência fixa; cromatografia líquida; EROD; GST; AChE; velocidade natatória; resistência natatória; captura de presas; exposição *in situ*; biomonitoramento.

Abstract

Integrated approaches using biological responses in multiple organization levels are essential for environmental monitoring of tropical estuaries with ecologically relevant tools. Chemical, biochemical and behavioral biomarkers were measured to evaluate the ecological risk of exposing the fish *Poecilia vivipara* to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). We evaluated the bioconcentration of PAH metabolites in bile, biochemical and behavioral biomarkers in the following exposure situations: (i) phenanthrene in the laboratory, followed by quantification of metabolites by fixed fluorescence (FF), and evaluation of prey capture, swimming speed and resistance; (ii) mixture of PAHs naphthalene, phenanthrene, and pyrene in the laboratory, followed by quantification of metabolites by FF and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC/F), and evaluation of the swimming speed; (iii) in the field at the Pina Basin Estuarine System (PBES), and at Barra de Jangadas Estuarine System (BJES), in cages (in situ - IS) or free (collection of residents - RE), with PAH concentration measurements in water, followed by quantification of bile metabolites by FF, activity of enzymes ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), glutathione S-transferase (GST) and acetylcholinesterase (AChE), and swimming speed and resistance. Internal concentrations of PAHs in exposed fish bile increased in a dose-dependent pattern in the laboratory, which partly reflects bioconcentration forecasts from the octanol-water partition coefficient (K_{ow}), FF technique being suitable for both laboratory and field. Exposure to phenanthrene reduced the capture of prey and swimming resistance, and caused significant changes in swimming speed and trajectory of fish. Exposure to a PAH mixture affected swimming speed and resistance. In the field study, significant contamination was observed in both estuarine systems by PAHs, with higher concentrations of phenanthrene and chrysene in the bile of resident fish in SEBP, in accordance with the significant induction of EROD and GST in these individuals. Three of the four points presented concomitant induction of GST and loss of swimming resistance of individuals, which suggests a possible predictive correlation between GST and this behavioral effect relevant for the species. No evidence of pesticides that inhibit acetylcholinesterase was found, except in the inner region of BPES. This study developed and tested methodologies that allow the use of *Poecilia vivipara* in environmental monitoring, linking internal concentrations of exposure to PAHs in bile, biochemical biomarkers and ecologically relevant behavioral changes.

The information provided by this study corroborate the efficiency and consistency of results from the concentration of PAH metabolites obtained by fixed fluorescence, and facilitate the use of the species in the monitoring of contamination from analysis of PAHs in bile of *P.vivipara*. This study demonstrates the feasibility and potential of using the guppy *P. vivipara* in strategies relating internal concentrations of exposure to PAHs in bile, biochemical biomarkers and ecologically relevant behavioral changes, for the evaluation and monitoring of pollution in estuaries along the Brazilian coast.

Keywords: Fish; polycyclic aromatic hydrocarbons; biliary metabolites; fixed fluorescence; liquid chromatography; EROD; GST; AChE; swimming speed; swimming resistance; prey capture; in situ exposure; biomonitoring

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia pode ser definida como a ciência que estuda os efeitos deletérios não-intencionais causados por compostos químicos em ecossistemas e organismos constituintes (Walker, 2005). Apesar da existência de registros sobre o conhecimento da relação entre distúrbios biológicos e o meio ambiente há mais de dois mil anos (Roméo and Giambérini, 2012), a ecotoxicologia é uma ciência relativamente recente, com seu reconhecimento mundial a partir dos anos 60 (Zagatto, 2008). Sua projeção se deve, em grande parte, à repercussão causada após a publicação do livro de Rachel Carson, relatando estudos de inúmeros cientistas da época que demonstravam como o uso irracional de pesticidas organoclorados podia causar efeitos tóxicos sobre organismos vivos, em seu livro “Silent Spring”. A partir desta publicação desencadeou-se um debate histórico sobre o uso de pesticidas químicos, a responsabilidade da ciência e os limites do progresso tecnológico (Carson, 1962). A obra de Carson pode ser considerada pioneira para a divulgação a nível mundial de conceitos básicos da Ecotoxicologia, além do reconhecido impacto sobre as questões ambientais e sobre o movimento ambientalista como um todo, e que revolucionou o pensamento a nível mundial. Cabe salientar que “Silent Spring” é um dos 50 livros mais importantes do Século XX. E esta divulgação de ideias fundamentais ocorreu antes mesmo que a palavra Ecotoxicologia existisse, uma vez que o termo Ecotoxicologia foi cunhado em 1969 por René Truhaut (Truhaut, 1977), que enxergou a fundamental importância de se tentar fundir os conceitos fundamentais da Toxicologia com os conceitos fundamentais da Ecologia, com o intuito de se tentar compreender de forma integrada a complexa temática dos efeitos tóxicos dos contaminantes químicos nos ecossistemas e nas espécies constituintes.

Testes ecotoxicológicos são ferramentas fundamentais desta ciência, principalmente devido ao fato de que critérios de qualidade da água são baseados em dados de exposições e efeitos em laboratório (Roberts et al., 2002). Ao longo das últimas décadas, os testes foram amplamente utilizados em laboratório com a finalidade de avaliar o potencial de riscos a substâncias puras, a misturas de compostos ou a amostras ambientais, como sedimentos ou efluentes tóxicos (Aragão and Araújo, 2006).

Uma grande variedade de testes ecotoxicológicos foi padronizada visando a repetibilidade e reprodutibilidade, sendo tradicionalmente divididos em relação ao tipo de exposição, aguda ou crônica, e às respostas avaliadas nestes testes, letais ou subletais (Sousa, 2002). A maior parte destes testes padronizados foi desenvolvida utilizando invertebrados, devido a características como ciclo de vida curto e tamanho reduzido, que implicam na conveniência e baixo custo de realização (Araújo-Castro et al., 2009). Apesar disso, o uso de peixes no campo da ecotoxicologia tem posição de destaque, provavelmente mais do que qualquer outra classe de organismos (Di Giulio, 2008). A justificativa pode estar no papel desempenhado pelos peixes, de significativa relevância para a

sociedade, considerando tanto aspectos econômicos, como no caso de pescarias comerciais, quanto em aspectos ecológicos, tendo em vista representarem o mais diverso grupo de vertebrados, e exercerem as mais variadas funções dentro dos ecossistemas aquáticos (Cossins and Crawford, 2005; Di Giulio, 2008). Por este motivo, há um elevado quantitativo de estudos resultantes de testes tradicionais com peixes disponíveis em bancos de dados, que são amplamente utilizados por agências reguladoras da qualidade ambiental para nortear ações preventivas (Aragão and Araújo, 2006). Estes testes geralmente são baseados em uma faixa de concentração dentro da qual o efeito pode se iniciar, e são usualmente expressos em concentrações letais, efetivas ou inibidoras para 50% dos organismos (Chapman et al., 1995). Entretanto, Denton et al. (1994) questionam a segurança deste tipo de abordagem em avaliações de impacto. Os autores observaram, com base em uma série de dados, que o real valor de concentração a partir do qual o efeito aparece está sempre situado abaixo dos 25% na interpolação dose-resposta, o que poderia levar a uma subestimação dos efeitos em concentrações que estejam abaixo da observada para 50% dos organismos. Desta forma, diante da fragilidade de algumas abordagens em relação à segurança em prevenir danos ao ecossistema, a abordagem usando biomarcadores é tida como promissora para a sinalização de respostas biológicas significativas, e ainda preventivas (van der Oost et al., 2003; Carvan et al., 2008).

O termo biomarcador sintetiza o estudo das respostas biológicas aos contaminantes, e pressupõe o conceito de vigilância biológica, que tem a finalidade de sinalizar precocemente possíveis efeitos capazes de comprometer a manutenção de funções vitais desde o indivíduo até populações (Roméo and Giambérini, 2012). Diversas definições têm sido atribuídas ao longo da história da abordagem dos biomarcadores, que foram classificados funcionalmente como de exposição, de efeito e de suscetibilidade (Cajaraville et al., 2000). A definição proposta por McCarthy e Shugart (1990) restringiu a aplicação do termo a medidas a nível molecular, bioquímica ou celular em organismos expostos. Mais tarde, Depledge (1994) contribuiu para a abrangência do termo, elevando o nível hierárquico de organização biológica ao acrescentar medidas em relação ao comportamento individual dos organismos. Redefinições restringindo o termo apenas a medidas bioquímicas não foram bem aceitas pela comunidade científica (Van der Oost et al., 2005), que alegou a preocupação em não negligenciar as respostas (e.g. fisiológicas, comportamentais) que podem ser utilizadas em avaliações de risco envolvendo uma mudança de escala de organização biológica de indivíduos para a população (Roméo and Giambérini, 2012).

A utilização destes biomarcadores em abordagens integradas investigando exposição e efeito e em múltiplos níveis de organização tem sido sugerida como estratégia em avaliações de qualidade da água (Fonseca et al., 2011). Pampanin et al. (2006) denominou como “essenciais” para estes estudos um grupo de biomarcadores já bem estabelecidos em laboratório e em estudos ambientais,

no qual estão incluídas as enzimas de biotransformação 7-etoxirresorufina-O-deetilase (EROD) (fase I) e glutathione S-transferase (GST) (fase II), a inibição da acetilcolinesterase (AChE) e metabólitos de compostos fluorescentes na bile. A incorporação de medidas comportamentais nestas estratégias multi-biomarcadores para o monitoramento ambiental pode fornecer respostas que integrem efeitos em diferentes níveis de organização biológica, ligando respostas subcelulares e mecanismos fisiológicos a alterações ecologicamente relevantes (Scott and Sloman, 2004). Dentre estes biomarcadores comportamentais, aqueles relacionados à natação são de especial interesse, tendo em vista sua relevância para diversas atividades fundamentais em peixes (Little et al., 1990).

A aplicação destes parâmetros em um cenário real de avaliação ambiental, como em estudos *in situ*, utilizando espécies aclimatadas em laboratório, introduz diversos fatores (e.g. amplas variações de temperatura, pH e oxigênio, presença de múltiplas fontes de compostos) que estão ausentes em estudos em laboratório, devido à manutenção de condições controladas, e oferecem maior robustez ecológica aos resultados (Castro et al., 2004; Camargo and Martinez, 2006; Hanson and Larsson, 2011; Kerambrun et al., 2011; Miller et al., 2014). Estes estudos geralmente são de curta duração e promovem respostas rápidas sobre a qualidade da água e/ou sedimento com uma boa relação custo/eficácia (Castro et al., 2004). Assim, o tipo de estratégia de avaliação vai direcionar as informações geradas, em relação à obtenção de respostas, se decorrentes de distúrbios recentes ou crônicas, decorrentes de exposições de longa duração (Winter et al., 2005), e a comparação destas permite melhores interpretações sobre variações no tempo de resposta, ou possíveis adaptações e/ou susceptibilidade em relação aos parâmetros aplicados (Winter et al., 2005; Lurman et al., 2010). Neste sentido, a avaliação destas respostas aos contaminantes aquáticos ganha uma abordagem ainda mais ampla quando são utilizadas espécies sentinelas ou residentes.

Segundo Berthet (2012), o papel das espécies sentinelas como organismos bioindicadores para revelar precocemente a presença e a toxicidade de um ou vários poluentes no ambiente é baseado no conceito de que, após a introdução de tais substâncias, os primeiros efeitos são observados ao nível do organismo, para então afetar a população, a comunidade, e em última análise, o ecossistema como um todo, como ilustrado no esquema abaixo (figura 1). Estes organismos tem capacidade de, mesmo afetados, permanecer em um ambiente pouco favorável e assim, revelar alterações que vão desde a bioacumulação e bioconcentração das substâncias em tecidos e fluidos corpóreos, a alterações nos parâmetros biológicos em vários níveis de organização biológica (molecular, celular, fisiológica, individual, etc.), que conduzam ao comprometimento da sua capacidade reprodutiva e sobrevivência, e a potenciais perturbações da estrutura e funcionamento do ecossistema em longo prazo (Bayne et al., 1985; Berthet, 2012). Ao possibilitar a detecção precoce destes distúrbios, as espécies sentinelas aumentam as chances de que sejam

remediadas ou revertidas as respostas biológicas, observadas a partir dos biomarcadores, e também aumentam a oportunidade de definir a fonte de contaminação (van der Oost et al., 2003).

A escolha de uma espécie sentinela deve considerar aspectos como facilidade para coleta e manutenção em laboratório e principalmente aspectos relevantes em termos ecológicos (Berthet, 2012). A espécie *Poecilia vivipara* apresenta características favoráveis à sua utilização como espécie sentinela, dentre elas a sua sensibilidade reconhecida em laboratório a diversos contaminantes ambientais (Araújo et al., 2001; Mattos et al., 2010; Ferreira et al., 2012; Machado et al., 2014; Torreiro-Melo et al., 2015), a viabilidade de sua utilização em estudos de exposição *in situ* conduzidos em gaiolas (INCT-TA, 2014) e, ainda, ocorrência natural nas áreas as quais se pretende avaliar. Por estas características, esta espécie é um modelo promissor para o uso em estratégias de monitoramento em ecossistemas costeiros tropicais e subtropicais.

Finalmente, a estratégia ou conjunto de estratégias adotadas para a avaliação de risco ecológico deve considerar o tipo e dinâmica do ambiente, além dos possíveis contaminantes cujos efeitos e exposição serão investigados, uma vez que as respostas biológicas e mecanismos de ação irão variar em função destes fatores (Billiard et al., 2008; Landrum et al., 2013; Armstrong et al., 2015). No caso de ambientes estuarinos e costeiros, áreas geralmente com significativa influência de atividades poluidoras, um das classes de contaminantes aquáticos mais frequentes e em concentrações potencialmente perigosas são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) (Zanardi et al., 1999; Albers, 2003).

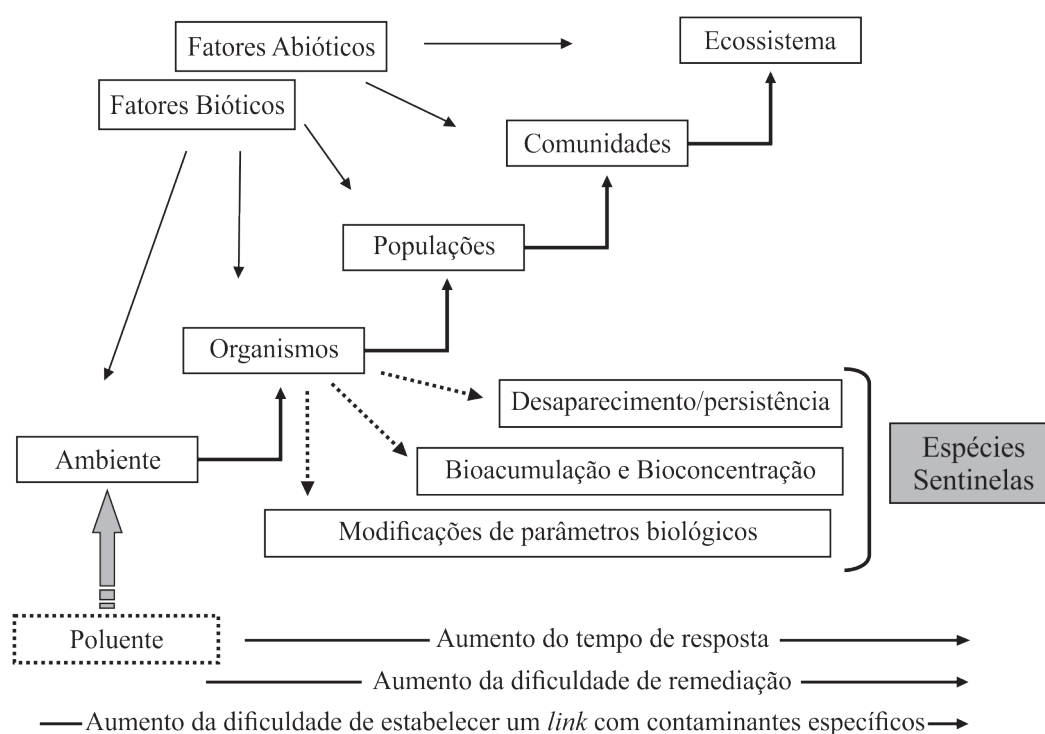


Figura 1 - Posição das espécies sentinelas nos vários níveis de organização biológica em resposta a poluentes. Adaptado de Berthet (2012).

Devido ao elevado potencial tóxico (USEPA, 2014), estes compostos têm sido alvo, ao longo de décadas, em estudos avaliando uma grande diversidade de efeitos tóxicos em peixes, incluindo efeitos bioquímicos (Kopecka-Pilarczyk and Correia, 2009), histopatológicos (Simonato et al., 2008), carcinogênicos e mutagênicos (Varanasi, 1989; Akaishi et al., 2004), imunológicos (Kerambrun et al., 2012), genéticos (Machado et al., 2014) e comportamentais (Little et al., 1990; Weis et al., 2003; Carvalho et al., 2008), os quais têm sido verificados tanto em estudos realizados em laboratório quanto em campo e no monitoramento de áreas impactadas por estes compostos (Payne et al., 2003).

Neste contexto, a presente tese teve como objetivo avaliar o risco ecológico de hidrocarbonetos aromáticos de petróleo ao nível de biotransformação, geração de metabólitos biliares e comportamental em peixes da espécie *Poecilia vivipara*, a partir de estratégias de exposição em laboratório, *in situ* e de animais residentes em campo.

Para atender ao objetivo geral proposto, a presente tese é composta por três manuscritos, estruturados da seguinte forma (figura 2):

Manuscrito I (*Chemosphere*, volume 132: 17-23)

Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*.

Objetivo geral

Verificar relações dose-resposta entre metabólitos biliares de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e comportamento do barrigudinho *Poecilia vivipara* após exposição ao fenantreno na água.

Objetivos específicos

Após realizar exposição em laboratório por 96 horas de *P. vivipara* ao HPA fenantreno em diferentes concentrações, avaliar:

- A bioconcentração de metabólitos de fenantreno na bile, após quantificação por FF;
- Respostas subletais em relação à velocidade, resistência e trajetória natatória;
- A relação das respostas comportamentais observadas e as concentrações de metabólitos de fenantreno na bile.

Manuscrito II

Avaliação dos padrões de fluorescência biliar, bioconcentração e velocidade natatória do barrigudinho estuarino *Poecilia vivipara* após exposição ao naftaleno, fenantreno e pireno.

Objetivo geral

Verificar relações dose-resposta entre metabólitos biliares de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) quantificados por fluorescência fixa (FF) e cromatografia líquida com detectores de fluorescência (CLAE/F) e comportamento do barrigudinho *Poecilia vivipara* após exposição a uma mistura de naftaleno, fenantreno e pireno na água.

Objetivos específicos

Após realizar exposição em laboratório por 96 horas de *P. vivipara* a uma mistura dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno em diferentes concentrações, avaliar:

- A viabilidade do uso das metodologias de quantificação de metabólitos na bile por CLAE-F e FF na espécie *P. vivipara* exposta a uma mistura ambientalmente relevante dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno dissolvidos na água;
- A bioconcentração de metabólitos dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno na bile de *P. vivipara*;
- Avaliação da atividade natatória em diferentes concentrações de metabólitos dos HPAs na bile.

Manuscrito III

Uma abordagem com múltiplos biomarcadores focados no barrigudinho *Poecilia vivipara* para avaliação da poluição química em dois estuários tropicais brasileiros.

Objetivo geral

Aplicação de uma abordagem com múltiplos biomarcadores utilizando indivíduos de *P. vivipara* mantidos em laboratório para exposições *in situ* (IS), e indivíduos residentes (RES) coletados em dois estuários costeiros, o sistema estuarino da Bacia do Pina (SEBP), e o sistema estuarino de Barra de Jangada (SEBJ), para avaliação da qualidade destes estuários.

Objetivos específicos

Após realizar coleta de peixes residentes e exposição *in situ* de peixes aclimatados em laboratório, avaliar:

- A bioconcentração de metabólitos dos HPAs fenantreno e criseno na bile, após quantificação por FF;
- Respostas comportamentais em relação à velocidade e resistência natatória;

- Respostas bioquímicas em relação à biotransformação de fase I e fase II e acetilcolinesterase;
- A relação das respostas observadas e das concentrações de metabólitos dos HPAs fenantreno e criseno na bile e concentrações destes compostos na água (dispersos e/ou dissolvidos).

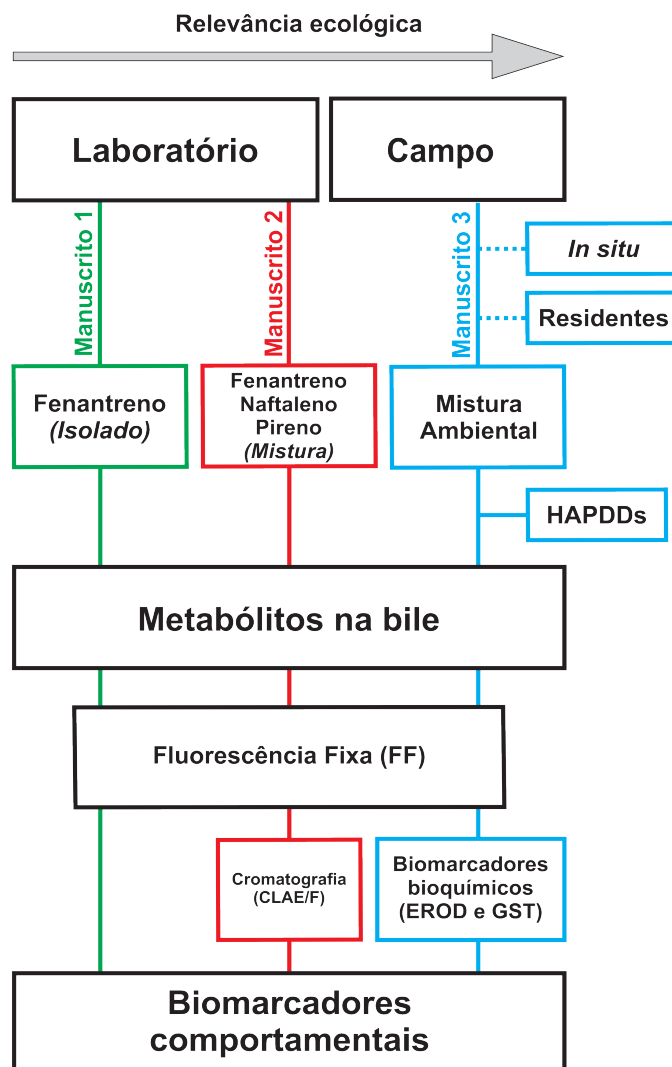


Figura 2 - Representação esquemática da tese. Manuscrito I – Representado pelas linhas verdes; Manuscrito II – Representado pelas linhas vermelhas; Manuscrito III – Representado pelas linhas azuis.

MANUSCRITO I

**BIOCONCENTRATION OF PHENANTHRENE AND METABOLITES IN BILE AND BEHAVIORAL
ALTERATIONS IN THE TROPICAL ESTUARINE GUPPY *Poecilia vivipara***

ABSTRACT

Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites in fish bile is widely used to evaluate levels of internal PAH contamination in fish, whereas behavioral effects are deemed important to address potential risks to fish populations. The estuarine guppy *Poecilia vivipara* was exposed for 96 h to waterborne phenanthrene at concentrations of 10, 50, 200 and 500 μgL^{-1} . Phenanthrene and metabolites in bile were analyzed by fixed fluorescence at 260/380 nm (excitation/emission) wavelengths. Phenanthrene increased in the bile of exposed fish in a dose-dependent pattern, and log bile bioconcentration factors ranged from 4.3 to 3.9 at 10 and 500 μgL^{-1} phenanthrene, respectively, values that are similar to predicted bioconcentration factors based on phenanthrene K_{ow} . Swimming resistance index was reduced to 81% of control values at 500 μgL^{-1} . Alteration of swimming speed was non monotonic, with a significant speed increase relative to control fish in treatments 50 and 200 μgL^{-1} phenanthrene, respectively, followed by a speed decrease in fish exposed to 500 μgL^{-1} . However, swimming trajectories of fish exposed to 50, 200 and 500 μgL^{-1} was altered by the development of a repetitive circular swimming behavior, in contrast to the controls that explored the entire experimental arena. This change in swimming patterns apparently explains the reduction in prey capture rates at 200 μgL^{-1} phenanthrene. This study provides important information enabling the use of the estuarine guppy *P. vivipara* to monitor PAH metabolites in bile and its bioconcentration, linking internal exposure with ecologically relevant behavioral effects in the species.

Keywords: Poeciliidae; polycyclic aromatic hydrocarbon; swimming resistance; swimming speed; prey capture.

1. INTRODUCTION

The main anthropogenic sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine areas include burning of fossil fuels, release of domestic and industrial effluents, and leaks during the production, transportation, refining and distribution of oil (Albers, Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons). These different sources can provide a significant amount of PAHs to aquatic coastal environments, and the concentrations of total PAHs in waters of contaminated areas in different marine regions around the world, including North America, Europe, Asia and South America, can reach values higher than $40 \mu\text{g L}^{-1}$ (Latimer and Zheng, The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment, Zanardi *and others.*, Dissolved/dispersed Petroleum Aromatic Hydrocarbons in the São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil).

Phenanthrene (PHE) is a 3-ring PAH abundant in petroleum (Carls *and others.*, Synthesis of the toxicological impacts of the Exxon Valdez oil spill on Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Prince William Sound, Alaska, U.S.A.), which significantly contributes to the toxic effects that PAH mixtures cause in early stages of fish development. These effects include mortality, craniofacial deformities, swimming impairment and reductions in growth, as observed in pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* and Pacific herring *Clupea pallasii* (Barron *and others.*, Evaluation of Fish Early Life-Stage Toxicity Models of Chronic Embryonic Exposures to Complex Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixtures). In addition, larvae of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to a mixture of PAHs including phenanthrene developed a syndrome of cardiac dysfunction effects, edema and craniofacial deformities (Incardona *and others.*, Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons).

PAHs bioavailable in water are absorbed mainly through the gills of fish (Baussant *and others.*, Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil). Then, they are biotransformed by phase I and phase II enzymes in liver, involving different reactions of hydroxylation and conjugation, and resulting in hydrophilic metabolites (Meador, Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms). Metabolites generated and parent PAHs are concentrated and stored in the bile within the gall bladder.

Once in the bile, metabolites can be discharged into the digestive tract (Ruddock *and others.*, Bile Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Three Species of Fish from the Severn Estuary, Varanasi and Stein, Disposition of xenobiotic chemicals and metabolites in marine organisms), hydrolyzed and returned back to the liver via the enterohepatic circulation (Beyer *and others.*, Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review), thus increasing their potential for toxicity in different sites of action until they are finally excreted. While circulating among the different internal tissues of fish,

PAHs and their metabolites are responsible for biochemical, histopathological, immunological, genetic, reproductive, and behavioral effects, which have been verified by field and laboratory studies (Payne *and others.*, Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish). Furthermore, impacts on fish populations have been related to the presence of these compounds in the environment, as observed after the accident with the Exxon Valdez in Alaska's coast where recruitment of Pacific herring and pink salmon was compromised (Carls and others., Synthesis of the toxicological impacts of the Exxon Valdez oil spill on Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Prince William Sound, Alaska, U.S.A.). More recently, the population of killifish (*Fundulus grandis*) was affected after the Deepwater Horizon spill in the Gulf of Mexico (Dubansky *and others.*, Multitissue Molecular, Genomic, and Developmental Effects of the Deepwater Horizon Oil Spill on Resident Gulf Killifish (*Fundulus grandis*)). The understanding of the complex sequence of effects that can result from exposure to different levels of PAH contamination can be facilitated by the quantification of the contaminants in internal tissues of exposed organisms, as proposed in the tissue residue approach (McElroy *and others.*, A review of the tissue residue approach for organic and organometallic compounds in aquatic organisms). Fluorimetric determination of PAHs in bile as a measure of internal dose and biliary bioconcentration (Förlin and Wachtmeister, Fish Bile Analysis for Monitoring of Low Concentrations of Polar Xenobiotics in Water), although underexplored (McElroy and others., A review of the tissue residue approach for organic and organometallic compounds in aquatic organisms), may represent a promising way of relating internal contamination with biological effects (Meador, Rationale and Procedures for Using the Tissue-Residue Approach for Toxicity Assessment and Determination of Tissue, Water, and Sediment Quality Guidelines for Aquatic Organisms).

The quantification of metabolites in fish bile is considered a sensitive parameter to assess recent exposure to PAHs, being widely applied to monitor levels of PAHs in different environments (Beyer and others., Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review). Among the available methods, fixed fluorescence (FF), based on direct reading of the fluorescence of diluted bile, presents an excellent benefit-cost ratio, allowing rapid semi-quantitative assessment of PAH metabolites in fish (Beyer and others., Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review).

Dose-response relationships based on levels of PAH metabolites in bile and PAH toxic effects have been reported in both field and laboratory studies. Effects observed include the induction of phase I enzymes (Lee and Anderson, Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills), changes in phase II and antioxidant enzymes (Gravato and Guilhermino, Effects of Benzo(a)pyrene

on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Biomarkers, Growth and Behavior), as well as genotoxic effects (Aas *and others.*, PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod). However, dose-response relationships between PAH metabolites in bile and behavioral effects are scarce in the literature, although behavioral biomarkers are deemed important to integrate biochemical and physiological effects with ecologically relevant effects to the integrity of populations (Scott and Sloman, The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity). Among numerous aspects of fish behavior that have been affected by PAH exposure, changes in swimming behavior (Little and Finger, Swimming Behavior as an Indicator of Sublethal Toxicity in Fish) and the ability to capture prey (Carvalho *and others.*, Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis*, Weis *and others.*, Evaluating prey capture by larval mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a potential biomarker for contaminants) are fundamental survival skills in natural ecosystems to avoid predation, to find reproductive partners, and to grow (Barry, Application of a novel open-source program for measuring the effects of toxicants on the swimming behavior of large groups of unmarked fish, Scott and Sloman, The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity).

The estuarine guppy *Poecilia vivipara* is an euryhaline teleost fish commonly found in both fresh and coastal water bodies along the South Atlantic Ocean (Gomes Jr and Monteiro, Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): Test of an ecomorphological paradigm). This species is being used as a biological model to assess effects of contaminants in tropical and subtropical coastal regions in Brazil (INCT-TA, Brazilian National Institute of Science and Technology – Aquatic Toxicology. <http://www.inct-ta.furg.br/> (accessed in March 2014)). Thus, the objective of the present study was to evaluate bile bioconcentration factors in *P.vivipara* exposed to waterborne phenanthrene, and relate it to behavioral effects associated to prey capture ability and swimming resistance, speed and trajectory.

2. METHODOLOGY

2.1. Animal collection and laboratory acclimation

Guppies *P. vivipara* (Bloch; Schneider, 1801) were captured using hand operated nets in the channel connecting Tejiþió River Estuary to Araçá Lagoon. Tejiþió River is 23 km long, and its drainage basin is within the metropolitan region of Recife, with an area of 93.6 km². Araçá Lagoon is an urban lagoon with 14.5 ha that is legally a preservation area (Recife, Pernambuco, northeastern Brazil; 8°05'35.6"S, 34°55'04.5"W). Fish were removed from the net, immediately put in 100L plastic tanks, and transported to the laboratory in continuously aerated water from the sampling site. After arrival, water from the site at salinity 18 was mixed with seawater of same salinity, and fish were transferred to 1,000 L tanks with recirculating filtered (1 to 5 µm) seawater and biological filters. Salinity was increased at a rate of 1 salinity unit per day, and fish were kept for 8 weeks at salinity 25 and temperature 25 °C until the experiments. Photoperiod was fixed at 12h L: 12h D. Water pH was 8.3 and dissolved oxygen content was maintained above 6 mg L⁻¹. Fish were fed twice daily with nauplii of *Artemia sp* and commercial fish food with 45% protein (Alcon Artemia, Camboriu, Brazil).

2.2. Phenanthrene treatments preparation

A primary 20 g L⁻¹ stock solution was prepared with phenanthrene 98% pure (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). A secondary 4 g L⁻¹ phenanthrene solution was prepared by dilution with DMSO, and different volumes of these solutions were added daily into mixing aquariums with 20 L to achieve concentrations of phenanthrene (10, 50 and 200 and 500 µg L⁻¹). Solvent control treatment was prepared by addition of 200 µL of DMSO into 20 L mixing aquariums.

A calibration curve for determination of phenanthrene in seawater was prepared by direct readings of fluorescence in 300 µL water samples from aquaria after mixing of phenanthrene stock solutions. Fluorescence measurements were performed using a SpectraMax M3 spectrofluorometer (Molecular Devices, EUA) at the wavelengths of 260/380 nm (excitation/emission)(Krahn *and others.*, Analyses for petroleum-related contaminants in marine fish and sediments following the Gulf oil spill). Phenanthrene concentrations in the experimental media were measured daily and were within 5% of the nominal concentrations after each daily water renewal. The detection limit was 2 µg L⁻¹.

2.3. Exposure

A semi-static exposure was performed in 22 L aquarium containing 15 L of seawater (salinity 25 units, mean temperature ± SD = 25.0 °C ± 0.5) and 15 fish. During the 96-h exposure

period fish were not fed and experimental media was completely renewed every 24-h. Two different exposure experiments followed by quantification of effect endpoints were performed, as described below.

In the first experiment, fish were exposed (96 h) to waterborne phenanthrene at concentrations of 10, 50, 200 and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ plus controls (without and with solvent). Phenanthrene metabolites in bile were quantified after evaluation of spontaneous swimming speed in the absence of prey, swimming resistance and swimming trajectories of individual fish. Fish used in this experiment had an average of 40 mm total body length to facilitate the analysis of bile metabolites. In the second experiment, fish were exposed to waterborne phenanthrene at concentrations of 10, 50 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ plus controls (without and with solvent). Spontaneous swimming speed in the absence and in the presence of prey, prey capture rate and swimming trajectory were evaluated in individual fish. Fish used in this experiment had an average of 30 mm total body length.

2.4. Determination of metabolites in bile

After euthanization in water at 2 °C, fish were measured (total body length to the nearest mm), weighed (whole body mass to the nearest 0.0001 g), and had their gallbladder dissected. Entire gallbladders were transferred to 2 mL microtubes and weighed on an analytical scale (precision: 0.0001 g) and bile volume was estimated assuming that 1 mg of bile is equivalent to 1 μL . Bile samples were immediately diluted to 1:500 (v/v) with HPLC grade methanol/water 50% (v/v) and analyzed using the fixed wavelength fluorescence (FF) method (excitation: 260 nm; emission: 380 nm) (Krahn and others., Analyses for petroleum-related contaminants in marine fish and sediments following the Gulf oil spill). Measurements were performed using 96-well black plates in a Spectramax M3 spectrofluorometer. Fluorescence readings detected in bile of control fish were subtracted from the average fluorescence observed in fish from different treatments. These values were converted to phenanthrene equivalent concentrations based on a calibration curve built from 14 concentrations of phenanthrene dissolved in methanol/water 50% (v/v) ranging from 4.8 to 10,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. The calibration curve relating the concentration of phenanthrene dissolved in 50% methanol/water and their relative fluorescence units (RFUs) was expressed by the following linear equation:

$$\text{RFU} = 132 + 0.882 * C$$

where: C is the phenanthrene concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) in bile sample.

Bile bioconcentration factors (BCF_{bile}) for PHE were determined as the ratio between the total concentration of PHE equivalents in bile and the PHE water concentration in exposure aquariums according to the equation:

$$BCF_{bile} = ([PHE_{bile}] / [PHE_{water}])$$

2.5. Behavioral Biomarkers

2.5.1. Swimming Resistance

Fish were individually tested to assess swimming resistance, defined as the ability to swim in a counter-current flow of water whose speeds are gradually increased until the fish is dragged out of the experimental system (Little and Finger, Swimming Behavior as an Indicator of Sublethal Toxicity in Fish). The test system included a 1,200 L min⁻¹ submersible pump (Atman model AT-305) submerged in an 45 L tank. Water was pumped through a system of PVC pipes with a section made of transparent acrylic pipe, where fish was kept during testing. After fish introduction into the test system, it was exposed to a sequence of increasing water flow rates controlled by a PVC valve, starting with a minimum acclimation flow of 2 L min⁻¹ and increased up to a maximum flow of 12 L min⁻¹, corresponding to a water velocity in the section where the fish was tested of 4.7 cm s⁻¹ up to 28.2 cm s⁻¹, respectively. After a 90 s period of acclimation, test was started from the flow rate of 2 L min⁻¹, which was progressively increased at 1 min intervals by adjustments (increases by half turns) in the PVC valve. The test was terminated when the fish could not swim against the water flow and was carried away from the acrylic tube, falling into a basket in the tank. Swimming resistance was quantified by the Swimming Resistance Index (SRI), based on the equation:

$$SRI = AF + (LFT' / 60) * LF'$$

where: AF = accumulated flow: the sum of the flow rates against which the fish swam for 1 full min (L min⁻¹); LF' = largest flow rate tested at which the fish was carried out of the system (L min⁻¹); LFT' = time in seconds that fish was able to stay in the system at the highest flow rate tested.

2.5.2. Spontaneous swimming speeds

Average spontaneous swimming speeds of fish were evaluated in either the absence or the presence of prey. After 96 h of exposure, 15 fish from the different treatments were individually transferred to experimental aquariums (14 cm long x 10.5 cm wide x 13.5 cm deep) containing 700 ml of water (5 cm depth). The experimental arenas were monitored from above by video cameras with 6–60 mm zoom lenses connected to a video grabber board (GeoVision model GV-900, Irvine, CA) for digital video recordings. One fish from each treatment were simultaneously monitored in each recording session. Recordings were started after 10 min of fish acclimation to the test aquarium, and lasted 30 min in the tests in the absence of prey, or 10 min in the tests in the presence of prey. The videos were processed for the calculation of the average swimming speed using the Smart software (Panlab Harvard Apparatus, USA). In addition, maps of fish swimming trajectories were also analyzed.

2.5.3. Prey capture

The prey capture test was based on quantifying the number of newly hatched nauplii of *Artemia sp* captured by individual fish during 10 min length tests. At each test, 100 nauplii of *Artemia sp* were individually counted and offered to each fish. Fish were removed from the aquariums and remaining nauplii of *Artemia sp* in the aquaria were fixed in 4% formalin and stained with Rose Bengal dye for later counting.

At the end of the behavioral tests, fish were euthanized in water at 2 °C, following international standards (Use of Fishes in Research Committee, Guidelines for use of fishes in research) and the protocol approved by the Ethics Committee for Animal Experiments from Federal University of Pernambuco (UFPE).

2.6. Statistical analyses

For each parameter evaluated, different treatments were compared using one-way ANOVA followed by the Dunnett's test. Data was first checked for normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homoscedasticity (Levene median test). When normality or homoscedasticity was not accepted, the nonparametric Kruskal-Wallis test (K-W) followed by Dunn's test was applied to assess differences between control and exposure treatments. The LOEL (lowest observable effect level) and NOEL (no observable effect level) were estimated from Dunnett or Dunn tests, depending on the assumptions above. Sigmaplot software version 11 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany) was used for all statistical analyzes.

3. RESULTS

In the first experiment, no fish mortality was detected in any treatment after 96 h of exposure, including controls, 10, 50, 200 and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. In the second experiment no fish mortality was detected in controls, 10 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, and a mortality rate of 12% was detected at 200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.1. Phenanthrene and metabolites in bile

Phenanthrene equivalent concentrations in bile provided estimates of internal phenanthrene doses in exposed fish. It is important to mention that this semi-quantitative methodology assumes that fluorescence detected in bile is derived from parent phenanthrene molecules, and phenanthrene metabolites with different fluorescence characteristics might be present. Relative fluorescence units (RFUs) in bile of phenanthrene exposed *P. vivipara* increased in a dose dependent manner (Fig. 1), being significantly higher in fish exposed to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ than in control (K-W, $H_5=60.3$; $p < 0.05$; Dunn, $p < 0.05$). Median RFUs were 196, 241, 717, 2271, 4192 and 8613 in control, solvent control, 10, 50, 200 and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ phenanthrene treatments, respectively. There was no significant difference in RFUs between control and solvent control ($t = -0.59$, Student's test, $p > 0.05$), and a pooled control and solvent control mean RFU value of 226 was calculated. This RFU of 226 found in controls is not related to phenanthrene, but to other possible molecules that fluoresce with the used wavelengths, and was discounted from fluorescence detected in exposed fish to calculate equivalent phenanthrene concentrations in bile. Both bile volume and phenanthrene equivalents in bile of fish augmented with increasing concentrations of waterborne phenanthrene (Table 1). Similar log bile bioconcentration factors ($\log\text{BCF}_{\text{bile}}$) of 4.31 and 4.34 were observed at phenanthrene concentrations of 10 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, and decreased to 4.04 and 3.97 at 200 and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Table 1).

3.2. Swimming resistance

Swimming resistance index (SRI) was significantly reduced in *P. vivipara* exposed to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ of phenanthrene, the highest concentration tested (Fig. 2). These fish showed a SRI of 4.2 ± 8.5 (mean $\pm$ SD), indicating a reduction of 81% in their physical capacity to withstand prolonged swimming against a current when compared to control fish with a SRI of 22.5 ± 13.7 . The LOEL value obtained for swimming resistance was 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ANOVA I, $F_{(5,89)}= 5.2$; $p < 0.05$; Dunnett, $p < 0.05$).

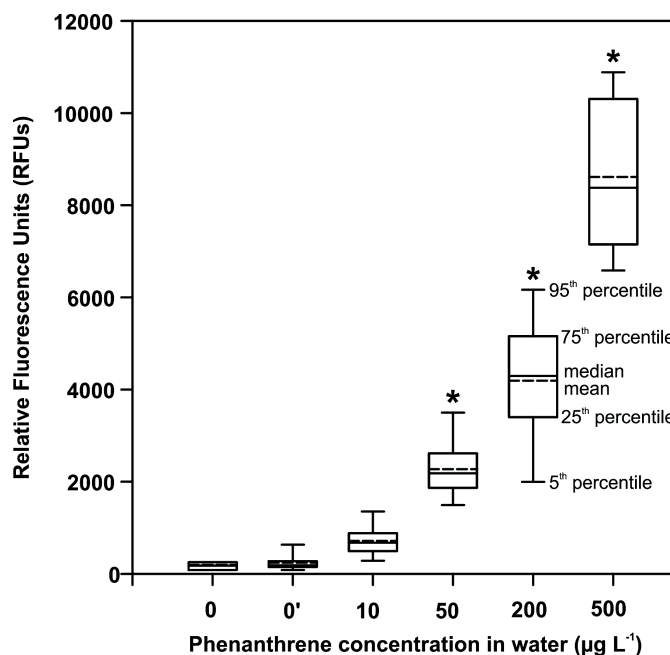


Figure 1 - Relative fluorescence units (RFUs) (median, percentiles and mean, $n = 10$ to 13 fish) in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control, $n=10$; (0') DMSO solvent control (*): statistically different relative to control.

Table 1 - Gallbladder total volume (μL) in *Poecilia vivipara* exposed for 96 h to water phenanthrene concentrations of 10, 50, 200 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; bile phenanthrene equivalent metabolites in diluted bile (500x) and nondiluted bile ($\mu\text{g L}^{-1}$); bioconcentration factor ($\text{BCF}_{\text{bile}} = [\text{PHE}_{\text{bile}}]/[\text{PHE}_{\text{water}}]$) and $\log \text{BCF}_{\text{bile}}$.

Phenanthrene concentration in water $\text{PHE}_{\text{water}}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10	50	200	500
Gallbladder total volume (μL)	3.0	3.4	5.3	7.1
Bile phenanthrene equivalent metabolites PHE_{bile} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	203,884	1,084,604	2,173,801	4,680,271
Bioconcentration factors (BCF_{bile})	20,388	21,692	10,869	9,361
Log BCF_{bile}	4.31	4.34	4.04	3.97

3.3. Spontaneous swimming speeds

Exposure to phenanthrene at 50 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ led to an increase in spontaneous swimming speeds in the absence of prey in *P. vivipara* of 43% and 84%, respectively, when compared with the control treatment, which had a speed of $4.0 \text{ cm s}^{-1} \pm 0.8$ (mean $\pm$ SD) (Fig. 3). However, fish exposed to the highest concentration of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ were lethargic, and their average swimming speed was 40% below that registered for control fish (Fig. 3). The LOEL value for spontaneous swimming in the absence of prey was 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 3: ANOVA I, $F_{(5,85)} = 19.6$; $p < 0.05$; Dunnett, $p < 0.05$). In a second experiment, exposure to 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ led to a 62% increment in spontaneous swimming speeds in *P. vivipara* relative to control speeds both in the absence and presence of prey (Fig.4: K-W, $H_4 = 14.1$; $p < 0.05$; Dunn, $p < 0.05$).

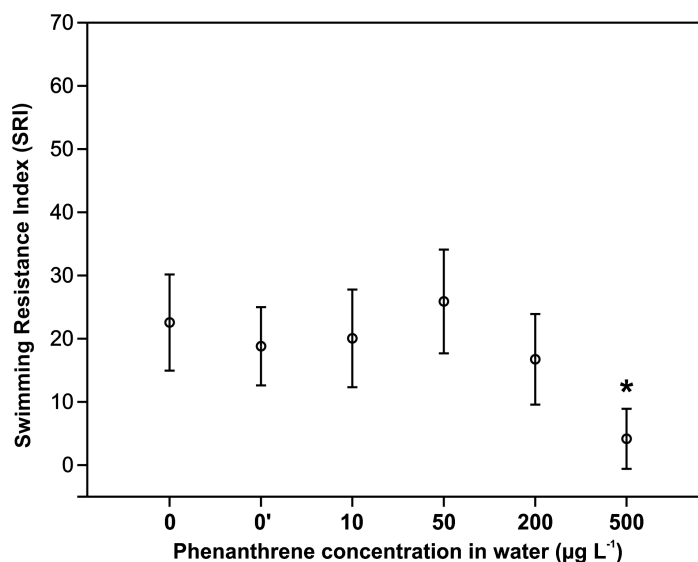


Figure 2 – Swimming resistance index (mean $\pm$ standard deviation, $n = 15$) in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control; (0') solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control.

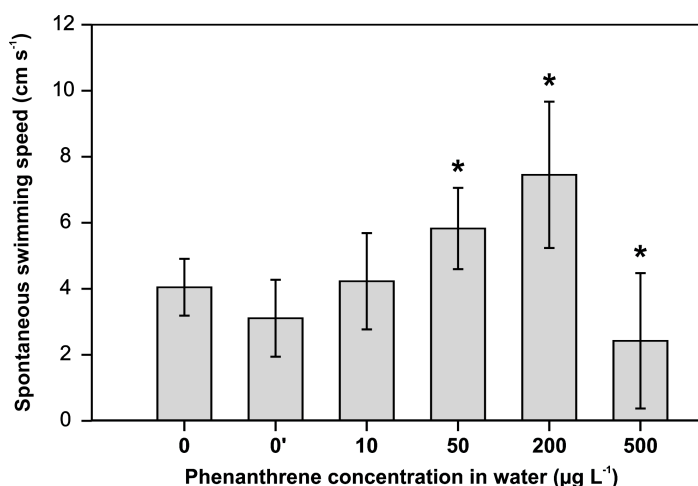


Figure 3 - Spontaneous swimming speed (mean $\pm$ standard deviation, $n = 15$) in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control; (0') solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control.

Marked changes in swimming trajectories were observed in phenanthrene-exposed *P. vivipara* individuals when compared to those kept under control conditions. Control fish showed a swimming trajectory which involved the exploration of most of the available area of the aquarium. The swimming trajectory in *P. vivipara* exposed to 50, 200 and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ phenanthrene were limited to the outer margins of the aquarium and the swimming patterns consisted in repetitive circular movements around the outer margins of the testing arenas (Fig. 5).

3.4. Prey capture

The ability of *P. vivipara* to capture prey organisms was diminished by exposure to phenanthrene. The mean number of nauplii captured per fish was reduced by 45% from 84 in the

control to 37 in the 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ phenanthrene treatment, which also corresponded to the LOEL (Fig. 6: K-W, $H_4 = 19.4$; $p < 0.05$, Dunn, $p < 0.05$).

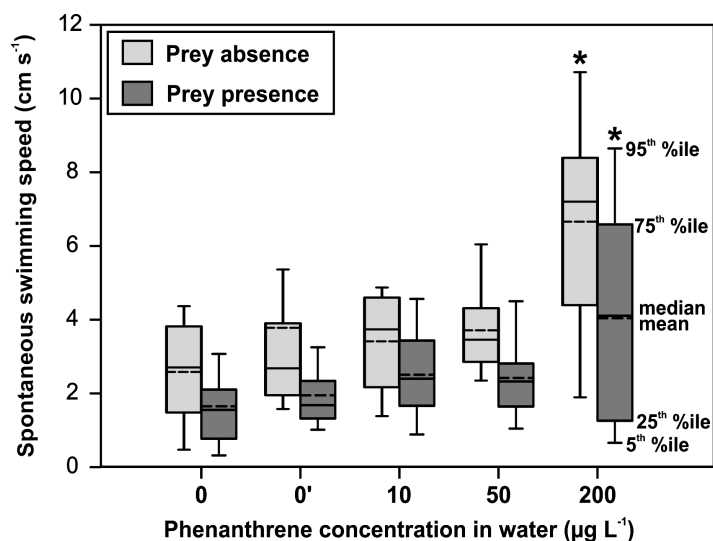


Figure 4 - Spontaneous swimming speed in absence and presence of prey (median, percentiles and mean, $n = 15$) in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control; (0') solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control.

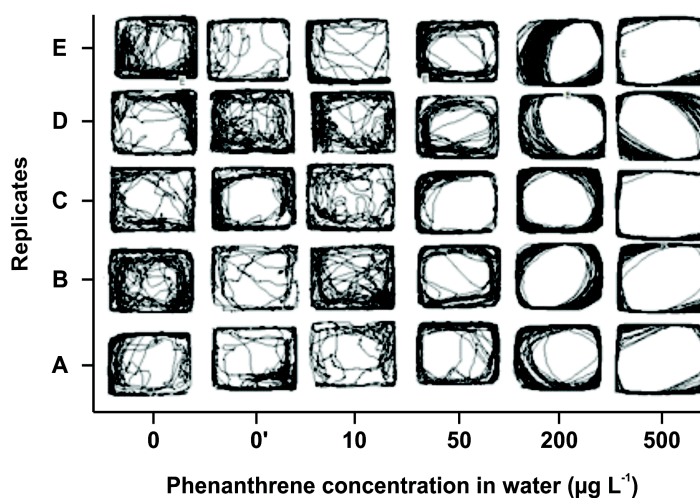


Figure 5 - Swimming trajectories during 5 min in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control; (0') solvent control (DMSO).

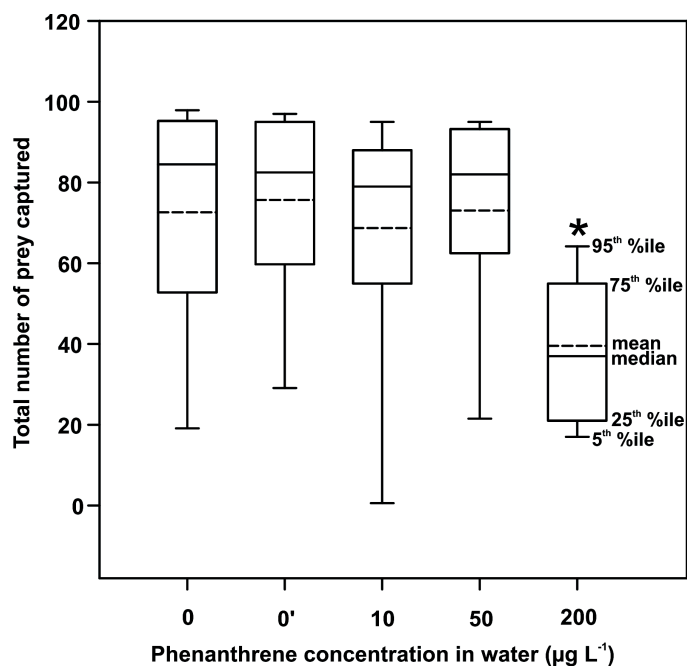


Figure 6 - Total number of prey captured (*Artemia nauplii*) (median, percentiles and mean, $n = 15$) in *Poecilia vivipara* after a 96 h water exposure to phenanthrene. (0): control; (0') solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control.

4. DISCUSSION

The quantification of phenanthrene equivalents in bile of water exposed *P. vivipara* allowed the establishment of dose-response relationships between internal phenanthrene accumulated and behavioral parameters relevant to fish survival and growth.

Bile volume of exposed fish increased in a dose-dependent manner, consistent with the need for higher rates of metabolism in the liver and secretion of bile in the gallbladder as the concentrations of phenanthrene in water increased. However, $\log BCF_{\text{bile}}$ showed a decreasing trend with increasing exposure concentrations (Table 1). These lower values at higher exposure concentrations may indicate that the capacity of hepatobiliary excretion is limited at higher concentrations of phenanthrene, similar to the findings in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to ibuprofen (Brozinski *and others.*, Identification and dose dependency of ibuprofen biliary metabolites in rainbow trout). Typically, the bioconcentration factor (BCF) is measured or estimated considering the accumulation of chemicals in tissues of animals (Barron, Bioconcentration. Will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals?), and is generally used to predict the internal bioavailability of the compound and relate it to its potential toxic effect (Veith *and others.*, Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish). Bile BCFs are based on the concentration of PAHs that were actually metabolized in the liver, an approach that is important because the chemical species resulting from this process may be responsible for major toxic effects in aquatic animals, including genetic damage, changes in activity of phase I and II biotransformation enzymes, abnormalities in development, reproductive and immunological effects (Albers, Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons, Logan, Perspective on Ecotoxicology of PAHs to Fish, Payne and others., Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish, van der Oost *and others.*, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review). Many studies have reported similarities between measured $\log BCF$ in tissue and the hydrophobicity of the studied compound, which is expressed by the octanol/water partition coefficient ($\log K_{ow}$) (Jonsson *and others.*, Bioconcentration, biotransformation, and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) exposed to contaminated seawater). However, (Baussant and others., Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil) argue that only the K_{ow} is not enough to predict the bioconcentration factor, since other factors may control the composition of PAHs in fish tissue, such as changes in the bioavailability of the hydrocarbon prior to absorption as well as its enzymatic metabolism and excretion rate. $\log BCF_{\text{bile}}$ values reported within this study ranged from 3.97 to 4.34 (Table 1), and higher values observed at the lower concentrations were close to the $\log K_{ow}$ of 4.46 for phenanthrene (Neff *and*

others., Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: identifying sources and ecological hazard). This similarity suggests that partitioning between water and octanol reasonably simulates the partitioning between water and bile within the gallbladder in exposed *P.vivipara*. Additionally, LogKow for hydroxylated metabolites of phenanthrene that are major metabolites in fish (Goksøyr *and others.*, Regioselective metabolism of phenanthrene in Atlantic cod (*Gadus morhua*): Studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochromes P-450), range from 2.6 to 3.03 (Karcher *and others.*, Spectral Atlas of Polycyclic Aromatic Compounds), lower than LogKow for parent phenanthrene. These hydroxylated metabolites are possibly present in analyzed bile in this study, and their quantification could partially explain the difference between estimated BCFs in this study and parent phenanthrene LogKow, especially at higher exposure concentrations.

Some studies have estimated the bioconcentration factor for phenanthrene in different fish tissues, and in most of the cases the logBCF was smaller than the logKow. Carlson *and others.* (Environmental impact of polynuclear aromatic hydrocarbons liberated from Northern Great Plains coal) found a muscle logBCF of 3.42 in fathead minnow exposed to phenanthrene for 96 hours. Atlantic cod exposed to crude oil from the North Sea for a period of 30 days showed a liver logBCF of 3.42 for phenanthrene (Aas *and others.*, PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod). The closer proximity of the logBCF measured in bile in this study to phenanthrene logKow can be partially explained by the fact that PAH and its metabolites partition towards lipid rich tissues, such as bile (Logan, Perspective on Ecotoxicology of PAHs to Fish, Meador, Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms).

Among the behavioral parameters evaluated in the present study, effects in swimming resistance were less sensitive than in spontaneous swimming speeds, with LOELs of $500 \mu\text{g L}^{-1}$ and $50 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. This corroborates the results presented by Little and Finger (Swimming Behavior as an Indicator of Sublethal Toxicity in Fish), who also reported spontaneous swimming speed as a more sensitive parameter to contaminants exposure than swimming resistance.

The unusual nonmonotonic dose response pattern observed in this study in spontaneous swimming represented by hyperactivity followed by hypoactivity has already been reported in *Lepomis macrochirus* exposed to fluorene at similar concentrations, where swimming speeds relative to control were increased at $250 \mu\text{g L}^{-1}$ and decreased at 500 and $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Finger *and others.*, Comparison of Laboratory and Field Assessment of Fluorene - Part I: Effects of Fluorene on the Survival, Growth, Reproduction, and Behavior of Aquatic Organisms in Laboratory Tests). Some studies show that exposure to PAHs affect respiration and osmoregulation performed by gill tissue (Correia *and others.*, Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus*

aurata) to phenanthrene) and may cause hyperactivity. Increased swimming speed caused by exposure to phenanthrene may result in higher expenditure of energy which could be allocated to metabolize this compound, directed towards growth or other essential activities such as reproduction. A lethargic effect or increased incidence of immobility in a dose-dependent pattern after exposure of fishes to phenanthrene was observed in several studies (Correia and others., Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene, Gonçalves and others., The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior). However, in this study a decrease in swimming speed which is similar to the effect of lethargy was observed only at 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Decrease in feeding rates and the ability to capture prey are ecologically relevant effects of exposure to contaminants (Weis and others., Evaluating prey capture by larval mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a potential biomarker for contaminants). Exposure of the fish *Leiostomus xanthurus* to PAHs in sediment can lead to a reduction in the activity involving benthic prey search and prey capture (Hinkle-Conn and others., Effects of sediment-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on feeding behavior in juvenile spot (*Leiostomus xanthurus* Lacépède: Pisces)). The dourado *Salminus brasiliensis* exposed to phenanthrene exhibited reduced capture efficiency on larvae of the fish *Prochilodus lineatus*, but no change in swimming speed was detected (Carvalho and others., Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis*). The search volume model of fish foraging behavior (Blaxter and Staines, Food searching potential in marine fish larvae) is based on the idea that the probability of prey detection and capture increases as a predator fish swims longer distances searching for prey, exploring a larger volume of the habitat where the typical prey can be found. This model can be evaluated experimentally based on the area of the predator reactive visual field multiplied by the swimming speed of the fish (Carvalho and others., Thiamine Deficiency Effects on the Vision and Foraging Ability of Lake Trout Fry). This implies that increased swimming speeds lead to increased probability of prey detection and capture. However, this study detected an increase in swimming speed during prey capture at 50 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ in experiment 1 (Fig. 3), and at 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ in experiment 2 (Fig. 4), when increased swimming speed was associated with a decrease in the number of captured *Artemia* nauplii (Fig. 6). A more detailed analysis indicated that fish exposed to phenanthrene concentrations of 50 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, although developing higher swimming speeds, presented swimming trajectories limited to a repetitive circular swimming on the outer regions of the arenas (Fig. 6), which possibly lowered the probability of *P. vivipara* to find its prey. This pattern was also observed in fish exposed to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ which showed lower swimming speed than control. These results indicate that a change in the pattern of habitat exploration may be more important than changes in swimming speeds to predict consequences to prey detection and

capture. The observed change in swimming speeds and trajectories associated with a reduction in prey capture could also affect predator evasion skills and reduce growth rates in fish exposed to phenanthrene.

5. CONCLUSION

The dose-dependent effects on prey capture, swimming resistance, speed and trajectory found in this study are based both on phenanthrene water concentrations and internal concentrations in bile metabolites of *P. vivipara*. This approach allows us to infer behavioral effects of greater relevance to the survival of individuals from measurements of the concentration of phenanthrene metabolites in bile of *P. vivipara* collected in the natural environment, that are of significant utility in studies of environmental monitoring of oil pollution in tropical regions.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq” as part of the “Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática - INCT-TA” (Brazilian Ministry of Science and Technology, Brasília, DF, Brazil), CNPq Grant 479773/2010-6 and a PhD fellowship from “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES” (Ministry of Education, Brasília, DF, Brazil). A. Bianchini is a research fellow from the Brazilian CNPq (Grant 304430/2009-9) and supported by the International Canada Research Chair Program from IDRC. Authors are very grateful to all students who contributed during experimental exposures and testing, and to unknown reviewers who helped to increase the quality of this publication.

MANUSCRITO II

**AValiação dos Padrões de Fluorescência Biliar, Bioconcentração e
Velocidade Natatória do Barrigudinho Estuarino *Poecilia vivipara* Após Exposição ao
Naftaleno, Fenantreno e Pireno**

RESUMO

Relações dose-resposta entre metabólitos biliares de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e atividade natatória do barrigudinho *Poecilia vivipara* foram investigadas após exposição a uma mistura de naftaleno, fenantreno e pireno na água (com 15, 30 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de HPAs totais). A análise dos metabólitos biliares foi baseada nas técnicas analíticas de fluorescência fixa (FF) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE/F). A velocidade natatória foi registrada em vídeo e analisada através do software *Smart* para cálculo da velocidade média de natação em cm s^{-1} . A velocidade natatória espontânea em *P. vivipara* foi reduzida em 34,7,% relativa aos controles na concentração de efeito observado (CEO), igual a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de HPA total. Concentrações internas de HPAs na bile dos peixes expostos aumentaram em padrão dose-dependente, refletindo parcialmente previsões de bioconcentração com base nos coeficientes de partição octanol-água (K_{ow}). O log do fator de bioconcentração biliar para o naftaleno ($\text{LogFBC}_{\text{bile-naf}}$) variou de 2,9 a 3,3 por CLAE/F, e foi similar ao LogKow do naftaleno de 3,2. Para o fenantreno e pireno, com logKow de 4,4 e 5,1, respectivamente, o $\text{LogFBC}_{\text{bile-fen}}$ estimado foi igual a 4,0 e o $\text{LogFBC}_{\text{bile-pir}}$ foi igual a 5,3, ambos baseados em FF, e se aproximaram mais do previsto pelos valores de LogKow . Ambas as metodologias empregadas possibilitaram a detecção dos metabólitos dos HPAs em concentrações ambientalmente relevantes da mistura de HPAs na água, em correlação com uma redução da velocidade natatória. A técnica de fluorescência fixa pode ser utilizada em programas de monitoramento ambiental da contaminação de peixes por HPAs por ser simples, rápida e apresentar custo relativamente baixo. Entretanto, técnicas cromatográficas complementares como CLAE-F são importantes para a melhor caracterização individual dos diferentes HPAs absorvidos.

Palavras-chave: peixes; metabólitos na bile; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; mistura; cromatografia líquida; fluorescência fixa; natação espontânea.

ABSTRACT

Dose-response relationships between polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) bile metabolites and swimming activity of the estuarine guppy *Poecilia vivipara* were investigated after water exposure to a mixture of naphthalene, phenanthrene and pyrene (with 15, 30 and 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ of total PAHs). Bile metabolites analysis was based on the fixed fluorescence (FF) analytical techniques and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC/F). Swimming speed was recorded on video and analyzed using the *Smart* software to calculate the average swimming speed in cm s^{-1} . *P. vivipara* spontaneous swimming speed was reduced by 34,7 % in relation to the control groups at the lowest observed effect concentration (LOEC), equal to 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ of total PAHs. Bile internal PAH concentrations of exposed fish increased in a dose-dependent pattern, partially reflecting bioconcentration predictions based on octanol-water partition coefficients (K_{ow}). The logarithm of naphthalene biliary bioconcentration factor ($\text{LogBCF}_{\text{bile-naph}}$) varied from 2,9 to 3,3 with HPLC/F, and was similar to the naphthalene LogKow of 3,2. For phenanthrene and pyrene, with LogKows of 4,4 and 5,1, respectively, the estimated $\text{LogBCF}_{\text{bile-phen}}$ was equal to 4,0 and the $\text{LogBCF}_{\text{bile-pyr}}$ was equal to 5,3, both based on FF, values that were closer to predictions by the LogKow . Both methodologies employed allowed PAH metabolites detection in environmentally relevant concentrations of PAH mixtures in water, in correlation with a decrease in swimming speed. The fixed fluorescence technique can be used in environmental monitoring programs with fish contaminated by PAHs because it is simple, fast and presents relatively low cost. However, complementary chromatography techniques like HPLC/F are important to improve the individual characterization of the different PAHs absorbed.

Keywords: fish; metabolites in bile; polycyclic aromatic hydrocarbons; mixture; liquid chromatography; fixed fluorescence; spontaneous swimming.

1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos formados tipicamente por 2 a 6 anéis benzênicos fundidos, que podem estar presentes em ambientes aquáticos contaminados a partir de fontes pirogênicas ou petrogênicas (Neff et al., 2005; Perhar and Arhonditsis, 2014). Estes compostos estão relacionados entre os contaminantes de petróleo de maior preocupação ambiental por apresentarem elevado potencial tóxico (USEPA, 2014). Os HPAs apresentam lipofilicidade significativa e variável, com coeficientes de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) entre 3,31 (naftaleno) e 6,3 (Benzo-a-pireno) (Baussant et al., 2001), o que facilita sua absorção e difusão entre tecidos nos organismos aquáticos. Diferente de contaminantes orgânicos como os organoclorados, os HPAs não são biomagnificados ao longo dos níveis tróficos (Porte and Albaigés, 1994), e os compostos absorvidos pelos peixes são biotransformados em metabólitos mais hidrofílicos por enzimas de fase I e fase II presentes no fígado (Meador et al., 1995). Os HPAs não biotransformados e seus metabólitos são concentrados e armazenados na bile até a excreção (Varanasi and Stein, 1991; van der Oost et al., 2003). Durante o tempo em que circulam entre os diferentes tecidos internos, os HPAs originais e seus metabólitos são responsáveis por uma grande diversidade de efeitos tóxicos em peixes, incluindo efeitos bioquímicos (Kopecka-Pilarczyk and Correia, 2009), histopatológicos (Simonato et al., 2008), carcinogênicos e mutagênicos (Varanasi, 1989; Akaishi et al., 2004), imunológicos (Kerambrun et al., 2012), genéticos (Machado et al., 2014) e comportamentais (Little et al., 1990; Weis et al., 2003; Carvalho et al., 2008), os quais têm sido verificados tanto em estudos realizados em campo quanto em laboratório (Payne et al., 2003). Medidas comportamentais integram respostas bioquímicas e fisiológicas e são indicados como biomarcadores individuais que podem proporcionar informações para estimar efeitos ecológicos populacionais (Scott and Sloman, 2004). Alterações significativas no comportamento natatório relacionadas à exposição aos HPAs são frequentemente estudadas (Correia et al., 2007; Gonçalves et al., 2008; Gravato and Guilhermino, 2009; Almeida et al., 2012; Oliveira et al., 2012; Kochhann et al., 2015) por estarem associadas diretamente a um conjunto de habilidades fundamentais a sobrevivência dos peixes como a fuga de predadores e a busca por presas (Little and Finger, 1990). Estudos que relacionem estes biomarcadores de efeito a parâmetros de quantificação de doses internas, como metabólitos na bile, são necessários para que se possa avançar no entendimento das relações dose-resposta ao longo dos diferentes níveis de organização biológica dos efeitos ecotoxicológicos.

A análise de HPAs no compartimento biliar é uma importante ferramenta para quantificar a exposição de organismos a compostos aromáticos fluorescentes (CAFs) que estejam biodisponíveis, como os HPAs, proporcionando medidas sensíveis da dose interna de HPAs em peixes que são utilizadas no monitoramento de ambientes potencialmente contaminados por petróleo (Aas et al.,

2000; Beyer et al., 2010), e em análises de risco ecológico quando associadas a parâmetros de efeito tóxico (Yang et al., 2003; Kammann et al., 2013).

Existem técnicas semi-quantitativas e quantitativas disponíveis para analisar HPAs na bile de peixes, e as técnicas semi-quantitativas são especialmente úteis em programas de monitoramento ambiental que necessitem de resultados rápidos, eficazes e de custos relativamente baixos (Beyer et al., 2010). Dentre as metodologias semi-quantitativas que têm sido empregadas, a técnica denominada fluorescência fixa (FF) envolve a detecção de fluorescência dos HPAs presentes em amostras de bile diluídas em solventes apropriados, sem separação cromatográfica, utilizando pares de comprimento de onda de excitação e emissão fixos e específicos para HPAs de 2 ou mais anéis aromáticos. A fluorescência detectada indica a presença e quantidade de metabólitos que podem ser expressos em equivalentes de um HPA específico (Aas et al., 1998). A técnica semi-quantitativa denominada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detectores de Fluorescência (CLAE-F), embora mais cara e trabalhosa, proporciona um maior detalhamento sobre a composição molecular de HPAs em amostras de bile do que a técnica de FF (Beyer et al., 2010). Lin et al. (1996) compararam as técnicas de detecção de metabólitos na bile por CLAE-F e por FF em três espécies de peixes coletados em campo, expressando os resultados de ambos os métodos em metabólitos equivalentes de naftaleno e benzo(a)pireno, e encontraram uma boa correlação entre os resultados. Vuontisjärvi et al. (2004) também compararam as técnicas CLAE-F e FF para a detecção de metabólitos equivalentes de pireno em peixes coletados no Mar Báltico. Em ambos trabalhos de campo os autores sugerem a utilização da FF como uma ferramenta promissora por suas vantagens em relação à conveniência, rapidez e baixo custo.

Em ambientes aquáticos os HPAs estão presentes na maioria das vezes como misturas complexas. Desta forma, a avaliação da toxicidade de misturas de HPAs para peixes é necessária, e pode ser avaliada após exposição a misturas de HPAs individuais ou a misturas mais complexas como petróleo bruto em laboratório, conjuntamente com medidas de efeito tóxico baseadas em biomarcadores que podem ir do nível bioquímico ao comportamental (Gonçalves et al., 2008; Kochhann et al., 2013).

Estudos ecotoxicológicos utilizando misturas de HPAs significativamente detectados em ambientes contaminados por petróleo podem auxiliar no entendimento dos prováveis efeitos em condições realistas de ambientes complexos. Os HPAs naftaleno, fenantreno e pireno são compostos por 2, 3 e 4 anéis benzênicos, respectivamente, e são classificados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) para o monitoramento de áreas contaminadas por petróleo (USEPA, 2014).

O barrigudinho *P. vivipara* é um peixe ciprinodontiforme comumente encontrado em corpos de água doce e costeiros ao longo de toda a costa brasileira (Gomes Jr and Monteiro, 2008), e que

tem sido utilizado em estudos com HPAs em laboratório (Mattos et al., 2010; Ferreira et al., 2012; Machado et al., 2014; Torreiro-Melo et al., No prelo) e em campo (INCT-TA, 2014), a fim de avaliar a viabilidade desta espécie como modelo de peixe tropical de ocorrência estuarina que possa ser utilizado em estratégias de monitoramento da contaminação por petróleo em ecossistemas costeiros tropicais.

Desta forma, o presente estudo teve por objetivos avaliar e comparar a viabilidade do uso das metodologias de quantificação de metabólitos na bile por CLAE-F e FF na espécie *P. vivipara* exposta a uma mistura ambientalmente relevante dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno dissolvidos na água. Além disso, também foi avaliado se estas doses internas de HPAs foram capazes de alterar respostas comportamentais de atividade natatória em *Poecilia vivipara*.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais e desenho experimental

Barrigudinhos *P. vivipara* (Bloch; Schneider, 1801) foram capturados usando redes de mão (puçás) no canal que liga o estuário do rio Tejió à Lagoa do Araçá (Recife, Pernambuco; 8°05'35.6 "S, 34°55'04.5" W). Após a coleta, os peixes foram transportados para o laboratório na água do local, com aeração constante. Os animais foram submetidos a um período de aclimação de 8 semanas em tanques de 1000 L integrados a um sistema de recirculação com água do mar filtrada (1 e 5µm), com salinidade 25 e temperatura 25 °C. O fotoperíodo foi fixado em 12 h L/12h E. O pH foi 8,3, e o oxigênio dissolvido foi mantido acima de 6 mg L⁻¹. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com náuplios de *Artemia* sp. e ração comercial para peixe com 45% de proteína (Alcon Artemia, Camboriú, Brasil), até o dia anterior ao início da exposição.

2.2. Preparo das soluções e exposição

Uma solução estoque primária da mistura de naftaleno (99% de pureza, Fluka Chemika, Steinheim, Alemanha), fenantreno (98% de pureza, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) e pireno (98% de pureza, Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), de concentração 2,5 g L⁻¹ para cada composto, foi preparada em Dimetilsulfóxido (DMSO). A partir da diluição desta em DMSO, foram obtidas soluções estoque secundária (0,5 g L⁻¹) e estoque terciária (0, 25 g L⁻¹).

Foram realizadas exposições de 96h em sistema semi-estático em aquários contendo 15 L de água do mar (salinidade 25, temperatura média ± DP = 25,0 °C ± 0,5) com 20 peixes para cada tratamento.

Diferentes volumes dessas soluções de mistura foram adicionados diariamente em aquários contendo 15 L de água do mar com salinidade 25 para os tratamentos nas concentrações de 15, 30 e 150µg L⁻¹ de HPAs totais (respectivamente 5, 10 e 50 µg L⁻¹ de cada composto individual, na proporção de 1:1:1 de cada HPA). O tratamento controle de solvente foi preparado pela adição de 300 µL de DMSO em aquário com mesmo volume de água do mar (15 L), e controles foram expostos a água do mar limpa.

Durante o período de exposição os peixes não foram alimentados. Eventual mortalidade foi avaliada diariamente, e 100% das soluções dos aquários foram renovadas a cada 24 h.

2.3. Avaliação da atividade Natatória Espontânea

Ao fim da exposição de 96 h, peixes dos diferentes tratamentos foram transferidos individualmente para aquários (14 cm de comprimento x 10,5 cm de largura x 13,5 cm de profundidade), com 700 mL de água (5 cm de profundidade). As arenas experimentais foram monitoradas por vista superior por câmeras de vídeo equipadas com lentes zoom de 6-60 mm de

distância focal, conectadas a uma placa de captura de vídeo (Geovision modelo GV-900, Irvine, CA) para gravação digital dos vídeos em computador acoplado ao sistema. Em cada bateria de gravação dos vídeos, um peixe de cada um dos tratamentos foi monitorado simultaneamente. As gravações foram iniciadas após 10 minutos de aclimação e tiveram duração de 30 minutos. Os vídeos foram processados pelo software *Smart* (PanLab Harvard Apparatus, EUA) para o cálculo da velocidade média de natação (cm s^{-1}).

2.4. Determinação de metabólitos na bile

Após eutanização em água a 2 °C, segundo protocolos internacionais de experimentação animal (Use of Fishes in Research Committee, 2014), e protocolo aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), os peixes foram medidos (comprimento total em mm), pesados (biomassa com precisão de 0,0001 g) e tiveram a vesícula biliar dissecada. As vesículas biliares foram transferidas para tubos eppendorf previamente tarados, e pesadas em balança analítica com uma precisão de 0,0001 g para estimar o volume biliar, considerando 0,001 g de bile equivalente a 1 μL . As amostras de bile foram imediatamente diluídas para 1:500 (v/v) em solução de metanol/água 50% (v/v) e estocadas em ultrafreezer (-80 °C) até o momento das análises. Estas amostras foram utilizadas tanto na determinação dos metabólitos por Fluorescência Fixa (FF) quanto por Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de fluorescência (CLAE/F).

2.4.1. Fluorescência Fixa (FF)

Os metabólitos de HPAs nas amostras de bile foram analisados por fluorescência fixa (FF) (Aas et al., 2000) em espectrofluorímetro Spectramax M3 (Molecular Devices, EUA) no Laboratório de Ecotoxicologia (Labecotox - UFPE). Para leitura das amostras por FF foram utilizadas placas pretas de 96 poços para fluorescência Fluotrac 200 (Greiner, EUA). Os comprimentos de onda de excitação/emissão foram escolhidos de acordo com o indicado como sendo os mais sensíveis para os compostos naftaleno, fenantreno e pireno, sendo estes 290/335 nm (Lin et al., 1996), 249/364 nm (Barbosa, 2009) e 340/382 nm (Pathiratne et al., 2010), respectivamente.

A fluorescência média quantificada na bile dos peixes dos controles foi descontada dos valores de fluorescência detectados na bile dos peixes dos diferentes tratamentos. Uma curva analítica para cada composto dissolvido em metanol/água 50% (v/v) foi preparada com dez pontos, incluindo o branco, com concentrações de 7,8 a 2.000 $\mu\text{g L}^{-1}$. As curvas analíticas relacionaram a concentração dos HPAs dissolvidos em metanol/água 50% e suas unidades de fluorescência relativa (UFRs) e foram expressas pelas seguintes equações lineares:

Para o naftaleno: $UFR = 1,066 \cdot C_N - 17,128$

Para o fenantreno: $UFR = 5,058 \cdot C_F + 171,32$

Para o pireno: $UFR = 8,9467 \cdot C_P + 2244,78$

Onde: C_N , C_F e C_P são as concentrações de naftaleno, fenantreno e pireno, respectivamente, na amostra de bile.

2.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de fluorescência (CLAE/F)

As análises das amostras de bile pelo método CLAE/F (Krahn et al., 1984) foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico de São Paulo (Lab-QOM - IOUSP). As amostras diluídas foram injetadas diretamente no cromatógrafo (Agilent Technologies, 1200 series), passando por um filtro de pré-coluna (A-318, Upchurch Scientific) de 0,84 μ L de volume interno (A-318, Upchurch Scientific), 2 μ m de porosidade, 1,57 mm de espessura e 6,35 mm de diâmetro total e uma pré-coluna empacotada com sílica C18 (30-40 μ m). A coluna cromatográfica utilizada foi de fase reversa, revestida de sílica C18 com partículas de 4 μ m (Synergi 4 μ m Hydro-RP 80Å, Phenomenex) e foi mantida a uma temperatura constante de 50°C durante as análises. O sistema cromatográfico foi acoplado a três detectores de fluorescência (Agilent Technologies, 1200 series), programados para os metabólitos de naftaleno (NAF), fenantreno (FEN) e pireno (PIR), de acordo com o par de comprimento de onda de excitação e emissão determinado como sendo os máximos para cada um desses compostos: 290/335 nm para NAF, 249/364 nm para FEN e 340/382 nm para o PIR.

A quantificação dos compostos foi realizada através da relação entre a área total de cada cromatograma e o fator de resposta das amostras dentro de uma curva analítica, preparada com seis pontos para cada composto, com linearidade $r^2 > 0,99$. O tempo de retenção médio foi de 3,96, 6,2 e 8,5 minutos para o naftaleno, fenantreno e pireno, respectivamente. Exemplos de cromatogramas dos padrões e de amostras analisadas podem ser encontrados nos anexos II e III, respectivamente.

Como este método de varredura não permite separar cada um dos metabólitos individuais provenientes do seu HPA original, as áreas dos picos eluídos em cada detector (par de comprimento de onda específico), foram integrados e quantificados como equivalentes de naftaelno (NAF), fenantreno (FEN) ou pireno (PIR). Estes picos representam todos os compostos presentes na amostra de bile que fluoresce em cada par de comprimento de onda. Maiores detalhes do procedimento analítico ver Barbosa (2009).

Todas as amostras de bile foram mensuradas em duplicatas e suas médias foram utilizadas para os cálculos. Nos dois métodos semi-quantitativos usados, a quantificação foi feita como total

de metabólitos equivalentes, ou seja, a somatória dos compostos que fluorescem nos comprimentos de onda (excitação/emissão) usados na identificação de cada HPA original por grama de bile.

2.4.3. Fator de Bioconcentração Biliar

Foram determinados os fatores de bioconcentração biliar (FBC_{biliar}) pela razão entre a concentração total de equivalentes de cada HPA na bile e a concentração do HPA correspondente na solução de exposição nos aquários, para avaliar a taxa de bioconcentração biliar ao longo para os diferentes HPAs, das concentrações de exposição, a partir da equação:

$$FBC = (HPA_{bile}) / (HPA_{água})$$

2.5. Análises estatísticas

Para cada parâmetro avaliado, os diferentes tratamentos foram comparados usando análise de variância de um fator (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett para verificar diferenças entre o controle e os tratamentos. Os dados foram previamente testados para normalidade (Kolmogorov–Smirnov) e homoscedasticidade (teste de medianas Levene). Quando não foi observada normalidade ou homoscedasticidade, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W), seguido do teste de Dunn para avaliar diferenças entre o controle e os tratamentos. A CEO (concentração de efeito observado) e a CENO (concentração de efeito não observado) foram estimadas a partir dos testes a posteriori de Dunnett ou de Dunn, dependendo das premissas acima. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o software Sigmaplot version 11 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany), com alfa de 5%.

3. RESULTADOS

A taxa de mortalidade quantificada ao final da exposição de 96 h foi inferior a 10% em todos os tratamentos. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os tratamentos (Anova, $p < 0,05$).

3.1. Velocidade Natatória Espontânea

A exposição à mistura dos HPAs causou nos peixes testados uma redução dose-dependente na velocidade natatória espontânea, que foi reduzida em 34,7,% relativa aos controles na concentração de efeito observado (CEO), igual a $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de HPA total (Figura 1) (K-W, $H_4 = 75,59$; $p < 0,001$; Dunn, $p < 0,05$). A concentração de efeito não observado (CENO) foi igual a $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de HPA total.

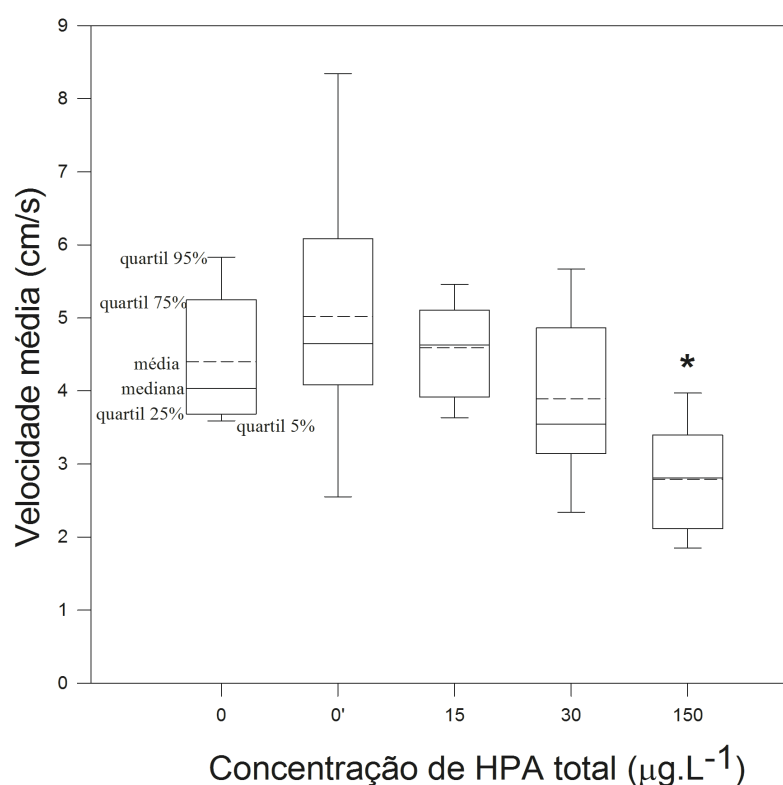


Figura 1 - Velocidade de natação espontânea (mediana $\pm$ quartis, $n = 20$) em *Poecilia vivipara* após 96 h de exposição à mistura dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno em diferentes concentrações. (0): controle; (0'): controle de solvente (DMSO); (*): Significativamente diferente em relação ao controle.

3.2. Metabólitos na bile

Não foram quantificadas concentrações de metabólitos equivalentes de naftaleno a partir da leitura por FF em 290/335nm (exc/emis), uma vez que os valores de fluorescência relativa das

amostras de bile de todos os tratamentos se situaram abaixo do limite de detecção após a correção para fluorescência da bile dos controles, com base na curva analítica preparada para o naftaleno. As concentrações de equivalentes de naftaleno obtidos por CLAE/F não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (K-W, $H_4 = 3,53$; $p = 0,47$) (Figura 2a). As medianas das concentrações foram iguais a 7,5, 9,2 e 9,5 μg de naftaleno. g^{-1} de bile para peixes das concentrações de exposição de 15, 30 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de HPAs totais, sendo 5, 10 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de naftaleno, respectivamente.

As concentrações de metabólitos equivalentes de fenantreno apresentaram valores crescentes e significativamente superiores ao controle a partir da concentração de exposição de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno nas técnicas FF (K-W, $H_4 = 30, 87$; $p < 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) e CLAE/F (K-W, $H_4 = 38, 68$; $p < 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) (Figura 2b). As medianas das concentrações obtidas por FF foram iguais a 18, 73 e 550 μg de fenantreno. g^{-1} de bile, e por CLAE/F foram iguais a 7,7, 10,5 e 32,9 μg de fenantreno. g^{-1} de bile para peixes das concentrações de exposição de 15, 30 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de HPAs totais, sendo 5, 10 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno, respectivamente.

As concentrações de metabólitos equivalentes de pireno foram as mais altas entre os compostos estudados, sendo estas concentrações significativamente superiores ao controle desde a menor concentração de exposição (5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de pireno total na água), em ambas técnicas empregadas, FF (K-W, $H_4 = 40, 05$; $p < 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) e CLAE/F (K-W, $H_4 = 58, 35$; $p < 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) (Figura 2c). As medianas das concentrações obtidas por FF foram iguais a 1031, 2189 e 7594 μg de pireno. g^{-1} de bile e por CLAE/F foram iguais a 92,9, 198 e 859,7 μg de pireno. g^{-1} de bile para as concentrações de exposição de 15, 30 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de HPAs totais, sendo 5, 10 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de pireno, respectivamente.

O logaritmo do fator de bioconcentração (logFBC) dos metabólitos equivalentes de naftaleno variou de 2,32 a 3,36 por CLAE/F. O LogFBC para metabólitos equivalentes de fenantreno variou de 3,67 a 4,05 por FF, e de 2,66 a 3,02 por CLAE/F. O LogFBC para metabólitos equivalentes de pireno variou de 5,16 a 5,31 por FF, e de 4,14 a 4,28 por CLAE/F (Tabela 1). O volume das vesículas biliares dos peixes expostos às misturas de HPAs aumentou em um padrão concentração-dependente, com valores significativamente superiores ao controle, nos peixes expostos às concentrações de 30 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ (K-W, $H_4 = 14,34$; $p = 0,006$; Dunn, $p < 0,05$). As medianas do volume de bile nos peixes do controle, controle do solvente e dos peixes expostos ao HPAs ao longo do gradiente crescente de concentração foram de 1,85, 1,55, 2,3, 2,7, e 3,8 μL , respectivamente (Figura 3).

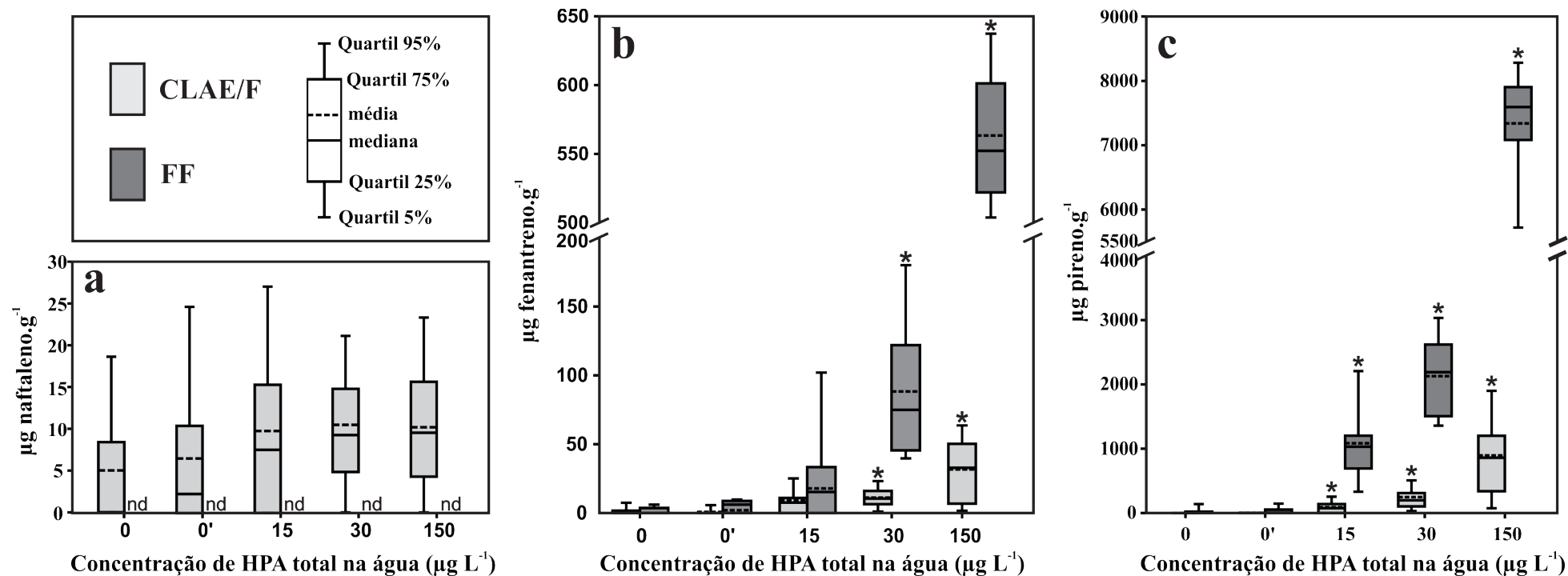


Figura 2 - Concentração em equivalentes de naftaleno (a), fenantreno (b) e pireno (c) quantificada através das técnicas de FF e HPLC/F em *Poecilia vivipara* ($n = 20$) após 96 h de exposição à mistura de HPAs nas concentrações 15, 30, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de HPA total na água (1:1:1 de naftaleno, fenantreno e pireno). (0): controle; (0'): controle de solvente (DMSO); (*): Significativamente diferente em relação ao controle.

Tabela 1 - Volume total da vesícula biliar (μL), metabólitos equivalentes na bile após correção de diluição ($\times 500$) ($\mu\text{g L}^{-1}$), fator de bioconcentração ($\text{FBC}_{\text{bile}} = [\text{HPA}_{\text{bile}}]/[\text{HPA}_{\text{água}}]$), e logaritmo do FBC_{bile} de naftaleno, fenantreno e pireno em peixes da espécie *Poecilia vivipara* após 96 h de exposição às concentrações 5, 10, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno na água, sendo respectivamente de 15, 30, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de HPA total.

HPA	Concentração na água ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Metabólitos equivalentes na bile ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Fator de bioconcentração (FBC_{bile})		Log FBC_{bile}	
		FF	CLAE	FF	CLAE	FF	CLAE
Naftaleno	5	nd	7,6	-	2193	-	3,36
	10	nd	9,2	-	925	-	3,00
	50	nd	9,5	-	190	-	2,32
Fenantreno	5	18	7,7	3633	1539	3,67	3,02
	10	73	10,5	7328	1043	3,88	3,00
	50	550	32,9	11000	657	4,05	2,66
Pireno	5	1031	91,9	206226	19967	5,28	4,28
	10	2189	198,1	218884	19806	5,31	4,25
	50	7594	859,7	151886	17216	5,16	4,14

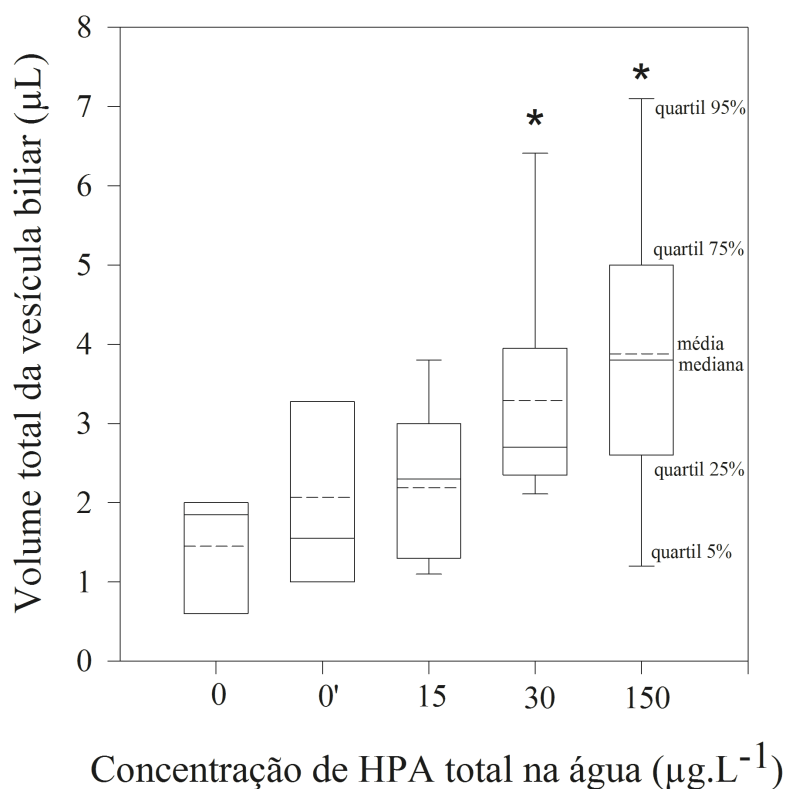


Figura 3 - Volume total da vesícula biliar (µL) (mediana ± quartis padrão, n = 20) em *Poecilia vivipara* após 96 h de exposição à mistura de HPAs nas concentrações 15, 30, 150 µg L⁻¹ de HPA total na água (1:1:1 de naftaleno, fenantreno e pireno). (0): controle; (0'): controle de solvente (DMSO); (*): Significativamente diferente em relação ao controle.

4. DISCUSSÃO

Este estudo evidenciou que o método mais simples de FF é tão sensível quanto CLAE/F para a detecção de metabólitos biliares dos HPAs fenantreno e pireno em *P. vivipara*, apesar das diferenças em termos das concentrações estimadas. Ambos os métodos permitiram estimar doses internas de HPAs causadoras de hipoatividade natatória em *Poecilia vivipara* após a exposição a uma mistura de HPAs frequentemente detectados em ambientes contaminados por petróleo.

A atividade natatória é uma habilidade fundamental para a sobrevivência de peixes (Little et al., 1990; Scott and Sloman, 2004), e comportamentos essenciais podem ser prejudicados quando a natação é comprometida. No caso de hipoatividade natatória, que foi detectada neste estudo, é frequente a ocorrência de alterações como redução da capacidade de busca e captura de presas (Weis and Candelmo, 2012), e consequente redução do crescimento (Meager and Batty, 2007), comprometimento da migração e da fuga de predadores, aumentando a vulnerabilidade à predação (Oliveira et al., 2012; Kochhann et al., 2015). A hipoatividade natatória observada em *P. vivipara* no presente estudo (Figura 1) é coerente com resultados que relatam efeito letárgico ou aumento da incidência de imobilidade após exposição de peixes a misturas de HPAs e a frações solúveis de óleo (Barron et al., 2004; Gonçalves et al., 2008; Kochhann et al., 2015), bem como a HPAs na forma isolada como o fenantreno (Correia et al., 2007) ou pireno (Correia et al., 2007; Oliveira et al., 2012). Luís and Guilhermino (2012) verificaram redução da velocidade natatória do camarão *Palaemon serratus* após exposição ao pireno e ao naftaleno, sendo que o pireno foi cinco vezes mais potente para causar hipoatividade que o naftaleno. A exposição de peixes juvenis da dourada (*Sparus aurata*) a uma mistura dos HPAs fenantreno, pireno e fluoreno por 96 h levou a um aumento no percentual de peixes letárgicos, com uma concentração efetiva para causar 10% de aumento de letargia (CE₁₀) após exposição a cada HPA isoladamente igual a 7,9 µg L⁻¹ para pireno, 26,0 µg L⁻¹ para fenantreno e 43,2 µg L⁻¹ para o fluoreno (Gonçalves et al. (2008). O pireno foi aproximadamente 3,3 vezes mais potente que o fenantreno para o efeito considerado, e estes autores também demonstraram um efeito aditivo destes HPAs numa exposição da mesma espécie a uma mistura de pireno, fenantreno e fluoreno nas suas CE₁₀ mencionadas acima. No presente estudo o parâmetro de efeito quantificado, velocidade natatória, apesar de abordar exatamente o mesmo tema, difere significativamente dos parâmetros avaliados por Gonçalves et al. (2008), e não são possíveis comparações diretas entre as concentrações de efeito entre os trabalhos. No presente estudo, a velocidade natatória foi reduzida em 34,7% relativa aos controles na CEO igual a 150 µg L⁻¹ de HPAs totais, incluindo 50 µg L⁻¹ de pireno, 50 µg L⁻¹ de fenantreno e 50 µg L⁻¹ de naftaleno. Torreiro-Melo et al. (2015) observou hipoatividade em *P. vivipara* após exposição à concentração de 500 µg L⁻¹ de fenantreno isolado. Os dados do presente estudo sugerem que o efeito na hipoatividade detectado numa mistura de 150 µg L⁻¹ de HPAs totais, composta de 50 µg L⁻¹ de

fenantreno, $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de pireno e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de naftaleno, podem ter sido causados por uma interação aditiva entre estes HPAs, uma vez que o pireno é mais potente que o fenantreno para causar efeitos relacionados à natação (Gonçalves et al., 2008; Luís and Guilhermino, 2012). Entretanto, estudos específicos são necessários para se verificar esta hipótese.

Dentre os mecanismos de ação tóxica de hidrocarbonetos aromáticos, a narcose é um efeito anestésico reversível causado por contaminantes hidrofóbicos que se particionam para membranas celulares e tecido nervoso, resultando no desequilíbrio das funções do sistema nervoso central, redução de reação a estímulos externos, e frequentemente associados a este padrão de hipoatividade (Barron et al., 2004). Frequentemente o estado de narcose gera em peixes a perda de sensibilidade a estímulos via sistema sensorial da linha lateral (mecanorrecepção) (Incardona et al., 2004) e quando prolongado, pode conduzir à morte do indivíduo (Leblanc, 2004). Além do efeito narcótico esperado para peixes expostos a HPAs, alocações de demanda energética em mecanismos de biotransformação (detoxificação) em detrimento da disponibilidade de energia para natação, podem explicar o efeito da hipoatividade natatória (Correia et al., 2007; Almeida et al., 2010).

No presente estudo, as concentrações de metabólitos biliares de fenantreno e pireno aumentaram em função das concentrações de exposição (Tabela 1), e o volume biliar total aumentou significativamente nos peixes expostos a 30 e $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de HPAs totais, com relação ao controle. Este aumento é coerente com a necessidade de maiores taxas de metabolização no fígado e secreção da bile ao longo do gradiente de concentração dos HPAs, como observado em *P. vivipara* exposta ao fenantreno isoladamente por Torreiro-Melo et al. (2015).

Ambos os métodos FF e CLAE/F foram capazes de detectar e quantificar concentrações biliares de fenantreno e pireno superiores estatisticamente ($p < 0,05$) aos controles após exposição de *P. vivipara* a concentrações destes HPAs na água de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Porém, os valores absolutos estimados por FF para os dois compostos foram sempre superiores aos obtidos por CLAE/F. A escolha dos pares de excitação/emissão para cada HPA é feita de modo a se maximizar a emissão de fluorescência de um HPA específico, mas tipicamente um mesmo HPA é capaz de ser excitado e emitir fluorescência em múltiplos pares de excitação/emissão. No método FF, como não há separação das moléculas presentes na mistura, HPAs como o pireno podem fluorescer juntamente com o fenantreno quando a amostra é analisada nos comprimentos de excitação/emissão estabelecidos para quantificação de fenantreno. De forma análoga, o fenantreno presente numa mistura também pode aumentar o sinal de fluorescência da amostra analisada para quantificação de pireno. Desta forma, uma explicação para esta diferença entre os métodos é que os valores estimados por FF em relação aos obtidos por CLAE/F reflitam um efeito de sobreposição da fluorescência do fenantreno e pireno, que estão presentes conjuntamente na bile diluída submetida às leituras de fluorescência fixa.

Lin et al. (1996) evidenciaram desigualdades em valores absolutos de benzo(a)pireno quantificados na bile obtidos por FF e CLAE/F, e sugerem que estes dados absolutos obtidos pelos dois métodos não podem ser comparados diretamente, e atentam para diferenças nos sistemas solventes. No presente estudo, as amostras de bile analisadas pelos dois métodos foram submetidas à mesma diluição inicial (1:500) em metanol 50%. Entretanto, o solvente utilizado como "arraste" no sistema cromatográfico foi um gradiente linear da mistura ácido acético/água e metanol, o que pode ter causado diferentes tipos de interações químicas / físicas entre os constituintes da amostra e os solventes usados no sistema, gerando uma supressão da capacidade de fluorescência. Além disto, o processo de separação dentro de uma coluna cromatográfica pode causar perdas dos compostos de interesse por adsorção, ainda que temporária, ao material do enchimento da coluna. Infelizmente não existe um material de referência certificado para metabólitos de HPAs em bile para que a recuperação dos compostos e a produção de resultados exatos e precisos sejam avaliados (Barbosa, 2009). Esta interação entre matriz e metabólitos, se existente na amostra, não foi observada nos padrões utilizados na curva analítica, que foi preparada em solvente puro.

O naftaleno não apresentou fluorescência na análise por FF, mas as amostras de bile, quando analisadas por cromatografia, apresentaram sinal detectável. Esta diferença em relação à determinação não está relacionada ao método de detecção por fluorescência, uma vez que este é comum às duas técnicas. Uma possível justificativa para essa diferença seria a interferência de compostos biogênicos na bile, como o colesterol, que poderia igualmente contribuir para o sinal de fluorescência de fundo do naftaleno (e dos outros HPAs) ou ainda suprimi-lo (Pathiratne et al., 2010). Assim, o método cromatográfico CLAE/F possivelmente separa estes interferentes dos metabólitos de naftaleno. Isso explicaria a detecção de fluorescência pelo CLAE/F, uma vez que o método de FF não faz nenhum tipo de separação. Por outro lado, não foi observada variação da concentração do naftaleno (por CLAE/F) em função da concentração de exposição, o que sugere que ainda exista algum mecanismo mais complexo de interação entre os compostos formadores da matriz. Para entender melhor estes aspectos, um estudo utilizando uma curva analítica em matriz biliar se faz necessário, para que a interação entre o naftaleno e os demais componentes da mesma seja avaliada.

Tendo em vista a não fluorescência do naftaleno por FF e o baixo sinal detectado por CLAE/F, uma nova curva analítica foi preparada, utilizando um padrão do composto na forma hidroxilada, o OH-naftaleno. A partir desta curva, foram observados valores de fluorescência relativa emitidos pelo OH-naftaleno muito inferiores aos obtidos a partir da curva preparada com o composto na forma original. Tal observação possibilita inferir que a dificuldade de detecção dos metabólitos do naftaleno, mesmo após exposição à concentração na água de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, pode estar relacionada ao baixo sinal de fluorescência emitido pelos metabólitos hidroxilados deste composto.

Desta forma, estudos futuros deverão ser realizados a fim de investigar a fluorescência dos metabólitos com mais detalhes, utilizando também as formas hidroxiladas dos compostos para a preparação de curvas analíticas.

Concentrações internas de HPAs na bile dos peixes expostos aumentaram em padrão dose-dependente, refletindo parcialmente previsões de bioconcentração com base nos coeficientes de partição octanol-água (K_{ow}). O log do fator de bioconcentração biliar para o naftaleno ($\text{LogFBC}_{\text{bile-naf}}$) variou de 2,9 a 3,3 por CLAE/F, e foi similar ao LogKow do naftaleno de 3,2. Para o fenantreno e pireno, com logKow de 4,4 e 5,1, respectivamente, o $\text{LogFBC}_{\text{bile-fen}}$ igual a 4,0 e $\text{LogFBC}_{\text{bile-pir}}$ igual a 5,3, ambos baseados em FF, se aproximaram mais do previsto pela teoria de K_{ow} (Neff et al., 2005). Esta proximidade foi observada por Torreiro-Melo et al. (2015) para a bioconcentração de metabólitos de fenantreno em *P.vivipara* exposto a fenantreno isolado na água. É importante salientar que neste estudo a exposição foi feita na forma de uma mistura mais complexa de 3 HPAs, e ainda assim os resultados sugerem uma semelhança razoável entre o fenômeno de partição entre água e o octanol comparado ao que ocorre entre HPAs dissolvidos na água e a bile no interior da vesícula biliar em *P.vivipara*.

Gonçalves et al. (2008) encontrou um menor acúmulo de pireno que fenantreno na musculatura de *Sparus aurata*, enquanto neste estudo o acúmulo de pireno na bile dos peixes foi significativamente superior que o de fenantreno e o de naftaleno.

Os resultados confirmam a validade de ambas técnicas como biomarcadores de exposição a serem incorporados em rotina de avaliações de risco ecológico utilizando o barrigudinho *P.vivipara*, com a finalidade de localizar e evidenciar tendências de contaminação por HPAs em estudos de campo (Fuentes-Rios et al., 2005; Yang and Baumann, 2006). Vários estudos relatam uma boa correlação entre as duas técnicas semi-quantitativas (Lin et al., 1996; Vuorinen et al., 2006). Contudo, a análise por FF apresenta vantagens que favorecem o seu uso no biomonitoramento, como a conveniência de menor instrumentação, simplicidade de manuseio, além da rapidez e baixo custo (Vuontisjärvi et al., 2004), possibilitando o processamento de um grande número de amostras. Outra vantagem é o volume de bile necessário para a análise, uma vez que para FF é necessário cerca da metade do volume de bile utilizado para uma análise por CLAE/F. Este aspecto é importante, uma vez que permite a realização de estudos com peixes de pequeno porte.

5. CONCLUSÃO

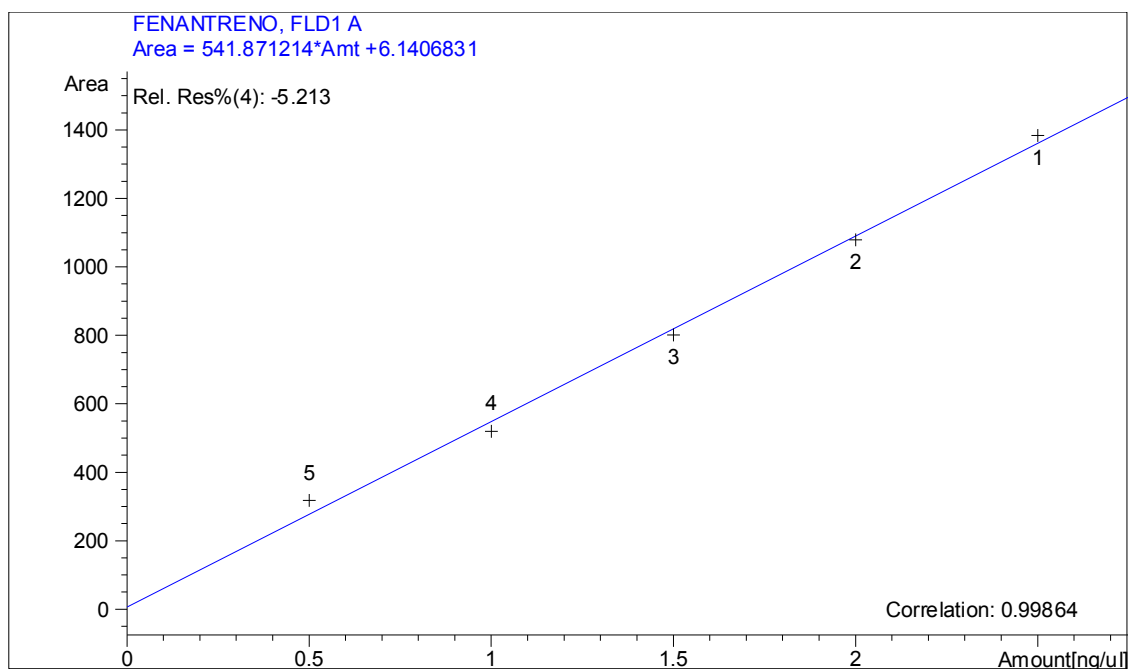
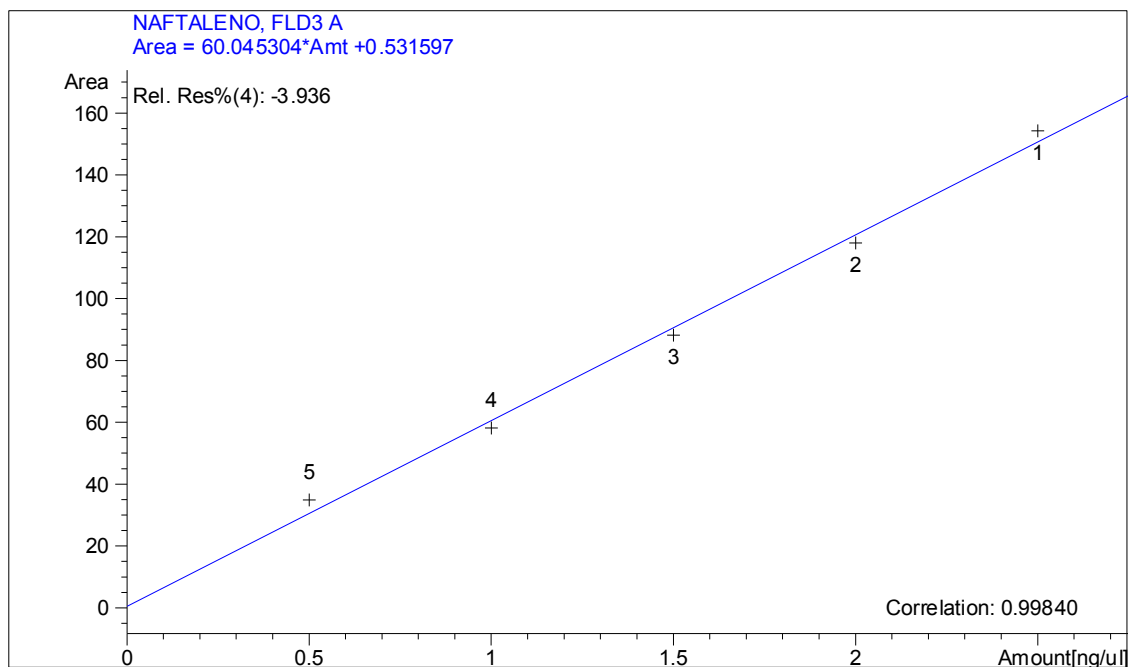
Concentrações biliares de HPAs foram quantificadas e estiveram relacionadas à redução da atividade natatória espontânea em *P. vivipara*, um comportamento ecologicamente relevante para manutenção da sobrevivência em peixes.

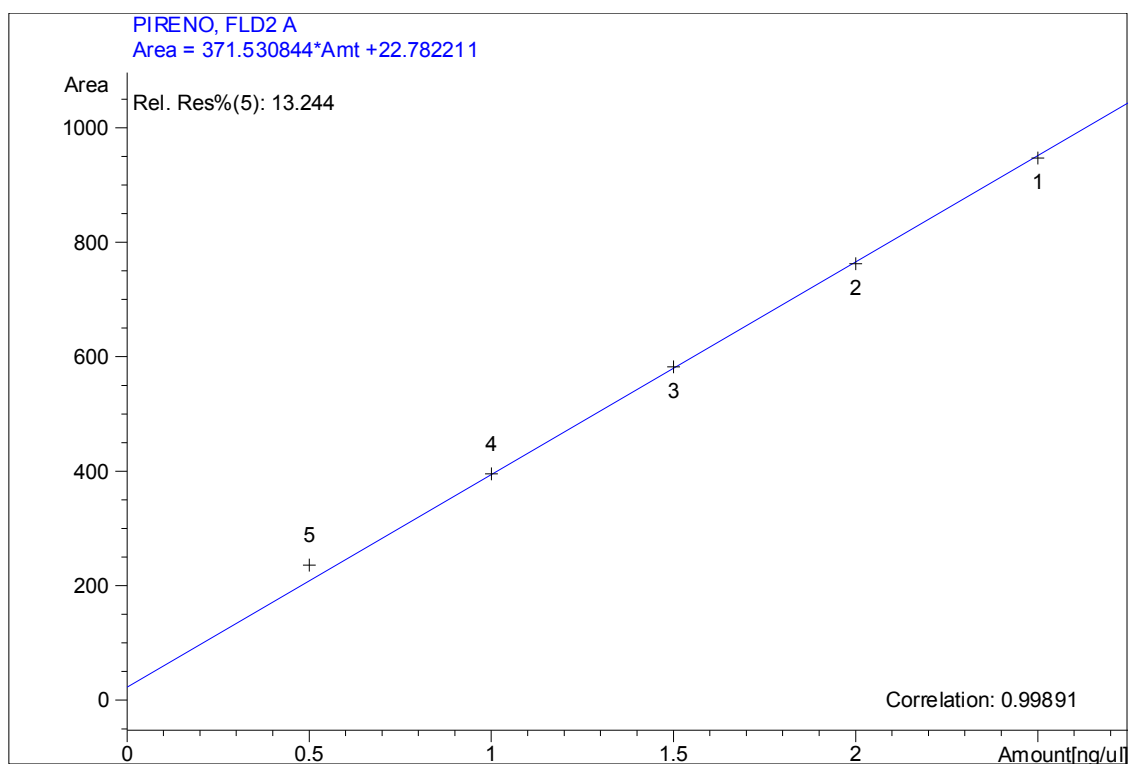
Ambas as metodologias empregadas possibilitaram a detecção dos metabólitos dos HPAs em concentrações ambientalmente relevantes da mistura de HPAs na água. A técnica de fluorescência fixa é indicada para programas de monitoramento ambiental da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo por ser simples, rápida e apresentar custo relativamente baixo, podendo ser complementada por técnicas cromatográficas como CLAE/F.

6. ANEXOS

ANEXO I

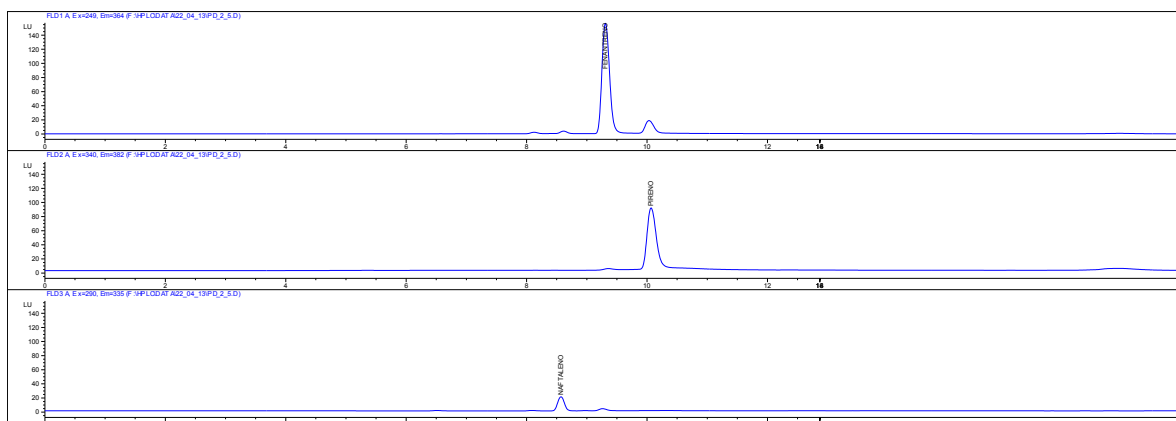
Curvas analíticas dos padrões de naftaleno, fenantreno e pireno – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 – 2,5 ng μL^{-1} .



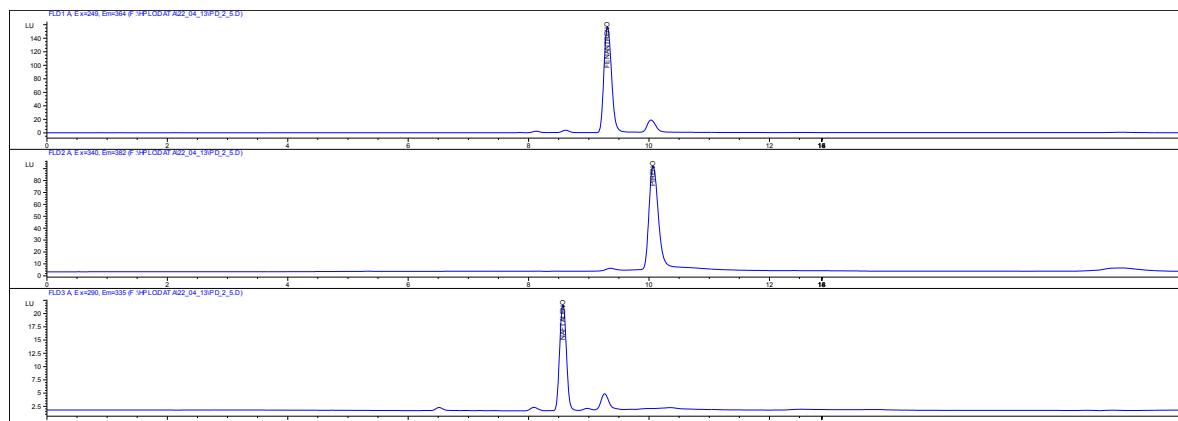


ANEXO II

Cromatograma de padrão de fenantreno, pireno e naftaleno (mesma escala).

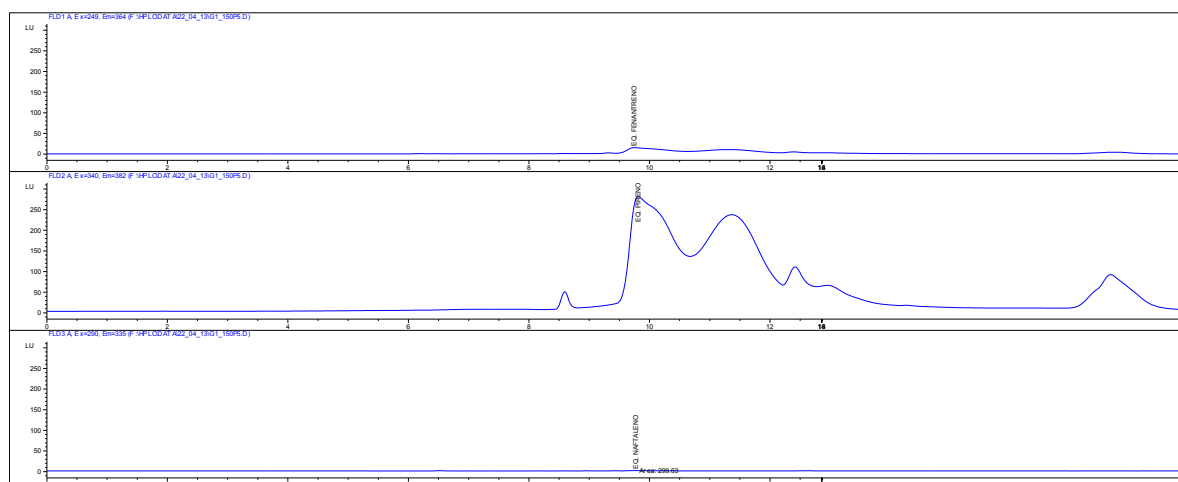


Cromatograma de padrão de fenantreno, pireno e naftaleno (escalas diferentes).

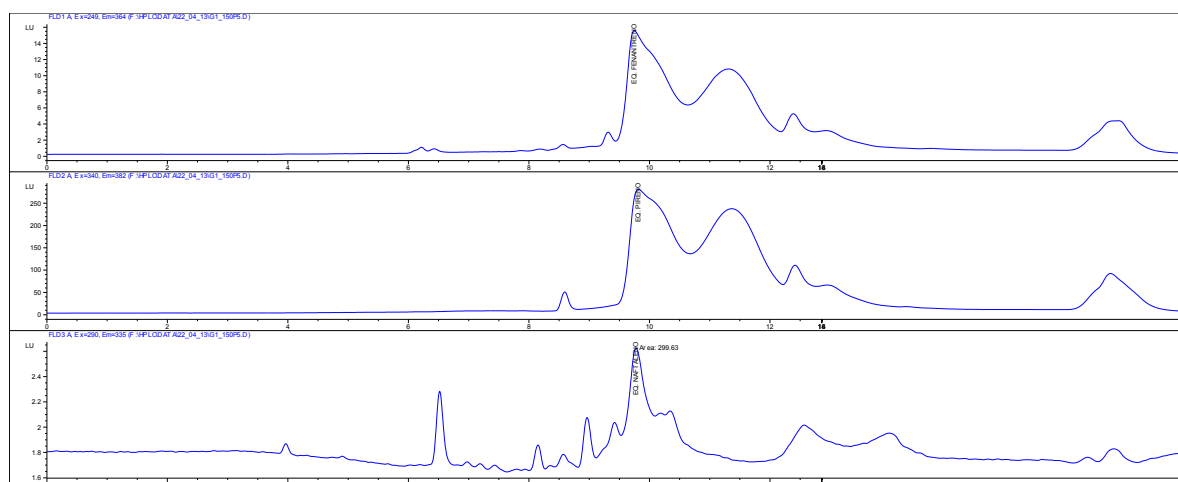


ANEXO III

Cromatograma da amostra G1-150P5 com metabólitos equivalentes do fenantreno, pireno e naftaleno (mesma escala).



Cromatograma da amostra G1-150P5 com metabólitos equivalentes do fenantreno, pireno e naftaleno (escalas diferentes).



MANUSCRITO III

UMA ABORDAGEM COM MÚLTIPLOS BIOMARCADORES FOCADOS NO BARRIGUDINHO *Poecilia vivipara* PARA AVALIAÇÃO DA POLUIÇÃO QUÍMICA EM DOIS ESTUÁRIOS TROPICAIS BRASILEIROS

RESUMO

Abordagens integradas usando respostas biológicas em múltiplos níveis de organização são essenciais para o monitoramento ambiental de estuários tropicais com ferramentas ecologicamente relevantes. O barrigudinho *Poecilia vivipara*, espécie nativa e de ampla distribuição tropical, foi utilizado numa abordagem deste tipo, usando exposições *in situ* próximo à foz de dois estuários tropicais, e indivíduos residentes numa porção mais interna, para avaliar a qualidade do sistema estuarino da Bacia do Pina (SEBP), e do sistema estuarino de Barra de Jangadas (SEBJ), na costa nordeste brasileira. Este estudo é baseado na análise de medidas de concentração na água e acumulação interna de metabólitos biliares de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) por fluorescência fixa, das respostas bioquímicas relacionadas à biotransformação de contaminantes etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e glutathione-S-transferase (GST), e à neurotransmissão acetilcolinesterase (AChE), além de atividades comportamentais relacionadas à velocidade e resistência natatórias. Indivíduos cultivados em laboratório utilizados para as exposições *in situ* foram utilizados como controles. Foi evidenciada contaminação significativa de ambos sistemas estuarinos por HPAs, com maiores concentrações de fenantreno e criseno na bile dos peixes residentes no SEBP, que por sua vez justificam parcialmente a significativa indução da EROD e GST nestes indivíduos. Peixes residentes no SEBJ apresentaram elevada indução de EROD e GST que não pode ser explicada pela contaminação por HPAs, e sugere a presença de outros contaminantes com mecanismo de ação semelhante às dioxinas, possivelmente de indústria de papel. Elevação da atividade da GST foi detectada em três dos quatro pontos avaliados nos dois estuários, e foi verificada perda da resistência natatória dos indivíduos nestes mesmos pontos, sugerindo uma possível correlação preditiva entre a atividade da GST e este efeito comportamental relevante para a sobrevivência da espécie. Não foram detectados indícios de pesticidas inibidores da acetilcolinesterase, exceto na região interna do SEBP. Este estudo demonstra a viabilidade e potencial da utilização do barrigudinho *P. vivipara* na avaliação e monitoramento da poluição em estuários ao longo da costa brasileira.

Palavras-chave: peixes; metabólitos biliares; fluorescência fixa; EROD; GST; AChE; velocidade natatória; resistência natatória.

ABSTRACT

Integrated approaches using biological responses in multiple organization levels are essential for environmental monitoring of tropical estuaries with ecologically relevant tools. The guppy *Poecilia vivipara*, native species with a broad tropical distribution, was utilized in such an approach, using *in situ* exposures close to the mouth of two tropical estuaries, and resident individuals collected inside the estuaries, to assess the quality of the Bacia do Pina Estuarine System (BPES), and the Barra de Jangada Estuarine System (BJES), in the Brazilian northeastern coast. This study is based on the analysis of water concentration measures and internal accumulation of bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fixed fluorescence, of biochemical responses related to the biotransformation of contaminants ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and glutathione S-transferase (GST), and to neurotransmission acetylcholinesterase (AChE), in addition to behavioral activities related to swimming speed and resistance. Individuals grown in the laboratory utilized for *in situ* exposure were used as controls. Significant contamination by PAHs was evidenced from both estuarine systems, with higher phenanthrene and chrysene concentrations in the bile of resident fish at BPES, which in turn partially justified the significant induction of EROD and GST in these individuals. Resident fish at BJES showed high EROD and GST induction that cannot be explained by PAHs contamination, and suggests the presence of other contaminants with mechanisms of action similar to dioxins, possibly from a paper industry. Elevation of GST activity was detected in three of the four sites assessed on both estuaries, and loss of swimming resistance was verified on individuals exposed at the same sites, suggesting a possible predictive correlation between GST activity and this behavioral effect relevant to survival of the species. Indications of acetylcholinesterase inhibitor were not detected, except at the BPES inner region. This study shows the potential and feasibility of using the guppy *P. vivipara* on the evaluation and monitoring of pollution in estuaries along the Brazilian coast.

Keywords: fish, bile metabolites, fixed fluorescence; EROD; GST; AChE; swimming speed; swimming resistance

1. INTRODUÇÃO

A integridade ecológica de estuários pode ser comprometida por atividades antropogênicas diversas que geram efluentes industriais, agrícolas e domésticos, tornando estes ambientes vulneráveis à poluição por uma grande diversidade de contaminantes químicos (Hale & La Guardia, 2002; Kennish, 2002; Couderc et al., 2015). Estuários são ambientes de alta produtividade essenciais no ciclo de vida de invertebrados e vertebrados, incluindo peixes, e a preservação desta biodiversidade dos efeitos tóxicos destes contaminantes também é importante economicamente em regiões costeiras (Amiard-Triquet & Rainbow, 2009).

No estado de Pernambuco, nordeste do Brasil, existem diversos sistemas estuarinos de importância econômica, social e ecológica. Dentre estes, destaca-se o sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP), o qual é formado pela confluência dos rios Capibaribe, Tejipió, Jordão e Pina, e se comunica com o Oceano Atlântico através de um canal formado a partir de um molhe integrado ao Porto de Recife (Figura 1). O SEBP recebe as águas da Bacia Hidrográfica do Rio Capibaribe e dos rios litorâneos Tejipió, Jordão e Pina, com área de drenagem superior a 7500 km². As principais fontes de poluentes nesta região estuarina estão relacionadas a descargas de efluentes domésticos e industriais ao longo dos rios que a formam, e em especial na região urbana de Recife, com uma população de aproximadamente 1.500.000 habitantes (CPRH, 2015c).

Atualmente no SEBP existe um constante tráfego de embarcações de pesca e esportivas de pequeno e médio porte, além de navios turísticos, com presença de algumas marinas. A importância sócio-econômica local desta área é relevante, uma vez que além das atividades acima, existem pescadores e catadores de moluscos e crustáceos que dependem destas atividades como principal fonte de renda (Recife, 1995; Feitosa et al., 1999).

O sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ) recebe as águas da bacia hidrográfica dos Rios Jaboatão e Pirapama, com áreas de drenagem de 422 e 600 km², respectivamente, e a comunicação com o Oceano Atlântico ocorre naturalmente (Figura 1). As fontes poluidoras nesta região estuarina incluem efluentes domésticos, industriais, e descargas decorrentes de atividades agroindustriais que ocorrem ao longo das bacias de drenagem de ambos os rios, com uma população aproximada de 900.000 habitantes (CPRH, 2015a, b).

Abordagens integradas usando respostas biológicas em múltiplos níveis de organização são essenciais para o monitoramento ambiental de estuários tropicais com ferramentas ecologicamente relevantes. O uso combinado destas respostas biológicas ou biomarcadores tem sido sugerido como estratégia para verificar a exposição dos organismos aos contaminantes (biomarcadores de exposição) e avaliar o comprometimento de condições de saúde dos mesmos em resposta à exposição química, com base em parâmetros biológicos aos níveis molecular, bioquímico,

histológico, fisiológico e comportamental (biomarcadores de efeito) (Depledge et al., 1995; Cajaraville et al., 2000).

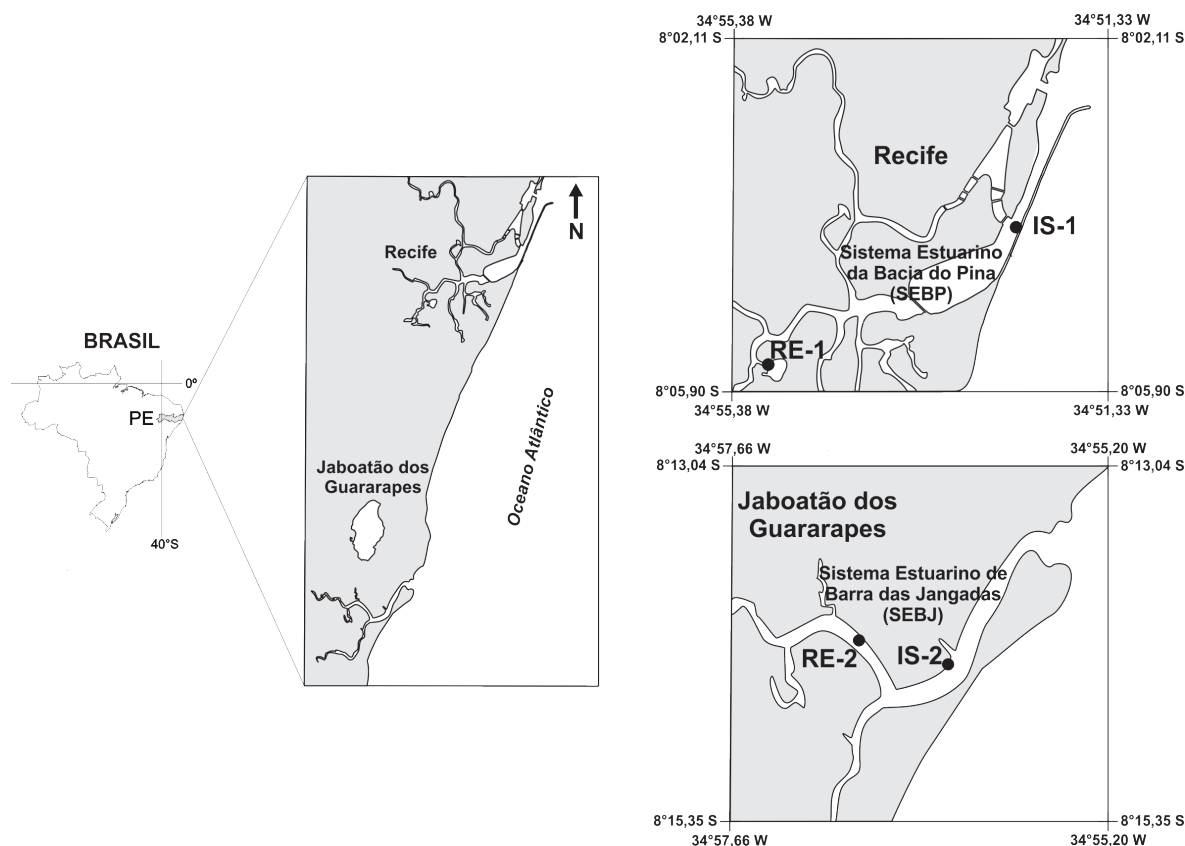


Figura 1 - Mapa da região de estudo em que o barrigudinho *Poecilia vivipara* foi utilizado em experimentos de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e coletado como organismo sentinela residente (RE) em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2).

No monitoramento ambiental usando parâmetros ecotoxicológicos, o uso de espécies nativas coletadas nos ambientes a serem avaliados é desejável (Freitas & Rocha, 2011; Krull & Barros, 2012), evitando extrapolações sobre efeitos entre espécies diferentes. O barrigudinho *Poecilia vivipara* (Poeciliidae) se enquadra nesta categoria, sendo uma espécie de peixe vivípara, eurialina, com ampla distribuição ao longo da costa do Oceano Atlântico Sul (Gomes Jr & Monteiro, 2008), e residente em ambos estuários mencionados acima.

A exposição *in situ* de peixes também é uma abordagem útil em avaliações de risco ecológico para identificar efeitos de contaminantes após exposições tipicamente de curta duração, e integram aspectos que oferecem robustez ecológica aos resultados, uma vez que a exposição é realizada sob condições reais (semi-controladas) fora dos cenários tipicamente controlados de experimentos em laboratório (Castro et al., 2004; Camargo & Martinez, 2006; Hanson & Larsson, 2011; Kerambrun et al., 2011; Miller et al., 2014). Por outro lado, a coleta de peixes residentes

possibilita a avaliação de respostas crônicas decorrentes de exposições de longa duração (Winter et al., 2005). Além disso, a comparação entre a estratégia *in situ* e a coleta de residentes utilizando uma mesma espécie pode fornecer informações sobre variações no tempo de resposta, ou possíveis adaptações e/ou susceptibilidade em relação aos parâmetros aplicados (Winter et al., 2005; Lurman et al., 2010).

P. vivipara tem sido usado como modelo biológico em estudos avaliando efeitos de HPAs (Machado et al., 2014; Torreiro-Melo et al., 2015) e de metais (Machado et al., 2013) em laboratório, mas seu uso em estudos ecotoxicológicos em campo ainda é limitado.

Tendo em vista que a grande maioria dos estuários costeiros sofre algum tipo de influência antropogênica, é difícil o estabelecimento de uma região controle, em que a espécie monitorada esteja livre da potencial exposição a contaminantes (Webb & Gagnon, 2013).

Neste sentido, o pequeno porte de *P. vivipara* se torna ainda mais relevante, uma vez que facilita tanto seu cultivo em laboratório quanto a logística de exposição e coletas em campo. Indivíduos da espécie mantidos em laboratório sob condições de cultivo em água limpa podem ser utilizados como controles tanto para indivíduos do mesmo grupo que são expostos *in situ* nos ambientes a serem estudados, quanto para indivíduos residentes nestes mesmos ambientes (Winter et al., 2004; Winter et al., 2005; Webb & Gagnon, 2013).

Ambientes aquáticos estuarinos estão particularmente sujeitos a contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), através de fontes pirogênicas relacionadas à queima de combustíveis fósseis, ou por fontes petrogênicas decorrentes de atividades relacionadas à cadeia produtiva do petróleo, incluindo descargas de efluentes urbanos ou acidentes envolvendo petróleo (Zanardi et al., 1999; Martínez-Gómez et al., 2010; Perhar & Arhonditsis, 2014). Entre os biomarcadores de exposição mais utilizados estão enzimas de biotransformação de fase I (Kammann et al., 2013), que atuam na metabolização inicial de compostos orgânicos. A avaliação da atividade catalítica da enzima de fase I CYP1A pela análise da 7-etoxirresorufina-O-deetilase (EROD) é um conceituado biomarcador da exposição a contaminantes relativamente específicos, que incluem compostos aromáticos planares como as bifenilas policloradas (PCBs), as dioxinas, os furanos, e os HPAs. A EROD é utilizada há mais de três décadas no monitoramento de ambientes contaminados por PCBs e dioxinas (Goksøyr & Förlin, 1992; Whyte et al., 2000; Fonseca et al., 2011), e também é amplamente utilizada no monitoramento dos efeitos do petróleo em peixes (Kennedy, 2015).

A biotransformação de fase II nos peixes é executada em especial pela enzima glutathione S-transferase (GST), que catalisa a reação de conjugação dos produtos lipofílicos, inclusive de HPAs, à glutathione reduzida (GSH) (Livingstone et al., 1995; van der Oost et al., 2003). Os produtos da metabolização, concentrados na vesícula biliar, podem ser quantificados para obtenção de

informações de doses internas de HPAs (Förlin & Wachtmeister, 1989). Assim, a detecção de metabólitos de HPAs na bile de peixes tem sido recomendado para avaliar a exposição recente a HPAs (Lin et al., 1996; Stephensen et al., 2000; Vuorinen et al., 2006), e o método semi-quantitativo de fluorescência de comprimento de onda fixo ou fluorescência fixa (*Fixed Fluorescence* - FF) tem sido utilizado por sua simplicidade e eficiência (Lima et al., 2008; Insausti et al., 2009; Santos et al., 2010). A incorporação de medidas comportamentais em estratégias multi-biomarcadores no monitoramento ambiental pode fornecer respostas que integrem efeitos em diferentes níveis de organização biológica, ligando respostas subcelulares e mecanismos fisiológicos a alterações ecologicamente relevantes (Scott & Sloman, 2004). A nível fisiológico, a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) é um potente biomarcador específico de contaminantes agrícolas como os organofosforados e carbamatos (Sturm et al., 1999), e cuja inibição pode prever efeitos comportamentais mal adaptativos em peixes (Pessoa et al., 2011).

Dentre os biomarcadores comportamentais, aqueles relacionados à natação são de especial interesse, tendo em vista sua relevância para diversas atividades fundamentais em peixes (Little et al., 1990). Desta forma, este trabalho teve como objetivo a aplicação de uma abordagem com múltiplos biomarcadores (metabólitos biliares de HPAs, EROD, GST, AChE, velocidade e resistência natatória), utilizando indivíduos de *P. vivipara* mantidos em laboratório para exposições *in situ* (IS), e indivíduos residentes (RES) coletados em dois estuários costeiros, o sistema estuarino da Bacia do Pina (SEBP), e o sistema estuarino de Barra de Jangada (SEBJ), para avaliação do grau de poluição química destes estuários.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta e manutenção dos peixes em laboratório

Os exemplares de *P. vivipara* utilizados neste estudo incluíram animais mantidos sob cultivo no Laboratório de Ecotoxicologia da UFPE, e animais residentes coletados diretamente nos sistemas estuarinos avaliados, SEBP e SEBJ. Os animais utilizados neste estudo foram fêmeas, com comprimento total de $40,5 \pm 4,7$ mm (média $\pm$ desvio padrão).

Os peixes mantidos em laboratório foram capturados usando redes de mão (puçás) no SEBP, no canal que liga o estuário do rio Tejipió à Lagoa do Araçá (Recife, Pernambuco, Nordeste do Brasil; 8°05'35.6 "S, 34°55'04.5" W), mesmo local onde foram capturados indivíduos residentes para análise (RE-1, Figura 1). A coleta ocorreu 8 semanas antes do experimento, e os peixes foram transportados para o laboratório em tanques com aeração constante. Após a chegada ao biotério aquático do Laboratório de Ecotoxicologia (Labecotox), os peixes foram aclimatados da salinidade no momento da coleta, de aproximadamente 15, para a salinidade 25 ao longo de 3 dias, e mantidos em aquários de 100 L integrados a um sistema de recirculação com filtro mecânico de lã, filtro biológico já maduro com cilindros de cerâmica devidamente colonizadas por bactérias nitrificantes. A água do mar utilizada nestes aquários foi obtida da estação de Aquicultura da empresa Netuno em Sirinhaém, com salinidade 35, e foi ajustada para salinidade 25 com água doce, mantida em temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, pH 8,3 e oxigênio dissolvido acima de 6 mg L^{-1} , e os níveis de amônia NH_3 foram monitorados indiretamente pela concentração de amônia total e pH, e mantidos abaixo de 0,01 ppm. A água do mar dos aquários foi coletada para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos dissolvidos e dispersos (HAPDDs), e os resultados indicaram concentrações abaixo do limite de detecção do método descrito no item 2.4. O fotoperíodo foi fixado em 12 h L/12h E. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com náuplios de *Artemia* sp. recém-eclodidos, e também com ração comercial para peixe com 45% de proteína (Alcon Artemia, Camboriú, Brasil), até o dia anterior ao início do experimento.

2.2. Experimentos de exposição *in-situ*

Para os experimentos de exposição *in situ* foram confeccionadas gaiolas de PVC com volume de 3,3 L segundo modelo proposto para pequenos peixes por Meletti & Rocha (2002). As gaiolas foram feitas com tubos de PVC de 150 mm de diâmetro, com 4 janelas laterais (55 mm) e uma abertura na base (145 mm), todas cobertas com redes de abertura de 2 mm. Uma base de aço inox (com 250 mm de lado) foi fixada em cada gaiola para conferir estabilidade durante a imersão em lugares com uma forte corrente.

Três grupos de aproximadamente 24 peixes mantidos no laboratório em água limpa foram previamente selecionados. Dois destes grupos de 24 peixes foram transportados do laboratório para

os locais de exposição, cada grupo em 1 reservatório plástico de 50 L, contendo a mesma água da manutenção do cultivo de peixes (salinidade 25), e com aeração constante. No sistema estuarino Bacia do Pina, o local de fixação das gaiolas de PVC para exposição *in situ* foi o pier flutuante do Iate Clube Casa de Banho, localizado no canal de saída do SEBP (Figura 1, IS-1). No sistema estuarino Barra de Jangadas, o local de fixação das gaiolas de PVC para exposição *in situ* foi um pier flutuante localizado no canal de saída do SEBJ (Figura 1, IS-2). Em ambos os locais as gaiolas *in-situ* foram posicionadas a 1m abaixo da superfície da água, posição que foram mantidas durante toda a exposição uma vez que foram fixadas em piers flutuantes que oscilam com a variação de maré. A amplitude da maré no período do experimento variou 0.0 a 2.7 m (maré de sizígia). Foi previamente verificado que nas marés baixas as gaiolas ainda se posicionariam mais de 1m acima do fundo nestes locais. Em cada um dos locais de exposição, 2 grupos de 12 peixes foram cuidadosamente transferidos para duas gaiolas de exposição que foram mantidas em cada um dos locais, assegurando que todos estavam perfeitamente saudáveis. Durante o período de exposição de 96 h, os parâmetros físico-químicos salinidade, temperatura, O.D., pH e concentração de hidrocarbonetos aromáticos foram verificados a cada 24 h em SEBP-IS1 e SEBJ-IS2.

Simultaneamente aos experimentos de exposição *in situ*, um grupo controle (CON) representado pelo terceiro grupo de 24 peixes continuou mantido no Labecotox pelas mesmas 96 h, em 2 grupos de 12 peixes confinados em gaiolas idênticas às usadas nas exposição *in situ*, no interior dos mesmos aquários contendo 100 L de água do mar com sistema de recirculação descrito anteriormente.

Ao final do período de exposição de 96 h em ambos sistemas estuarinos, as gaiolas foram retiradas e os peixes foram transportados para o laboratório na água do local onde foram expostos, nos mesmos recipientes plásticos de 50 L, com aeração constante, para posterior análise dos parâmetros propostos. Ao chegarem no laboratório, os peixes de SEBP-IS1 e SEBP-IS2 foram colocados em aquários de 15 L contendo a mesma água das áreas de coleta, e mantidos em temperatura de $25,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, com aeração constante, até a realização dos experimentos comportamentais e da coleta de tecidos.

2.3. Coleta de animais residentes nos estuários

Os animais residentes (RE) na área do SEBP foram coletados no canal que liga o estuário do rio Tejiptio à Lagoa do Araçá (Figura 1, SEBP-RE1), e na área do SEBJ os peixes foram coletados na porção mais interna do estuário conforme indicado na Figura 1, SEBJ-RE1. Imediatamente após a coleta usando puçás, 24 peixes residentes destes dois estuários foram transportados para o laboratório em recipientes plásticos de 50 L, com aeração constante e água do local de coleta. Ao chegarem no Labecotox, os peixes foram mantidos por 72 h em aquários de 15 L contendo a mesma

água das áreas de coleta, e mantidos em temperatura de $25,0 \pm 0,5$ °C, com aeração constante, até a realização dos experimentos comportamentais e da coleta de tecidos. Durante este período de 72 h em laboratório, os peixes não foram alimentados para estimular o acúmulo de bile na vesícula biliar.

2.4. Hidrocarbonetos aromáticos de petróleo dissolvidos e/ou dispersos na água (HAPDDs)

Foram realizadas coletas de água sub-superficial em duplicatas nos pontos de exposição *in situ* e nos pontos de coleta dos animais residentes, para as análises de HAPDDs, duas vezes ao dia, durante a preamar e baixa mar. As amostras foram coletadas a 1 m de profundidade, usando garrafas âmbar de 4 L. A extração dos HAPDDs foi feita com n-hexano e o extrato foi concentrado a 10 mL. As amostras foram analisadas por fluorescência fixa (FF) em espectrofluorímetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, EUA) nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 260/380 nm para o fenantreno e de 310/360 nm para o criseno. As médias das concentrações de HAPDDs foram expressas em equivalentes de fenantreno (HAPDD_{fen}) ou de criseno (HAPDD_{cri}) em $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.5. Determinação de metabólitos biliares

Após os procedimentos dos testes comportamentais, os peixes foram eutanizados em água a 2°C, segundo protocolos internacionais de experimentação animal (Use of Fishes in Research Committee, 2014), e protocolo aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Em seguida foi determinado o comprimento total do corpo em mm, peso total em balança analítica com precisão de 0,0001 g e a vesícula biliar foi dissecada e retirada inteira. As vesículas biliares foram transferidas para tubos eppendorf e pesadas em balança analítica com uma precisão de 0,0001 g para estimar o volume biliar, considerando 0,001 g de bile ser equivalente a 1 μL . As amostras de bile foram imediatamente diluídas numa proporção 1:500 (v/v) em solução de metanol/água ultrapura 50% (v/v), e estocadas em ultrafreezer a -80 °C até o momento das análises. A determinação dos metabólitos dos HPAs nas amostras de bile foi realizada por quantificação de fluorescência fixa (FF) (Aas et al., 2000) em espectrofluorímetro Spectramax M3 em microplacas pretas de 96 poços modelo Fluotrac 200 (Greiner), nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 260/380 nm para o fenantreno e de 310/360 nm para o criseno. A média da fluorescência quantificada nos controles foi descontada dos valores de fluorescência detectados na bile dos peixes dos diferentes tratamentos *in-situ* e residentes. Uma curva analítica para o fenantreno e outra para o criseno, cada composto dissolvido isoladamente em metanol/água 50% (v/v) foi preparada com dez pontos, incluindo o branco, com concentrações de 7,8 a 2.000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Análises de regressão linear foram aplicadas aos dados relacionando a concentração dos HPAs dissolvidos em metanol/água

50% e suas unidades de fluorescência relativa (UFRs), e foram expressas pelas seguintes equações lineares:

Para o fenantreno: $UFR = 5,05 \cdot C_F + 171,3$

Para o criseno: $UFR = 1,392 \cdot C_C + 36,478$

Onde: C_F e C_C são as concentrações de fenantreno e criseno.

Todas as amostras foram quantificadas em duplicatas e suas médias foram utilizadas para os cálculos. Uma vez que o método é semi-quantitativo, os dados foram interpretados como o total de metabólitos em equivalentes do HPA fenantreno ($Bile_{fen}$) ou do HPA criseno ($Bile_{cri}$). Nesta metodologia assume-se que toda a fluorescência detectada nas amostras de bile em pares de excitação/emissão listados acima seja devido à presença de moléculas destes HPAs específicos. Para o cálculo das concentrações em equivalentes de fenantreno e criseno, as médias de UFRs da bile dos controles nos comprimentos de onda relativos ao fenantreno, igual a 294 UFRs, e criseno, igual a 265 UFRs, foram descontadas das leituras das amostras dos peixes expostos *in situ* e residentes nos estuários.

Foram determinados os fatores de bioconcentração biliar (FBC biliar) pela razão entre a concentração total de equivalentes de cada HPA na bile e a concentração de HPADDs na água dos ambientes avaliados, para avaliar a taxa de bioconcentração biliar dos peixes expostos *in-situ* e dos peixes residentes nos dois sistemas estuarinos, a partir da equação:

$$FBC = (HPA_{bile}) / [HPADD_{\text{água}}]$$

2.6. Biomarcadores Bioquímicos

Para a quantificação das atividades da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e glutathione-S-transferase (GST), amostras de fígado (pools de dois indivíduos) foram retirados do freezer a -80°C , homogeneizados com homogeneizador de tecidos Tissue Master 125 (Omni, EUA) a 4°C em tampão fosfato (Sódio e Potássio, pH 7,4) (1:8)(m/v), centrifugadas por 20 minutos a $10.000g$ a 4°C em centrífuga para microtubos refrigerada modelo 5415-R (Eppendorf, EUA). Em seguida, o sobrenadante foi coletado e estocado em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises de EROD e GST. Para a atividade da acetilcolinesterase (AChE), o tecido do cérebro inteiro incluindo os nervos óticos e os olhos, que foram separados de cada indivíduo e congelados, foram retirados do freezer -80°C , homogeneizados individualmente com homogeneizador de tecidos Tissue Master 125 (Omni, EUA) a 4°C em tampão Fosfato (Sódio e Potássio, pH 7,4) (1:4)(m/v), centrifugadas por 20 minutos a $10.000g$ a 4°C em centrífuga para microtubos refrigerada modelo 5415-R (Eppendorf, EUA). Em seguida, o sobrenadante foi coletado e estocado em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises de AChE.

2.6.1. Atividade da EROD

A atividade da EROD foi determinada fluorimetricamente em microplacas pretas de 96 poços modelo Fluotrac 200 (Greiner), em duplicatas de amostras. Foi medido o aumento da fluorescência decorrente da formação de resorufina, em espectrofluorímetro SpectraMax M3, nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 530/590 nm, a 25 °C durante 5 min, na presença da amostra, do substrato Etoxi-resorufina 2,66 μM e NADPH 6,68 mM (Eggens & Galgani, 1992). A atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

2.6.2. Atividade da Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada pelo método descrito por Habig & Jakoby (1981) medindo a conjugação de glutathione (GSH; Sigma Aldrich) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB; Sigma Aldrich). Resumidamente, o ensaio enzimático em duplicatas de cada amostra foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPI) 100 mM (pH 7,0), contendo GSH 1 mM, tendo como substrato iniciador o CDNB 1 mM. O composto conjugado formado foi detectado espectrofotometricamente ao longo de 3 min em 340nm ($\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), em espectrofotômetro SpectraMax M3, a 25 °C. A atividade enzimática foi expressa em nmol de CDNB conjugado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

2.6.3. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE cerebral foi determinada segundo Ellman et al. (1961), adaptado para microplacas. Cada amostra foi lida em duplicata, e foram adicionados 50 μL da amostra diluída 1:20 (v:v) em tampão Fosfato, 200 μL de solução de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitro-benzóico (DTNB), e essa mistura foi lida em 415 nm por 2 min em espectrofotômetro para determinação da atividade basal sem substrato iniciador. Em seguida, após a adição de 50 μL do substrato iniciador solução de Iodeto de Acetilcolina (AChI), as amostras foram lidas novamente em 415 nm por 2 min para avaliação da velocidade de formação do ácido 5-thio-2-nitrobenzóico (TNB), em unidades de absorbância por minuto. A atividade enzimática foi expressa em μmol de AChI.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

2.6.4. Quantificação de proteínas

O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método Bradford (1976) adaptado para microplaca de 96 poços em espectrofluorímetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, EUA, EUA), usando-se albumina de soro bovino como padrão. A atividade enzimática da EROD, GST e AChE foram normalizadas pela concentração de proteína total.

2.7. Biomarcadores Comportamentais

2.7.1. Velocidade Natatória

Para avaliar a velocidade natatória espontânea, os peixes a serem testados de cada tratamento foram transferidos individualmente para aquários (14 cm de comprimento x 10,5 cm de largura x 13,5 cm de profundidade), com 700 mL de água (5 cm de profundidade). As arenas experimentais foram monitoradas por vista superior por câmeras de vídeo equipadas com lentes zoom de 6-60 mm de distância focal, conectadas a uma placa de captura de vídeo (Geovision modelo GV-900, Irvine, CA) para gravação digital dos vídeos em computador acoplado ao sistema. As gravações foram iniciadas após 10 minutos de aclimação aos aquários, e tiveram duração de 30 minutos. Os vídeos foram processados pelo software *Smart* (PanLab Harvard Apparatus, EUA) para o cálculo da velocidade média de natação (cm s^{-1}).

2.7.2. Resistência Natatória

A resistência natatória foi determinada pela avaliação da capacidade do peixe se manter nadando em um fluxo contra-corrente de água em vazões crescentes. O sistema de teste desenvolvido por Melo (2011) inclui bombas de água e um tubo de acrílico transparente onde o peixe é mantido, e através do qual a água circula com vazões controláveis. Após a introdução de cada peixe individualmente no sistema, ele é exposto a uma sequência de aumentos do fluxo de água, controlado por uma válvula de PVC. O fluxo inicial foi de 2 L min^{-1} , e aumentou até o fluxo máximo de 12 L min^{-1} , correspondendo a uma velocidade da água na secção onde o peixe foi testado de $4,7 \text{ cm s}^{-1}$ até $28,2 \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente. Depois de um período de 90 s de aclimação, o teste foi iniciado a partir do fluxo de 2 L min^{-1} , que foi progressivamente aumentado em intervalos de 1 min através de ajustes (meias-voltas) na válvula de PVC. O término de cada teste individual foi marcado pela saída do peixe do sistema experimental, após ser arrastado pela corrente, caindo em uma cesta num tanque inferior. A resistência natatória foi quantificada pelo Índice de Resistência Natatória (IRN), com base na equação:

$$\text{IRN} = \text{VA} + (\text{TV}'/60) * \text{V}'$$

Onde: VA = vazão acumulada: soma das vazões contra as quais o peixe nadou por 1 min completo (L min^{-1}); TV' = tempo em segundos no qual o peixe foi capaz de ficar no sistema sob o mais alto fluxo testado; V' = maior vazão testada na qual o peixe foi arrastado para fora do sistema (L min^{-1}).

2.8. Análises estatísticas

Para cada parâmetro avaliado, os cinco tratamentos foram comparados, peixes controle, peixes de cada um dos dois pontos de exposição *in situ*, e peixes residentes em cada um dos dois

estuários. A comparação foi feita usando análise de variância de um fator (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett para verificar diferenças entre o controle e os tratamentos. Os dados foram previamente testados para normalidade (Kolmogorov–Smirnov) e homoscedasticidade (teste de medianas Levene). Quando não foi observada normalidade ou homoscedasticidade, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal- Wallis (K-W), seguido do teste de Dunn para avaliar diferenças entre o controle e os tratamentos. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o software Sigmaplot versão 11 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany), com alfa de 5%.

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros físico-químicos

A temperatura da água no local dos experimentos de exposição *in situ* variou de modo semelhante nos dois sistemas estuarinos (Figura 1), oscilando entre 25,4 e 27,4 °C. No momento da coleta dos peixes residentes, a temperatura da água em SEBP-RE1 foi de 26,1 °C, inferior à temperatura de 29,1 °C em SEBJ-RE2 (Tabela 1). As concentrações de oxigênio dissolvido, pH e salinidade no local dos experimentos de exposição *in situ* também variaram de modo semelhante nos dois sistemas estuarinos, oscilando entre 2,4 e 6,1 mgO₂ L⁻¹, 7,1 e 8,2 de pH, e 3,4 a 35 de salinidade.

Nos locais onde foram coletados os animais residentes, o oxigênio dissolvido varia mais em SEBP-RE1, podendo atingir concentrações inferiores a 1mgO₂ L⁻¹, o que não é observado em SEBJ-RE2, que por sua vez pode atingir temperaturas ligeiramente superiores. Os parâmetros pH e salinidade oscilam de modo semelhante, típicos de estuários (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos registrados nas áreas de estudo dos sistemas estuarinos da Bacia do Pina (SEBP) e de Barra das Jangadas (SEBJ). Variação exibida (valores mínimos e máximos) durante o experimento *in situ* (IS-1 e IS-2) e valores registrados no momento da coleta dos residentes (RE-1 e RE-2).

Área		Temperatura (C°)	O.D. (mg L ⁻¹)	pH	Salinidade
SEBP	IS-1	26,1 – 27,1	2,4 - 5,4	7,4 - 8,2	17,2 - 35,7
	RE-1	26,1	<1 – 5,5	7,4	19,3
SEBJ	IS-2	25,4 -27,4	2,3 - 6,1	7,1 - 8,2	3,4 - 33,8
	RE-2	29,1	4 - 6,2	8	8,5

3.2. HAPDDs

As concentrações na água de equivalentes de fenantreno (HAPDD_{fen}) e criseno (HAPDD_{cri}) dissolvidos e/ou dispersos atingiram maiores concentrações em SEBP do que em SEBJ. HAPDD_{fen} e HAPDD_{cri} oscilaram entre 0,33 e 1,66 µg L⁻¹, e entre 0,40 e 1,14 µg L⁻¹, respectivamente (Tabela 2). No SEBP foram observadas maiores concentrações de HAPDD_{fen} e HAPDD_{cri} na porção mais interna do estuário (SEBP-RE1), quando comparadas com a área de saída do estuário SEBP-IS1. No SEBJ nenhum padrão semelhante para HAPDD_{fen} ou HAPDD_{cri} é evidente, e as concentrações são semelhantes em ambos pontos avaliados.

3.3. Metabólitos biliares

As concentrações de metabólitos biliares dos HPAs fenantreno ($Bile_{fen}$) e criseno ($Bile_{cri}$) foram superiores nos animais do SEBP comparados com SEBJ, sendo estatisticamente superiores aos valores observados nos peixes controle (K-W, $H_4 = 56,2$; $p = 0,001$; Dunn, $p < 0,05$), de modo semelhante ao padrão encontrado para HAPDDs (Figura 2 e Tabela 2). No SEBP foram detectadas concentrações de $Bile_{fen}$ estatisticamente superiores aos controles tanto nos peixes residentes da porção mais interna do estuário (SEBP-RE1) quanto nos peixes expostos *in situ* por 96 hs na área mais externa (SEBP-IS1). Valores de $Bile_{cri}$ foram superiores ao controle somente nos peixes expostos *in situ* nas áreas externas dos estuários, em SEBP-IS1 e em SEBJ-IS2 (K-W, $H_4 = 28,0$; $p = 0,001$; Dunn, $p < 0,05$). No SEBJ foram detectadas concentrações de $Bile_{fen}$ estatisticamente superiores aos controles somente nos peixes expostos *in situ* por 96 hs na área mais externa (SEBJ-IS2) (Figura 2 e Tabela 2).

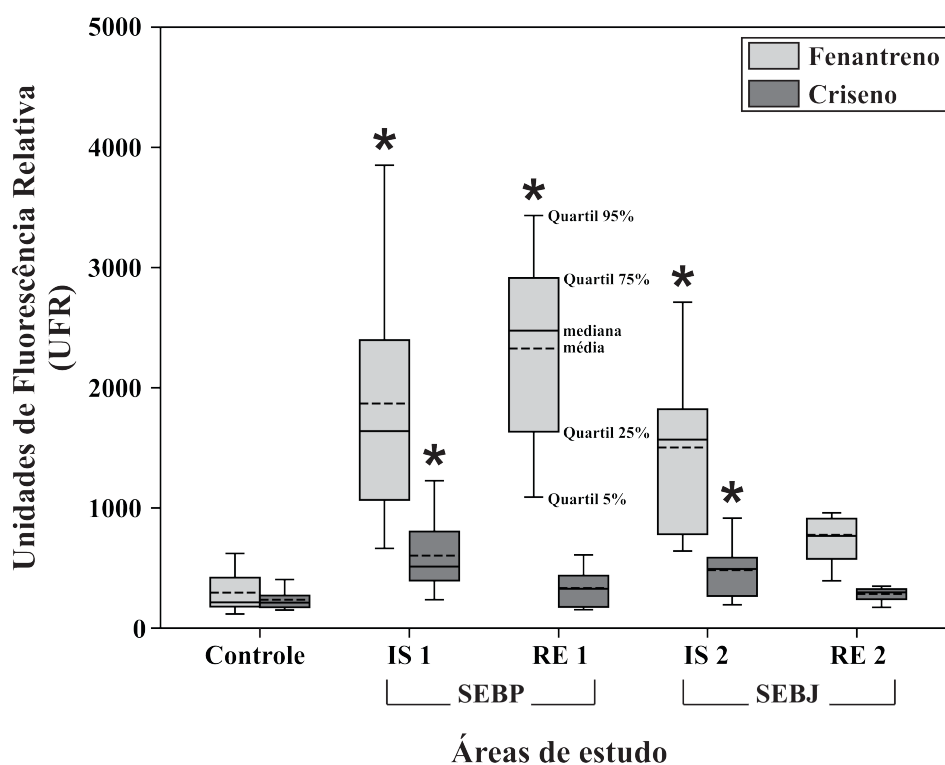


Figura 2 - Fluorescência da bile em unidades de fluorescência relativa (UFRs) (medianas e percentis, $n = 20-24$) de fenantreno e criseno no barrigudinho *Poecilia vivipara*, após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). (*): Significativamente diferente em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório) (K-W, $H_4 = 56,2$; $p = 0,001$; Dunn, $p < 0,05$).

O log do fator de bioconcentração na bile para o fenantreno ($\log FBC_{bile-fen}$) dos peixes testados oscilou pouco, entre 5,05 e 5,32, refletindo uma razão relativamente estável entre as concentrações estimadas de fenantreno na água ($HAPDD_{fen}$) e na bile ($Bile_{fen}$). O $\log FBC_{bile-cri}$ dos

peixes testados oscilou entre 4,60 e 5,33, com valores superiores a 5,2 estimados para os peixes expostos *in situ* nos dois estuários (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração na água de hidrocarbonetos aromáticos de petróleo dissolvidos e dispersos (HAPDDs) expressos em equivalentes de fenantreno e criseno ($\mu\text{g L}^{-1}$); concentração em metabólitos equivalentes dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile fenantreno ($\text{HPA}_{\text{bile-Fen}}$) e criseno ($\text{HPA}_{\text{bile-Cri}}$) ($\mu\text{g L}^{-1}$), Log fator de bioconcentração biliar ($\text{FBC}_{\text{bile}}^a$) de fenantreno e criseno; em peixes da espécie *Poecilia vivipara*. Resultados (média $\pm$ D.P.) envolvem indivíduos expostos por 96 h *in situ* (IS) nos sistemas estuarinos Bacia do Pina (SEBP-IS1) e de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em exemplares residentes (RE) coletados nestas áreas (SEBP-RE1 e SEBJ-RE2).

	Fenantreno				Criseno			
	SEBP		SEBJ		SEBP		SEBJ	
	IS-1	RE-1	IS-2	RE-2	IS-1	RE-1	IS-2	RE-2
Concentração na água ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,74 ($\pm 0,21$)	1,66 ($\pm 1,15$)	0,47 ($\pm 0,17$)	0,33	0,54 ($\pm 0,16$)	1,14 ($\pm 0,62$)	0,40 ($\pm 0,10$)	0,40
Metabólitos equivalentes na bile ($\mu\text{g L}^{-1}$)	155835* (± 106248)	201040* (± 77988)	119655* (± 67486)	47612 (± 28700)	121176* (± 121225)	24331 (± 56941)	77814* (± 82897)	6489 (± 22762)
Log Fator de bioconcentração (Log $\text{FBC}_{\text{bile}}^a$)	5,22 ($\pm 0,31$)	5,05 ($\pm 0,20$)	5,32 ($\pm 0,30$)	5,11 ($\pm 0,26$)	5,25 ($\pm 0,47$)	4,60 ($\pm 0,35$)	5,33 ($\pm 0,35$)	4,78 ($\pm 0,40$)

^a: $\text{FBC}_{\text{bile}} = [\text{HPA}_{\text{bile}}]/[\text{HPA}_{\text{água}}]$

*: Diferentes em relação ao controle (Kruskall Wallis e teste de Dunn, $p < 0,05$)

3.4. Sobrevivência

No presente estudo não foi registrada mortalidade dos peixes em nenhum dos pontos de exposição *in situ*. Da mesma forma, todos os peixes residentes nos estuários que foram coletados e transportados para o laboratório sobreviveram ao período de manutenção em laboratório que antecedeu os testes comportamentais e a coleta de tecidos para análise de biomarcadores bioquímicos.

3.5. Biomarcadores Bioquímicos de Exposição

A atividade da EROD (média $\pm$ D.P.) foi significativamente mais alta apenas nos peixes residentes dos dois estuários, SEBP-RE1 (6164 ± 4007 pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹) e SEBJ (16172 ± 6394 pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹), quando comparadas ao controle (748 ± 674 pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹) (K-W, $H_4 = 26,4$; $p = 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) (Figura 3).

A atividade da GST (média $\pm$ D.P.) foi significativamente aumentada nos peixes residentes do SEPB-RE1 (802 ± 261 nmol de CDNB conjugado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹), do SEBJ-RE2 (712 ± 149 nmol de CDNB conjugado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹), e nos peixes do experimento *in situ* do SEBJ-IS2 (762 ± 363 nmol de CDNB conjugado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹), quando comparadas ao controle (277 ± 201 nmol de CDNB conjugado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹) (ANOVA I, $F_{(4,39)} = 7,4$; $p < 0,001$; Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 4).

Não foi detectada diferença estatística entre a atividade da AChE cerebral em *P. vivipara* proveniente de nenhum dos locais estudados em relação ao controle (K-W, $H_4 = 7,5$; $p = 0,10$; Dunn, $p > 0,05$) (Figura 5).

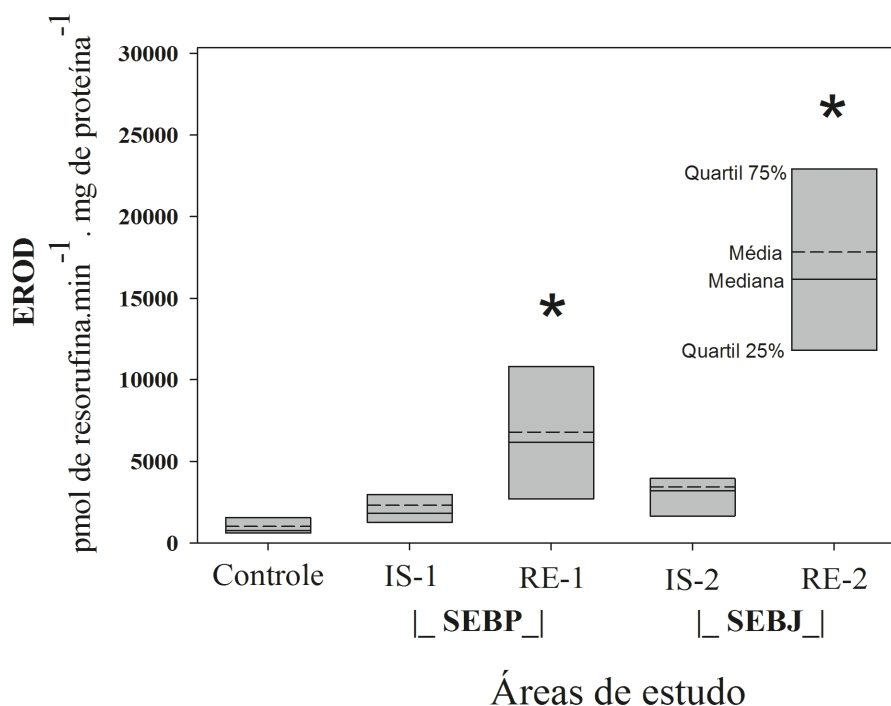


Figura 3 - Atividade da Etoxiresorufina-orto-deetilase (EROD) (mediana e quartis, $n = 8$) em fígado do barrigudinho *Poecilia vivipara*, após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). (*): Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório).

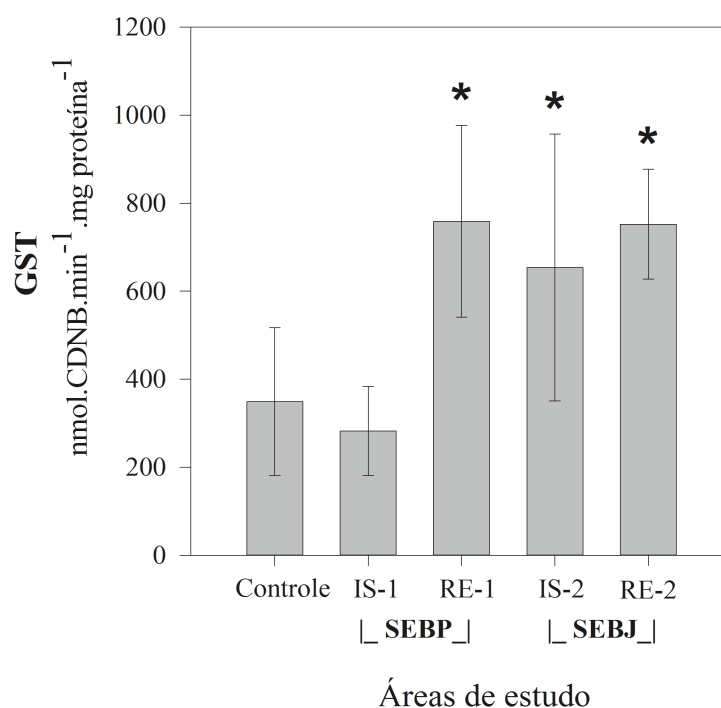


Figura 4 - Atividade da Glutathione-S-transferase (GST) (média $\pm$ desvio padrão, $n = 8$) em fígado do barrigudinho *Poecilia vivipara*, após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). (*): Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório).

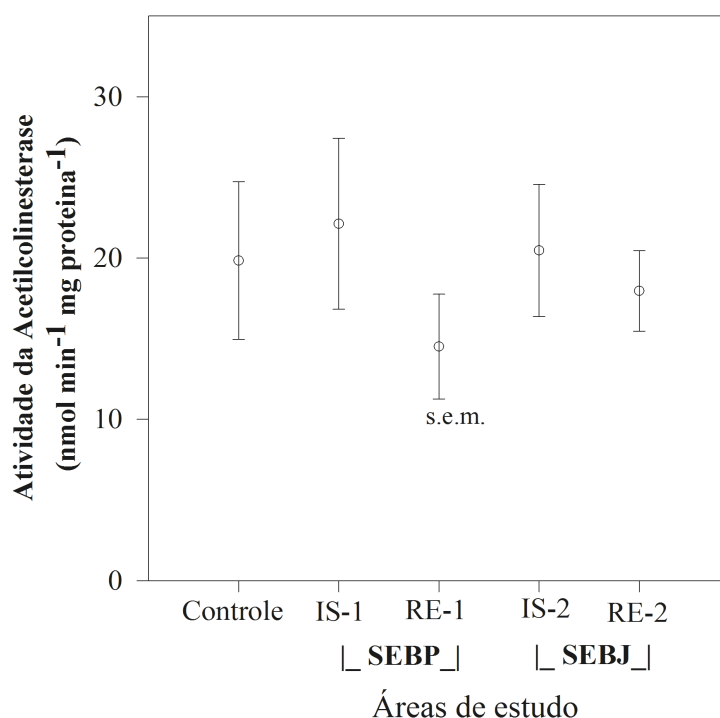


Figura 5 - Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) (média $\pm$ 95% confiança; $n = 15$) em cérebros de indivíduos do barrigudinho *Poecilia vivipara*, após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). s.e.m.: significância estatística marginal em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório); (Anova 1, $F_{4,70} = 2,27$, $p = 0,068$).

3.6. Atividade Natatória Espontânea

A velocidade natatória espontânea foi elevada significativamente apenas nos peixes expostos *in situ* do SEBJ-IS2. Neste grupo, a mediana de velocidade média foi de 2 cm.s⁻¹, um aumento de 65% em relação ao controle, cuja mediana foi 1,2 cm.s⁻¹ (K-W, $H_4 = 18,2$; $p = 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) (Figura 6).

3.7. Resistência Natatória

O índice de resistência natatória (IRN) diminuiu em mais de 50% nos peixes residentes dos dois sistemas estuarinos estudados, e nos peixes expostos *in situ* por 96 h no SEBJ-IS2, quando comparados à resistência natatória dos controles (ANOVA I, $F_{(4,106)} = 31,2$; $p < 0,001$; Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 7).

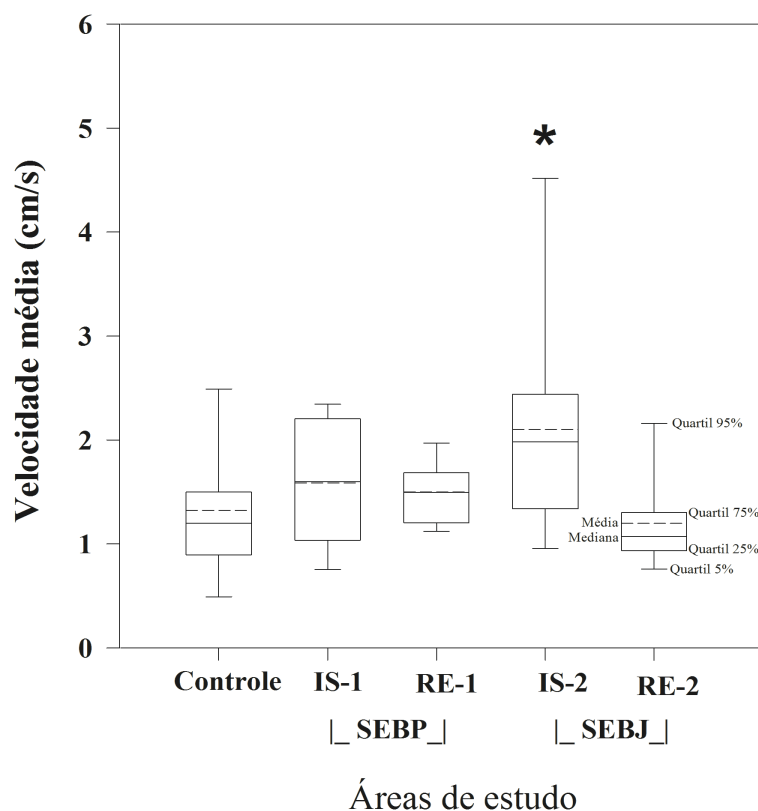
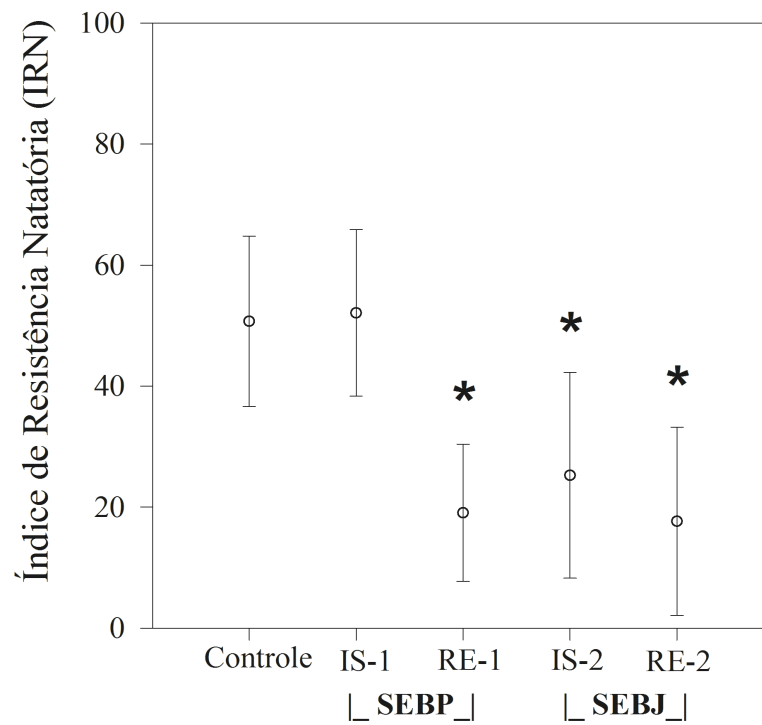


Figura 6 - Velocidade média de natação espontânea (medianas e percentis, $n = 20-24$) no barrigudinho *Poecilia vivipara*, após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). (*): Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório).



Áreas de estudo

Figura 7 - Índice de resistência natatória (média $\pm$ desvio padrão, $n = 20-24$) no barrigudinho *Poecilia vivipara* após 96 h de exposição *in situ* (IS) no sistema estuarino da bacia do Pina (SEBP-IS1), no sistema estuarino de Barra das Jangadas (SEBJ-IS2), e em *P. vivipara* residentes (RE) coletados em ambos sistemas (SEBP-RE1; SEBJ-RE2). (*): Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle (*P. vivipara* mantidos em cultivo no laboratório).

4. DISCUSSÃO

4.1. Parâmetros físico químicos

Os pontos de exposição *in situ* no SEBP-IS1 e SEBJ-IS2 se caracterizam por estarem na porção final do estuário, relativamente próximos da comunicação com o oceano, e apresentaram variações semelhantes dos parâmetros básicos salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido, típicas de qualquer estuário sobre forte influência das marés (Figura 1 e Tabela 1). Ambos ambientes se caracterizam por serem o canal principal de comunicação dos sistemas estuarinos com o oceano, e o fluxo de água na maré vazante em direção ao oceano traz a contribuição dos rios de cada um dos sistemas estuarinos. No SEBP há o carreamento de esgotos domésticos que causam decréscimo dos teores de oxigênio dissolvido na maré vazante em SEBP-IS1, com valores de salinidade por volta de 17, pH 7,4 e oxigênio dissolvido médio de 2,4 mg L⁻¹. Na maré enchente a entrada de água costeira marinha, caracterizada pelos valores de salinidade que chegaram a 35,7 e pH 8,2 em SEBP-IS1, eleva os teores de oxigênio dissolvido para valores mais altos, atingindo 5,4 mg L⁻¹ (Tabela 1). Um padrão semelhante pode ser observado em SEBJ, com menores valores de salinidade (média de 3,4) e pH (7,1) na maré vazante associados com menores concentrações de oxigênio dissolvido, que chegaram a 2,3 mg L⁻¹.

Entretanto, os locais de coleta de animais residentes diferem em termos de características gerais. O ponto onde foram coletados *P. vivipara* residentes no SEBJ-RE2 se caracteriza por ser uma pequena lagoa marginal de pequena profundidade diretamente conectada a porção final do SEBJ numa área não urbanizada, e os peixes foram coletados na maré baixa, quando as temperaturas atingem valores mais altos. Estas características diferem do ambiente em SEBP-RE1, que é um canal de comunicação da Lagoa do Araçá com o Rio Tejió na área urbana de Recife, de maior profundidade, onde a temperatura varia menos. No local onde foram coletados os animais residentes em SEBP-RE1 as variações da concentração de oxigênio dissolvido são maiores que as observadas em SEBP-IS1, pois podem chegar a concentrações inferiores a 1 mg L⁻¹ na porção central do canal, e até valores superiores a 5 mg L⁻¹. Os indivíduos de *Poecilia vivipara* tipicamente são observados nas margens do canal, onde a concentração de oxigênio dissolvido é superior pela turbulência da água, quando condições extremas de hipoxia se estabelecem no meio do canal. No local onde foram coletados os animais residentes em SEBJ-RE2 as concentrações de oxigênio dissolvido não atingem valores inferiores a 4 mg L⁻¹, e podem atingir concentrações superiores a 6 mg L⁻¹.

4.2. HAPDDs

A expressão da concentração de HPAs na água em equivalentes de criseno ($\text{HAPDD}_{\text{Cri}}$) é utilizada como um padrão básico a nível internacional para classificar o nível de contaminação de águas por HPAs, sendo que concentrações em $\text{HAPDD}_{\text{Cri}}$ inferiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ são típicas de ambientes com baixa contaminação, enquanto valores entre 1 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ estariam sujeitos a contaminação crônica segundo Lemos et al. (2014). As concentrações estimadas da região interna do SEBP-RE1 de $1,14 \mu\text{g L}^{-1}$ $\text{HAPDD}_{\text{Cri}}$ se enquadram na categoria de contaminação crônica, enquanto nos demais pontos as $\text{HAPDD}_{\text{Cri}}$ se enquadram na categoria de baixa contaminação por HPAs, inferiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Esta distinção básica pode ser usada para separar o SEBP, que estaria cronicamente contaminado, do SEBJ, com níveis baixos de contaminação por $\text{HAPDD}_{\text{Cri}}$. Favrod (2012) avaliou em 9 pontos do SEBP as concentrações de $\text{HAPDD}_{\text{Cri}}$ e verificou que o ponto de coleta do Rio Tejipió apresentou a maior concentração de $7,41 \mu\text{g L}^{-1}$.

O ponto SEBP-RE1 está em um braço do Rio Tejipió, no canal que comunica este rio com a Lagoa do Araçá. O Rio Tejipió recebe efluentes industriais e drena uma área urbana que também inclui postos revendedores de combustíveis, cujas caixas separadoras de água e óleo, que deveriam reter seus efluentes de lavagem, são ineficientes e a mistura de água e óleo destas caixas drena frequentemente para a rede pluvial. Concentrações de $\text{HAPDD}_{\text{Cri}}$ e $\text{HAPDD}_{\text{Fen}}$ superiores a 600 e $200 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, foram estimados nestes efluentes das caixas (Nepomuceno, 2015). Desta forma, as maiores concentrações de $\text{HAPDD}_{\text{Cri}}$ e $\text{HAPDD}_{\text{Fen}}$ observadas em SEBP-RE1, seguidas de valores inferiores em SEBP-IS1, na área de saída do estuário, são coerentes com o padrão descrito acima.

4.3. Metabólitos biliares e bioconcentração

Apesar da discussão acima, focada exclusivamente nas concentrações de HAPDDs na água, sugerir um nível de contaminação por HPAs relativamente baixo para ambos sistemas estuarinos, a análise de metabólitos biliares em *P. vivipara* destes mesmos HPAs demonstra claramente a significativa bioconcentração de HPAs em peixes que habitam estes estuários, atingindo concentrações em equivalentes de fenantreno na bile (Bile_{Fen}) de *P. vivipara* de até $201.040 \mu\text{g L}^{-1}$ em SEBP-RE1, e $119.655 \mu\text{g L}^{-1}$ em SEBJ-IS2. As concentrações de Bile_{Fen} no SEBP indicam exposições significativas dos peixes ao fenantreno, sendo maiores nos peixes residentes em SEBP-RE1, próximo ao rio Tejipió, e também elevadas em SEBP-IS1, na área do canal de saída do estuário, corroborando o padrão encontrado na água, mas evidenciando provável toxicidade para os peixes. No SEBJ-IS2, também foi detectada significativa bioconcentração de Bile_{Fen} e Bile_{Cri} , que pode estar relacionada a intensa atividade de barcos de recreação e pesqueiros na área, onde existem

muitas marinas, padrão que não foi detectado pela análise de HAPDDs na água. As maiores concentrações de criseno na bile de *P. vivipara* de 121.176 $\mu\text{g L}^{-1}$ em SEBP-IS1, e de 77.814 $\mu\text{g L}^{-1}$ em SEBJ-IS2 corroboram o padrão de acúmulo de fenantreno nas áreas de saída dos estuários, ambos estatisticamente diferentes dos valores detectados nos peixes controle não expostos. O cálculo do $\text{LogFBC}_{\text{bile-fen}}$ e do $\text{LogFBC}_{\text{bile-cri}}$ com base em concentrações internas de HPAs na bile dos peixes expostos nos diferentes pontos e respectivas concentrações de HAPDDs na água refletiram parcialmente previsões de bioconcentração com base nos coeficientes de partição octanol-água (K_{ow}) do fenantreno e do criseno. O $\text{LogFBC}_{\text{bile-fen}}$ calculado para os diferentes pontos do SEBP e SEBJ se manteve ao redor de 5,1, superior ao LogK_{ow} do fenantreno, estimado em 4,46 (Neff et al., 2005). Torreiro-Melo et al. (2015) e Torreiro-Melo (cap.2), usando a mesma metodologia de FF na bile, estimaram valores de $\text{LogFBC}_{\text{bile-fen}}$ para *P. vivipara* expostos ao fenantreno puro ($\text{LogFBC}_{\text{bile-fen}} = 4,3$) e ao fenantreno isolado numa mistura com naftaleno e pireno ($\text{LogFBC}_{\text{bile-fen}} = 4,0$) que se aproximaram do valor previsto pelo K_{ow} do fenantreno. Nesta metodologia, a escolha dos pares de excitação/emissão para cada HPA é feita de modo a se maximizar a emissão de fluorescência de um HPA específico, mas tipicamente um mesmo HPA é capaz de ser excitado e emitir fluorescência em múltiplos pares de excitação/emissão. No método FF, como não há separação das moléculas presentes na mistura, HPAs como o pireno podem fluorescer juntamente com o fenantreno quando a amostra é analisada nos comprimentos de excitação/emissão estabelecidos para quantificação de fenantreno. Desta forma, os valores dos $\text{LogFBC}_{\text{bile-fen}}$ calculados para os diferentes pontos analisados neste trabalho, superiores a 5, poderiam ser explicados pela presença de outras moléculas que fluorescem neste comprimento de onda, juntamente com o fenantreno.

4.4. Biomarcadores bioquímicos

A EROD pode ser induzida pela exposição a contaminantes relativamente específicos, sendo que os mais potentes indutores da atividade desta enzima, em ordem decrescente, são as dioxinas, os furanos, as bifenilas policloradas planares (PCBs), e por último os HPAs (Safe, 1990). Apesar da potência relativamente pequena dos HPAs para induzir a EROD comparada com estes outros contaminantes, ela é frequentemente utilizada no monitoramento de ambientes contaminados por petróleo (Whyte et al., 2000). O aumento significativo da atividade da EROD nos peixes residentes de ambos estuários do presente estudo é uma alteração frequentemente relatada em avaliações de ecossistemas costeiros onde os organismos estão sujeitos à exposição a contaminantes orgânicos, incluindo derivados de petróleo (Fonseca et al., 2011; Kerambrun et al., 2011). A maior concentração de fenantreno acumulado na bile em peixes residentes de SEBP-RE1 pode ter influenciado na elevação da atividade da EROD, 8x maior que nos controles. Entretanto,

concentrações também significativas de fenantreno e criseno na bile de peixes expostos *in situ* tanto em SEBP-IS1 quanto em SEBJ-IS2 não estão associadas a um aumento significativo da atividade da EROD, que só apresentaram uma tendência de aumento de 2,4 e 4,3x, respectivamente. O menor tempo de exposição dos peixes expostos *in situ* nos dois estuários pode ser um fator influenciador relevante, sugerindo que a atividade da EROD é capaz de responder por uma exposição crônica aos contaminantes biodisponíveis nas áreas de estudo.

Estratégias de exposição *in situ* com peixes enjaulados por períodos mais longos podem ser elucidativas sobre a variabilidade deste biomarcador. Como exemplo de exposição *in situ* por um período superior ao do presente estudo pode-se citar o trabalho realizado por Kerambrun et al. (2011), no qual os autores mantiveram robalos (*Dicentrarchus labrax*) e linguados (*Scophthalmus maximus*) enjaulados por 38 dias em uma região portuária na França e observaram indução significativa da EROD e da GST após este período. Em uma estratégia de exposição semelhante ao presente trabalho, Winter et al. (2005), realizaram um estudo expondo peixes selvagens (residentes) e peixes enjaulados por 4 semanas em rios poluídos no Reino Unido. Os autores observaram nos peixes enjaulados respostas mais consistentes da atividade da EROD, sendo a indução maior que o controle na região de poluição intermediária (3 a 4x maior) e na área mais poluída (4 a 5x). Além do aspecto tempo de exposição, as diferenças no potencial de indução da EROD por HPAs de diferentes tamanhos também é significativa (Bols et al., 1999). Fonseca et al. (2011) verificaram que a maior indução de EROD em três espécies de peixe em dois estuários portugueses não ocorreu no estuário com a maior concentração de HPAs totais, mas sim no estuário com maiores concentrações de HPAs de 4 a 6 anéis aromáticos, que são indutores mais potentes.

A maior indução da EROD neste estudo ocorreu nos animais residentes em SEBJ-RE2, 21x superior aos controles, coletados na lagoa marginal ao estuário do Rio Jaboatão, onde foram detectadas as menores concentrações de fenantreno e criseno na água e na bile dos peixes avaliados. Além do uso no monitoramento de áreas contaminadas por diferentes fontes, a atividade da EROD em peixes tem se destacado como ferramenta no monitoramento de efluentes de indústrias de papel e celulose, sendo utilizada como indicadora bioquímica das dioxinas geradas nos efluentes líquidos deste tipo de indústria (Munkittrick et al., 1994; Sepúlveda et al., 2004). Dentre as fontes de efluentes líquidos com maior potencial poluidor na Bacia Hidrográfica do Rio Jaboatão, uma fábrica de papel e celulose (Souza & Tundisi, 2003) se destaca pela reconhecida ineficiência no tratamento dos seus efluentes, e estes dados apontam para uma análise mais detalhada dos efluentes desta indústria.

A atividade da GST é comumente utilizada para avaliar o mecanismo de detoxificação de fase II (conjugação), devido à sua conhecida indução por contaminantes orgânicos hidrofóbicos, incluindo HPAs e PCBs (van der Oost et al., 1996), além de outras classes de contaminantes, como

os metais (Garcia-Alonso et al., 2011). Vários estudos reportam o aumento de GST no fígado de peixes expostos a áreas com forte influência antropogênica (Viganò et al., 1998; Camargo & Martinez, 2006). Porte et al. (2002) sugerem que apesar da GST também executar função antioxidante, em alguns peixes o principal papel executado é a conjugação de xenobióticos, particularmente em áreas de baixa ou moderada poluição. Almeida et al. (2010) sugerem que a resposta da GST pode ser dependente de uma série de fatores como a espécie, a substância química testada e condições ambientais (como exposição a substâncias puras ou misturas), e de acordo com seu papel em cada situação específica ela pode ser induzida, inibida ou mesmo não ser afetada, quando não participar da biotransformação de determinada substância. Apesar desta enzima não ser considerada específica de nenhum grupo de contaminantes, ela pode ser considerada um biomarcador de um possível estado de estresse oxidativo (Machala et al., 1998). No presente estudo, a atividade da GST foi induzida 2 vezes juntamente com a indução da EROD 21 vezes em relação ao controle nos peixes residentes no SEBJ-RE2, e foi induzida também 2x nos peixes expostos *in situ* em SEBJ-IS2, e 2x nos peixes residentes em SEBP-RE1.

Assim como a EROD, a indução da GST nos peixes residentes em SEBP-RE1 pode estar relacionada às concentrações significativas de metabólitos de HPAs observadas. O fato da GST, apesar de não específica, ter sido induzida juntamente com a EROD também nos peixes residentes do SEBJ-RE2, onde não foram detectadas concentrações significativas de HPAs na bile ou na água, corrobora a possibilidade de estarem biodisponíveis em SEBJ-RE2 contaminantes orgânicos semelhantes às dioxinas que podem induzir a EROD e a GST conjuntamente (Machala et al., 1998).

Portanto, a indução de GST isoladamente não permite sugerir nenhum grupo de contaminantes como potenciais agentes causais, mas talvez uma combinação de efeitos na GST com outros biomarcadores bioquímicos tenha maior possibilidade de pelo menos sugerir ou descartar contaminantes químicos biodisponíveis como agentes causais de alterações a nível bioquímico. É importante considerar que a área estuarina avaliada do SEBJ, além da influência de marinas e barcos, que podem liberar HPAs, e da referida indústria de papel, sofre também influência de atividades agrícolas, do cultivo de cana de açúcar ou culturas mistas realizadas ao longo da bacia hidrográfica do Rio Jaboatão (Souza & Tundisi, 2003), que podem ser fontes relevantes de biocidas para o sistema estuarino estudado.

É conhecido o uso de pesticidas inibidores da acetilcolinesterase no cultivo de cana de açúcar (Pessoa et al., 2011), e no caso dos organofosforados, também são indutores da GST hepática, como relatado por (Ezemonye & Tongo, 2010). Neste estudo não foi detectada inibição significativa da AChE cerebral em nenhum dos pontos avaliados, exceto uma inibição marginalmente significativa ($p = 0,068$) nos peixes residentes do SEBP-RE1. Considerando-se a indução conjunta da GST hepática com esta inibição aparente da AChE cerebral em *P. vivipara*

residentes, é razoável supor que existam contaminantes inibidores da AChE biodisponíveis na região urbana em SEBP-RE1.

4.5. Biomarcadores comportamentais

A fim de relacionar respostas subcelulares a efeitos em maior nível de organização biológica, o uso de biomarcadores comportamentais em avaliações ambientais pode ser particularmente interessante na composição de estratégias com múltiplos biomarcadores objetivando monitorar ambientes impactados (Castro et al., 2004; Kerambrun et al., 2011).

Alterações no comportamento natatório normal de peixes, como as observadas no presente estudo, podem trazer desequilíbrio e serem de fato prejudiciais, tanto em níveis individuais quanto populacionais, afetando, por exemplo, a eficiência de predação e a quantidade de energia disponível para o crescimento e outras funções (Little & Finger, 1990). O aumento da velocidade natatória espontânea em *P. vivipara* detectado em SEBJ-IS2 difere dos efeitos letárgicos ou de hipoatividade comumente observados em estudos de laboratório envolvendo exposição de peixes a HPAs em misturas complexas de óleo (Kochhann et al., 2013; Kochhann et al., 2015), misturas com concentrações planejadas (Gonçalves et al., 2008), ou com substâncias individuais, principalmente as que apresentam a partir de 3 anéis benzênicos (Correia et al., 2007; Almeida et al., 2012). No capítulo 2 desta tese também verificou-se redução da atividade natatória em *P. vivipara* após exposição por 96 h a uma mistura de igual proporção dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno, em uma concentração total de $150 \mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, Torreiro-Melo et al. (2015), expondo *P. vivipara* ao fenantreno puro, detectou hiperatividade associada com movimentos natatórios circulares após 96 h de exposição às concentrações de 50 e $200 \mu\text{g L}^{-1}$, seguida de hipoatividade na concentração $500 \mu\text{g L}^{-1}$. A hiperatividade em relação a peixes controle também foi observada para peixes da espécie *Lepomis macrochirus* após exposição em um fluxo contínuo ao HPA fluoreno nas concentrações de 120 e $250 \mu\text{g L}^{-1}$ (Finger et al., 1985). Com base nestas informações, a exposição a HPAs em concentrações subletais podem causar tanto hipoatividade quanto hiperatividade natatória, e no caso dos peixes expostos *in situ* em SEBJ-IS2, as concentrações detectadas de Bile_{fen} e Bile_{cri} podem estar causando esta hiperatividade, sem descartar a potencialidade deste efeito estar também sendo influenciado por outros contaminantes biodisponíveis. Além disso, o aumento da velocidade dos peixes do SEBJ-IS2 pode estar relacionado à indução da GST observada para estes peixes. Tanto a GST quando a atividade natatória espontânea são biomarcadores que podem ser utilizados para avaliar o uso de recursos energéticos para a biotransformação ou locomoção em peixes sob influência de estresse tóxico (Schmidt et al., 2004).

O aumento da demanda por estes recursos energéticos para biotransformação de contaminantes pode disparar respostas compensatórias, como hiperglicemia e liberação de algumas

catecolaminas (e.g. adrenalina, noradrenalina, dopamina) (Gesto et al., 2006). Os efeitos das alterações no metabolismo destes neurotransmissores monoaminérgicos no comportamento natatório dos peixes ainda não são totalmente conhecidos. Contudo, é possível especular que neurotransmissores relacionados ao sistema nervoso simpático (e.g. adrenalina) e ao parassimpático (e.g. noradrenalina) possam ser liberados em diferentes momentos do stress, criando situação de alerta ou de equilíbrio (homeostase), que poderiam causar efeitos distintos sobre o comportamento natatório dos peixes, como por exemplo, de hiperatividade e hipoatividade, respectivamente. Camargo & Martinez (2006) após exposição de peixes da espécie *Prochilodus lineatus* por 7 dias em gaiolas ao longo de um córrego urbano fortemente contaminado por atividades antrópicas, observaram indução da GST e hiperglicemia como indicativos associados de biotransformação e resposta compensatória, respectivamente. Estas respostas podem alterar o comportamento dos peixes (Ortiz & Lutz, 1995), inclusive o de natação espontânea (Øverli et al., 1998). Finger et al. (1985) afirmam que peixes hiperativos utilizam energia a taxas mais altas que peixes normais ou letárgicos, contudo a letargia pode incidir devido à uma situação de estresse em consequência à esta elevação do metabolismo.

A resistência natatória foi um comportamento sensivelmente afetado em *P. vivipara* exposto em 3 dos 4 pontos avaliados, correlacionada negativamente com a indução da GST nos mesmos 3 pontos, e também parcialmente com a indução da EROD nos dois pontos onde foram coletados animais residentes nos dois estuários.

A resistência ou capacidade natatória é uma habilidade dos peixes capaz de integrar as qualidades fisiológicas de gerar e coordenar energia locomotora, necessárias para funções essenciais, como escapar de predadores ou migração (Little et al., 1990). Possivelmente o alto custo metabólico envolvido na biotransformação de contaminantes (evidenciado pela indução de EROD e GST), discutido anteriormente, comprometeu a capacidade de natação prolongada de *P. vivipara* no presente estudo. Assim, a fadiga observada nestes peixes é um comportamento ecologicamente relevante que sinaliza um fenômeno fisiológico (Scott & Sloman, 2004), e pode caracterizar não apenas exaustão, como também a economia e alocação de energia, fator de grande importância metabólica (Nelson, 1990).

A resistência natatória apresentou maior sensibilidade aos efeitos da exposição quando comparado à velocidade natatória espontânea, sendo afetado em três dos quatro ambientes onde os peixes foram expostos. Tal resultado contraria alguns estudos de laboratório com HPAs, que atribuem efeitos mais sensíveis à atividade natatória, como por exemplo, Finger et al. (1985), que observaram efeitos na resistência natatória em *Lepomis macrochirus* somente na maior concentração de exposição ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) ao fluoreno, enquanto efeitos na natação espontânea puderam ser observados já a partir de $120 \mu\text{g L}^{-1}$. De forma semelhante, Torreiro-Melo et al. (2015)

observaram redução na resistência natatória em *P. vivipara* após exposição por 96 h ao fenantreno na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto a natação espontânea foi afetada em concentrações com uma ordem de grandeza de diferença ($50 \mu\text{g L}^{-1}$). No entanto, Oliveira et al. (2012) não observaram esta diferença entre os parâmetros para *Pomatoschistus microps* exposto por 96 h ao pireno. Neste trabalho os autores observaram a mesma concentração de efeito observado (CEO) para resistência, atividade natatória e ainda para os metabólitos equivalentes de pireno na bile dos peixes expostos.

A evidente correlação negativa entre redução da resistência natatória e indução da GST, e parcialmente da EROD, sugere um possível potencial preditivo destes clássicos biomarcadores bioquímicos para efeitos ecologicamente relevantes na resistência natatória dos peixes avaliados no presente estudo.

5. CONCLUSÕES

A exposição a poluentes nos dois ecossistemas estuarinos estudados foi evidenciada por relações entre concentrações internas significativas de HPAs na bile, biomarcadores bioquímicos, de bioconcentração, e biomarcadores comportamentais, considerando a complexidade das relações que envolvem a exposição, metabolismo, mecanismos de ação tóxica, e efeitos ecologicamente relevantes de poluentes.

A indução da EROD nos peixes residentes e da GST nos peixes residentes e expostos *in situ* em SEBJ enfatiza a necessidade da combinação de estratégias de exposição para avaliação de efeitos crônicos com estes biomarcadores. A indução da GST concomitante à redução da resistência natatória dos indivíduos sugere uma possível correlação preditiva de que uma alteração bioquímica esteja sinalizando um efeito comportamental relevante para a espécie.

As variações nos parâmetros biológicos em função do tipo de exposição (*in situ* e residentes), e das concentrações de HAPDDs na água e HPAs na bile dos peixes nas áreas de estudo reforçam a necessidade da composição de estratégias com múltiplas medidas biológicas e químicas a fim de compreender diferentes mecanismos de resposta à contaminação, em diferentes magnitudes.

Este estudo desenvolveu e testou metodologias que permitem o uso de *Poecilia vivipara* no monitoramento ambiental, e demonstra a viabilidade e potencial do uso desta espécie, relacionando concentrações internas de exposição a HPAs na bile, biomarcadores bioquímicos e alterações comportamentais ecologicamente relevantes.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Concentrações biliares de HPAs foram quantificadas e estiveram relacionadas à alterações de comportamentos do barrigudinho *Poecilia vivipara*. A exposição ao fenantreno reduziu a captura de presas e a resistência natatória, e provocou alterações significativas na velocidade natatória e na trajetória dos peixes. A exposição à mistura dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno provocou redução da velocidade e resistência natatórias, comportamentos ecologicamente relevantes para manutenção da sobrevivência em peixes. A bioconcentração destes metabólitos observada nos peixes se assemelha às previsões de bioconcentração a partir do (Kow), o que sugere que a divisão entre a água e o octanol simula razoavelmente a divisão entre água e bile no interior da vesícula biliar dos peixes expostos.

Tanto a técnica de fluorescência fixa (FF) quanto a técnica cromatográfica (CLAE-F) possibilitaram a detecção dos metabólitos dos HPAs em concentrações ambientalmente relevantes da mistura de HPAs na água. Contudo, a técnica de fluorescência fixa é indicada para o uso em programas de monitoramento ambiental de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo por ser simples, rápida e apresentar custo relativamente baixo.

A exposição a poluentes nos dois ecossistemas estuarinos estudados foi evidenciada por relações entre concentrações internas significativas de HPAs, biomarcadores bioquímicos, de bioconcentração, e biomarcadores comportamentais, considerando a complexidade das relações que envolvem a exposição, metabolismo, mecanismos de ação tóxica, e efeitos ecologicamente relevantes de poluentes.

A indução da EROD apenas nos peixes residentes enfatiza a necessidade da combinação de estratégias de exposição *in situ* de exposição relativamente curta com a coleta de indivíduos residentes, no que se refere à importância de períodos mais longos de exposição para avaliação de efeitos crônicos.

As variações nos parâmetros biológicos observadas em campo em relação ao tipo de exposição (*in situ* e residentes), às concentrações de HAPDDs na água e aos HPAs na bile dos peixes reforçam a necessidade da aplicação de estratégias com múltiplas medidas biológicas e químicas a fim de compreender diferentes mecanismos de resposta à contaminação, em diferentes magnitudes.

A utilização de *P. vivipara* como espécie sentinela se mostrou adequada para a avaliação da qualidade ambiental em estuários tropicais, e pode ser empregada em programas de biomonitoramento em regiões tropicais utilizando uma combinação de estratégias laboratoriais, de exposição *in situ* controlada e com o uso de indivíduos residentes nos ambientes aquáticos a serem avaliados.

Cabe salientar que a mencionada presença de múltiplas fontes e misturas de poluentes nas áreas de estudo, associada à quase ausência de informações sobre a concentração de contaminantes orgânicos nos dois estuários avaliados, com exceção da contaminação por HPAs, torna o estabelecimento de relações inequívocas de causa efeito quase impossíveis. Entretanto, a abordagem utilizada no presente estudo produziu resultados que permitiram estabelecer relações cientificamente embasadas entre efeitos comportamentais ecologicamente relevantes que estão sendo causados em indivíduos de *P. vivipara* residentes nestes dois estuários, e mecanismos de ação tóxica baseados nos biomarcadores bioquímicos e de bioconcentração. Estes resultados permitem direcionar investigações futuras tanto a nível de controle da poluição pelos órgãos competentes, quanto a nível científico, tentando melhor compreender como podemos utilizar os biomarcadores para definitivamente prever efeitos ecologicamente indesejáveis, e evitá-los.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 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.
- Aas, E., Beyer, J., Goksøyr, A., 1998. PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence. *Marine Environmental Research* 46, 225-228.
- Aas, E., Beyer, J., Goksøyr, A., 2000. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5, 9-23.
- Akaishi, F.M., Silva De Assis, H.C., Jakobi, S.C.G., Eiras-Stofella, D.R., St.-Jean, S.D., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L.R., Scofield, A.L., Oliveira Ribeiro, C.A., 2004. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp.) after Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. 46, 244-253.
- Albers, P.H., 2003. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J. (Eds.). *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 341-371.
- Almeida, J., Oliveira, C., Gravato, C., Guilhermino, L., 2010. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. *Ecotoxicology*, 1-13.
- Almeida, J.R., Gravato, C., Guilhermino, L., 2012. Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: A case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Chemosphere* 86, 926-937.
- Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., 2009. Introduction. in: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S. (Ed.). *Environmental assessment of estuarine ecosystems: a case study*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-18.
- Aragão, M., Araújo, R., 2006. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. *Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações*. Editora Rima. São Paulo, São Carlos. 478p, 117-147.
- Araújo-Castro, C., Souza-Santos, L.P., Torreiro, A.G.A., Garcia, K.S., 2009. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. *Brazilian Journal of oceanography* 57, 33-41.
- Araújo, E.J.A., Morais, J.O.R., Souza, P.R., Sabóia-Morais, S.M.T., 2001. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Acta Scientiarum* 23, 391-399.

Armstrong, B.M., Lazorchak, J.M., Murphy, C.A., Haring, H.J., Jensen, K.M., Smith, M.E., 2015. Determining the effects of a mixture of an endocrine disrupting compound, 17 α -ethinylestradiol, and ammonia on fathead minnow (*Pimephales promelas*) reproduction. *Chemosphere* 120, 108-114.

Barbosa, A.C.R.A., 2009. Avaliação da biodisponibilidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) na baía de Santos através de metabólitos biliares. Universidade de São Paulo.

Barron, M. G. 1990. Bioconcentration. Will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals? *Environmental Science & Technology* 24, 1612-1618.

Barron, M.G., Carls, M.G., Heintz, R., Rice, S.D., 2004. Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicological Sciences* 78, 60-67.

Barry, M. J., 2012. Application of a novel open-source program for measuring the effects of toxicants on the swimming behavior of large groups of unmarked fish. *Chemosphere* 86, 938-944.

Baussant, T., Sanni, S., Jonsson, G., Skadsheim, A., Børseth, J. F., 2001. Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1175-1184.

Baussant, T., Sanni, S., Skadsheim, A., Jonsson, G., Børseth, J.F., Gaudebert, B., 2001. Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 2. Modeling bioaccumulation in marine organisms chronically exposed to dispersed oil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1185-1195.

Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.A., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., Widdings, J., 1985. *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. Praeger, New York, USA.

Berthet, B., 2012. Sentinel Species. *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*, 155.

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., Meyer, J.N., Wassenberg, D.M., Hodson, P.V., Di Giulio, R.T., 2008. Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences* 105, 5-23.

Blaxter, J. H. S., Staines, M., 1971. Food searching potential in marine fish larvae. In D. J. Crisp (ed.). *Fourth European Marine Biology Symposium*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 467-485.

- 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.
- Brozinski, J.-M., Lahti, M., Oikari, A., Kronberg, L., 2013. Identification and dose dependency of ibuprofen biliary metabolites in rainbow trout. *Chemosphere* 93, 1789-1795.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment* 247, 295-311.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to *in situ* tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21, 61-69.
- Carls, M. G., Marty, G. D., Hose, J. E., 2002. Synthesis of the toxicological impacts of the Exxon Valdez oil spill on Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Prince William Sound, Alaska, U.S.A. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 153-172.
- Carlson, R. M., Oyler, A. R., Gerhart, E. H., Caple, R., Welch, K. J., Kopperman, H. L., Bodenner, D., Swenson, D., 1979. Environmental impact of polynuclear aromatic hydrocarbons liberated from Northern Great Plains coal. Duluth: United States Environmental Protection Agency, pp. 69.
- Carson, R., 1962. Silent spring. Houghton Mifflin Harcourt.
- Carvalho, P. S. M., Tillitt, D. E., Zajicek, J. L., Claunch, R. A., Honeyfield, D. C., Fitzsimons, J. D. Brown, S. B., 2009. Thiamine Deficiency Effects on the Vision and Foraging Ability of Lake Trout Fry. *Journal of Aquatic Animal Health* 21, 315-325.
- Carvalho, P.S., Kalil, D.D., Novelli, G.A., Bainsy, A.C., Fraga, A.P., 2008. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus brasiliensis*. *Mar Environ Res* 66, 205-207.
- Carvan, M.J., Incardona, J.P., Rise, M.L., 2008. Meeting the Challenges of Aquatic Vertebrate Ecotoxicology. *BioScience* 58, 1015-1025.
- Castro, B.B., Sobral, O., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2004. An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology* 13, 667-681.
- Chapman, G.A., Denton, D.L., Lazorchak, J.M., 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. US EPA, Office of Research and Development, National Exposure Research Laboratory.
- Committee, U. O. F. I. R. (Joint Committee of the American Fisheries Society, T. A. I. O. F. R. B., and the American Society of Ichthyologists and Herpetologists), 2014. Guidelines for use of fishes in research. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, pp. 104.

- 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.
- Cossins, A.R., Crawford, D.L., 2005. Fish as models for environmental genomics. *Nature Reviews Genetics* 6, 324-333.
- Couderc, M., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Blanchet-Letrouvé, I., Marchand, P., Vénisseau, A., Veyrand, B., Mouneyrac, C., Le Bizec, B., 2015. Occurrence of POPs and other persistent organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary, France. *Science of The Total Environment* 505, 199-215.
- CPRH, 2015a. - Agência Estadual de Meio Ambiente. Disponível em http://www.cprh.pe.gov.br/ARQUIVOS_ANEXO/L_Relat13-JB;4803010202;20141016.pdf. Acessado em Janeiro de 2015.
- CPRH, 2015b. - Agência Estadual de Meio Ambiente. Disponível em http://www.cprh.pe.gov.br/ARQUIVOS_ANEXO/M_Relat13-P;4803010202;20141016.pdf. Acessado em Janeiro de 2015.
- CPRH, 2015c. - Agência Estadual de Meio Ambiente. Disponível em http://www.cprh.pe.gov.br/ARQUIVOS_ANEXO/K_Relat13-CB;4803010202;20141016.pdf. Acessado em Janeiro de 2015.
- Denton, D.L., Starret, G.I., Smith, R.H., Johnson, S.C., 1994. Comparasion of hypothesis testing to point techniqes for marine toxicity tests. In: SETAC (Ed.). 15th annual meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Denver CO. Pensacola FL., p. 116.
- Depledge, M., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. *Nondestructive biomarkers in vertebrates*, 271-295.
- Depledge, M.H., Aagaard, A., Györkös, P., 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 31, 19-27.
- Di Giulio, R.T.H., D.E., 2008. *Toxicology of Fishes*. Academic Press, Boca Raton.
- Dubansky, B., Whitehead, A., Miller, J. T., Rice, C. D., Galvez, F., 2013. Multitissue Molecular, Genomic, and Developmental Effects of the Deepwater Horizon Oil Spill on Resident Gulf Killifish (*Fundulus grandis*). *Environmental Science & Technology* 47, 5074-5082.
- Eggs, M.L., Galgani, F., 1992. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: Fast determination with a fluorescence plate-reader. *Marine Environmental Research* 33, 213-221.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.

- 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.
- Favrod, N., 2012. Determinação de hidrocarbonetos do petróleo dissolvidos e/ou dispersos nas águas do complexo estuarino da Bacia do Pina – Bacia Portuária (Porto de Recife). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 32.
- Feitosa, F.A.N., Nascimento, F.C.R., Costa, K.M.P., 1999. Distribuição espacial e temporal da biomassa fitoplânctônica relacionada com parâmetros hidrológicos na Bacia do Pina (Recife - PE). *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco* 27, 1-13.
- Ferreira, R.S., Monserrat, J.M., Ferreira, J.L.R., Kalb, A.C., Stegeman, J., Bainy, A.C.D., Zanette, J., 2012. Biomarkers of organic contamination in the South American fish *Poecilia Vivipara* and *Jenynsia Multidentata*. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 75, 1023-1034.
- Finger, S.E., Little, E.F., Henry, M.G., Fairchild, J.F., Boyle, T.P., 1985. Comparison of laboratory and field assessment of fluorene - Part I: effects of fluorene on the survival, growth, reproduction, and behavior of aquatic organisms in laboratory tests. in: Boyle, T.P. (Ed.). *Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems*. STP 865. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp.134-151.
- Fonseca, V.F., França, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquatic Toxicology* 102, 216-227.
- Förlin, L., Wachtmeister, C., 1989. Fish bile analysis for monitoring of low concentrations of polar xenobiotics in water. in: Landner, L. (Ed.). *Chemicals in the Aquatic Environment*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 150-164.
- Freitas, E.C., Rocha, O., 2011. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: The importance of using native species as test organisms. *Archives of environmental contamination and toxicology* 60, 241-249.
- 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.

- Garcia-Alonso, J., Greenway, G.M., Munshi, A., Gomez, J.C., Mazik, K., Knight, A.W., Hardege, J.D., Elliott, M., 2011. Biological responses to contaminants in the Humber Estuary: disentangling complex relationships. *Marine Environmental Research* 71, 295-303.
- Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J.L., Míguez, J.M., 2006. Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 144, 173-183.
- Goksøyr, A., Förlin, L., 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22, 287-311.
- Goksøyr, A., Solbakken, J. E., Klungsøyr, J., 1986. Regioselective metabolism of phenanthrene in Atlantic cod (*Gadus morhua*): Studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochromes P-450. *Chemico-Biological Interactions* 60, 247-263.
- Gomes Jr, J.L., Monteiro, L.R., 2008. Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): Test of an ecomorphological paradigm. *Biological Journal of the Linnean Society* 93, 799-812.
- 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.
- Gravato, C., Guilhermino, L., 2009. Effects of Benzo(a)pyrene on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): biomarkers, growth and behavior. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 121-137.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* 77, 398-405.
- Hale, R.C., La Guardia, M.J., 2002. Emerging Contaminants of Concern in Coastal and Estuarine Environments. in: Newman, M.C., Roberts, M.H., Hale, R.C. (Eds.). *Coastal and estuarine risk assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 41-64.
- Hanson, N., Larsson, Å., 2011. Biomarker analyses in caged and wild fish suggest exposure to pollutants in an urban area with a landfill. *Environmental Toxicology* 26, 315-324.
- Hinkle-Conn, C., Fleeger, J. W., Gregg, J. C., Carman, K. R., 1998. Effects of sediment-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on feeding behavior in juvenile spot (*Leiostomus xanthurus* Lacépède: Pisces). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 227, 113-132.
- 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.
- INCT-TA, 2014. Brazilian National Institute of Science and Technology – Aquatic Toxicology. <http://www.inct-ta.furg.br/> (accessed in March 2014).

Insausti, D., Carrasson, M., Maynou, F., Cartes, J.E., Solé, M., 2009. Biliary fluorescent aromatic compounds (FACs) measured by fixed wavelength fluorescence (FF) in several marine fish species from the NW Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin* 58, 1635-1642.

Jonsson, G., Bechmann, R. K., Bamber, S. D., Baussant, T., 2004. Bioconcentration, biotransformation, and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sheephead minnows (*Cyprinodon variegatus*) exposed to contaminated seawater. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1538-1548.

Kammann, U., Brinkmann, M., Freese, M., Pohlmann, J.-D., Stoffels, S., Hollert, H., Hanel, R., 2013. PAH metabolites, GST and EROD in European eel (*Anguilla anguilla*) as possible indicators for eel habitat quality in German rivers. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 2519-2530.

Karcher, W., Devillers, J., Garrigues, P., Jacob, J. 1991. *Spectral Atlas of Polycyclic Aromatic Compounds*. Dordrecht: KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, pp. 1176.

Kennedy, C.J., 2015. Multiple Effects of Oil and Its Components in Fish. in: Alford, J.B., Peterson, M.S., Green, C.C. (Eds.). *Impacts of Oil Spill Disasters on Marine Habitats and Fisheries in North America*, pp. 4-28.

Kennish, M.J., 2002. Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environmental conservation* 29, 78-107.

Kerambrun, E., Henry, F., Marechal, A., Sanchez, W., Minier, C., Filipuci, I., Amara, R., 2012. A multibiomarker approach in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 45-53.

Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., Amara, R., 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 154, 187-195.

Kochhann, D., de Azevedo Brust, S., Domingos, F., Val, A., 2013. Linking Hematological, Biochemical, Genotoxic, and Behavioral Responses to Crude Oil in the Amazon Fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). *Archives of environmental contamination and toxicology* 65, 266-275.

Kochhann, D., Meyersieck Jardim, M., Valdez Domingos, F.X., Luis Val, A., 2015. Biochemical and behavioral responses of the Amazonian fish *Colossoma macropomum* to crude oil: The effect of oil layer on water surface. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111, 32-41.

Kopecka-Pilarczyk, J., Correia, A.D., 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to pyrene and fluorene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 372, 49-57.

Krahn, M. M., Ylitalo, G. M., Buzitis, J., Bolton, J. L., Wigren, C. A., Chan, S.-L., Varanasi, U. 1993. Analyses for petroleum-related contaminants in marine fish and sediments following the Gulf oil spill. *Marine Pollution Bulletin* 27, 285-292.

Krahn, M.M., Myers, M.S., Burrows, D.G., Malins, D.C., 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica* 14, 633-646.

Krull, M., Barros, F., 2012. Key issues in aquatic ecotoxicology in Brazil: a critical review. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 7, 57-66.

Landrum, P.F., Chapman, P.M., Neff, J., Page, D.S., 2013. Influence of exposure and toxicokinetics on measures of aquatic toxicity for organic contaminants: A case study review. *Integrated Environmental Assessment and Management* 9, 196-210.

Latimer, J. S., Zheng, J., 2003. The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 7-33.

Leblanc, G.A., 2004. Basics of Environmental Toxicology. in: Hodgson, E. (Ed.). *A Textbook of Modern Toxicology*. John Wile & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 463-478.

Lee, R. F. Anderson, J. W., 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Marine Pollution Bulletin* 50, 705-723.

Lemos, R.T.d.O., Carvalho, P.S.M., Zanardi-Lamardo, E., 2014. Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. *Marine Pollution Bulletin* 82, 183-188.

Lima, D., Santos, M.M., Ferreira, A.M., Micaelo, C., Reis-Henriques, M.A., 2008. The use of the shanny *Lipophrys pholis* for pollution monitoring: A new sentinel species for the northwestern European marine ecosystems. *Environment International* 34, 94-101.

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.

Little, E.E., Archeski, R.D., Flerov, B.A., Kozlovskaya, V.I., 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives of environmental contamination and toxicology* 19, 380-385.

Little, E.E., Finger, S.E., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 13-19.

Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L.D., Porte, C., Fitzpatrick, P.J., Förlin, L., Nasci, C., Fossato, V., Wootton, N., 1995. Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy: biochemical studies. *Marine Environmental Research* 39, 235-240.

- Logan, D. T. 2007. Perspective on Ecotoxicology of PAHs to Fish. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 13, 302-316.
- Luís, G.L., Guilhermino, L., 2012. Short-term toxic effects of naphthalene and pyrene on the common prawn (*Palaemon serratus*) assessed by a multi-parameter laboratorial approach: mechanisms of toxicity and impairment of individual fitness. Biomarkers 17, 275-285.
- Lurman, G.J., Macdonald, J.A., Evans, C.W., 2010. Evaluating the impact of environmental pollution on fish in McMurdo Sound, Antarctica: A biomarker approach. Polar Science 3, 246-253.
- Machado, A.A.S., Hoff, M.L.M., Klein, R.D., Cardozo, J.G., Giacomini, M.M., Pinho, G.L.L., Bianchini, A., 2013. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. Aquatic Toxicology 138-139, 60-69.
- Machado, A.A.S., Hoff, M.L.M., Klein, R.D., Cordeiro, G.J., Lencina Avila, J.M., Costa, P.G., Bianchini, A., 2014. Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*. Marine Environmental Research 98, 96-105.
- Machala, M., Drzbek, P., Neča, J.J., Kolzovz, J., Svobodovz, Z., 1998. Biochemical Markers for Differentiation of Exposures to Nonplanar Polychlorinated Biphenyls, Organochlorine Pesticides, or 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Trout Liver. Ecotoxicology and Environmental Safety 41, 107-111.
- Martínez-Gómez, C., Vethaak, A.D., Hylland, K., Burgeot, T., Köhler, A., Lyons, B.P., Thain, J., Gubbins, M.J., Davies, I.M., 2010. A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil 67, 1105-1118.
- Mattos, J.J., Siebert, M.N., Luchmann, K.H., Granucci, N., Dorrington, T., Stoco, P.H., Grisard, E.C., Bainsy, A.C.D., 2010. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. Marine Environmental Research 69, S31-S33.
- McElroy, A. E., Barron, M. G., Beckvar, N., Kane Driscoll, S. B., Meador, J. P., Parkerton, T. F., Preuss, T. G., Steevens, J. A., 2011. A review of the tissue residue approach for organic and organometallic compounds in aquatic organisms. Integrated Environmental Assessment and Management 7, 50-74.
- Meador, J., 2006. Rationale and Procedures for Using the Tissue-Residue Approach for Toxicity Assessment and Determination of Tissue, Water, and Sediment Quality Guidelines for Aquatic Organisms. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 12, 1018-1073.
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 143, 79-165.

- Meager, J.J., Batty, R.S., 2007. Effects of turbidity on the spontaneous and prey-searching activity of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 362, 2123-2130.
- Meletti, P.C., Rocha, O., 2002. Development of a chamber for in situ toxicity tests with small fishes. Brazilian Journal of Biology 62, 187-190.
- Melo, F.R.M., 2011. Avaliação dos efeitos do hidrocarboneto aromático fenantreno e do metal cobre em juvenis do peixe *Poecilia vivipara*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 49.
- Miller, J.L., Sherry, J., Parrott, J., Quinn, J.S., 2014. A subchronic in situ exposure method for evaluating effects in small-bodied fish at contaminated sites. Environmental Toxicology 29, 54-63.
- Munkittrick, K.R., Servos, M.R., Van Der Kraak, G.J., McMaster, M.E., Portt, C.B., Van Den Heuvel, M.R., 1994. Survey of receiving-water environmental impacts associated with discharges from pulp mills: 2. Gonad size, liver size, hepatic erod activity and plasma sex steroid levels in white sucker. Environmental Toxicology and Chemistry 13, 1089-1101.
- Neff, J.M., Stout, S.A., Gunstert, D.G., 2005. Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: identifying sources and ecological hazard. Integrated Environmental Assessment and Management 1, 22-33.
- Nelson, J.A., 1990. Muscle metabolite response to exercise and recovery in yellow perch (*Perca flavescens*): comparison of populations from naturally acidic and neutral waters. Physiological Zoology, 886-908.
- Nepomuceno, R., 2015. Hidrocarbonetos Aromáticos e toxicidade de efluentes de postos revendedores de combustível para ovos e larvas do peixe *Danio rerio*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 51.
- 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.
- Ortiz, M., Lutz, P.L., 1995. Brain neurotransmitter changes associated with exercise and stress in a teleost fish (*Sciaenops ocellatus*). Journal of Fish Biology 46, 551-562.
- Øverli, Ø., Winberg, S., Damsård, B., Jobling, M., 1998. Food intake and spontaneous swimming activity in Arctic char (*Salvelinus alpinus*): role of brain serotonergic activity and social interactions. Canadian Journal of Zoology 76, 1366-1370.
- Pampanin, D., Viarengo, A., Garrigues, P., Andersen, O., 2006. Background for the BEEP Stavanger workshops: Biological effects on marine organisms in two common, large, laboratory

experiments and in a field study: Comparison of the value (sensitivity, specificity, etc.) of core and new biomarkers. *Aquatic Toxicology* 78, S1-S4.

Pathiratne, A., Hemachandra, C., Pathiratne, K., 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.

Payne, J.F., Mathieu, A., Collier, T.K., 2003. Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish. in: Douben, P.E.T. (Ed.). PAHs : an ecotoxicological perspective John Wiley & Sons Ltd, England, pp. 191-224.

Perhar, G., Arhonditsis, G.B., 2014. Aquatic ecosystem dynamics following petroleum hydrocarbon perturbations: A review of the current state of knowledge. *Journal of Great Lakes Research* 40, Supplement 3, 56-72.

Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B., Nogueira, A.J., Bairy, 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.

Porte, C., Albaigés, J., 1994. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans, and fishes. *Archives of environmental contamination and toxicology* 26, 273-281.

Porte, C., Escartín, E., García de la Parra, L.M., Biosca, X., Albaigés, J., 2002. Assessment of coastal pollution by combined determination of chemical and biochemical markers in *Mullus barbatus*. *Marine ecology progress series* 235, 205-216.

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

Roberts, M.H., Newman, M.C., Hale, R.C., 2002. Overview of Ecological Risk Assessment in Coastal. In: Newman, M.C., Roberts, M.H., Hale, R.C. (Eds.). Coastal and estuarine risk assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 1-14.

Roméo, M., Giambérini, L., 2012. History of Biomarkers. *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*, 15.

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). *Crit. Rev. Toxicol.* 21, 51-88.

Santos, M.M., Solé, M., Lima, D., Hambach, B., Ferreira, A.M., Reis-Henriques, M.A., 2010. Validating a multi-biomarker approach with the shanny *Lipophrys pholis* to monitor oil spills in European marine ecosystems. *Chemosphere* 81, 685-691.

Schmidt, K., Steinberg, C.E.W., Pflugmacher, S., Staaks, G.B.O., 2004. Xenobiotic substances such as PCB mixtures (Aroclor 1254) and TBT can influence swimming behavior and biotransformation activity (GST) of carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental toxicology* 19, 460-470.

Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369-392.

Sepúlveda, M., amp, x, a, S., Gallagher, E.P., Wieser, C.M., Gross, T.S., 2004. Reproductive and biochemical biomarkers in largemouth bass sampled downstream of a pulp and paper mill in Florida. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 431-440.

Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 112-120.

Sousa, E., 2002. Toxicologia marinha: Histórico. NASCIMENTO, I.A.; SOUSA, E.C.P.M; NIPPER, M. Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda, 9-14.

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, 711-721.

Stephensen, E.k., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., Förlin, L., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology* 48, 431-442.

Sturm, A., da Silva de Assis, H.C., Hansen, P.D., 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research* 47, 389-398.

Torreiro-Melo, A.G.A.G., Silva, J.S., Bianchini, A., Zanardi-Lamardo, E., Carvalho, P.S.M., No prelo. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. *Chemosphere*.

Torreiro-Melo, A.G.A.G., Silva, J.S., Bianchini, A., Zanardi-Lamardo, E., Carvalho, P.S.M., 2015. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. *Chemosphere* 132, 17-23.

Truhaut, R., 1977. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1, 151-173.

Use of Fishes in Research Committee, 2014. Guidelines for the Use of Fishes in Research. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

USEPA, 2014. 126 Priority Pollutants. - U. S. Environment Protection Agency (EPA). Accessed at <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm> on 22/12/2014.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.

Van der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology* 36, 189-222.

Van der Oost, R., Porte-Visa, C., Van den Brink, N., 2005. Biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems; emerging techniques, trends, and strategies*. Taylor & Francis, pp. 87-152.

Varanasi, U., 1989. *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press.

Varanasi, U., Stein, J.E., 1991. Disposition of xenobiotic chemicals and metabolites in marine organisms. *Environmental Health Perspectives* 90, 93-100.

Veith, G. D., DeFoe, D. L., Bergstedt, B. V., 1979. Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. 36, 1040-1048.

Viganò, L., Arillo, A., Melodia, F., Arlati, P., Monti, C., 1998. Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the River Po, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 404-411.

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.

Vuorinen, P.J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Baršienė, J., Broeg, K., Förlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Köhler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., Schiedek, D., 2006. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 53, 479-487.

Walker, G.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M. & Peakall, D.B. (Ed.), 2005. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis, London, UK, Third Edition.

Webb, D., Gagnon, M., 2013. Depurated fish as an alternative reference for field-based biomarker monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 1331-1340.

- Weis, J.S., Candelmo, A., 2012. Pollutants and fish predator/prey behavior: A review of laboratory and field approaches. *Current Zoology* 58, 9 - 20.
- Weis, J.S., Samson, J., Zhou, T., Skurnick, J., Weis, P., 2003. Evaluating prey capture by larval mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a potential biomarker for contaminants. *Mar Environ Res* 55, 27-38.
- 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.
- Winter, M.J., Day, N., Hayes, R.A., Taylor, E.W., Butler, P.J., Chipman, J.K., 2004. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 163-175.
- Winter, M.J., Verweij, F., Garofalo, E., Ceradini, S., McKenzie, D.J., Williams, M.A., Taylor, E.W., Butler, P.J., van der Oost, R., Kevin Chipman, J., 2005. Tissue levels and biomarkers of organic contaminants in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) from rivers in the West Midlands, UK. *Aquatic Toxicology* 73, 394-405.
- Yang, X., Baumann, P.C., 2006. Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. *Ecological Indicators* 6, 567-574.
- Yang, X., Peterson, D.S., Baumann, P.C., Lin, E.L.C., 2003. Fish Biliary PAH Metabolites Estimated by Fixed-wavelength Fluorescence as an Indicator of Environmental Exposure and Effects. *Journal of Great Lakes Research* 29, 116-123.
- Zagatto, P.A., 2008. Ecotoxicologia. In: Zagatto, P.A., Bertoletti, E. (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações*. Editora Rima. São Paulo, São Carlos. 478p, pp. 117-147.
- Zanardi, E., Bícigo, M.C., Weber, R.R., 1999. Dissolved/dispersed petroleum aromatic hydrocarbons in the São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 38, 410-413.