



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



ANDERSON RODRIGUES BALBINO DE LIMA

**USO DE MARCADORES BIOLÓGICOS EM *Mugil curema*; VALENCIENNES, 1836
(ACTINOPTERYGII: MUGILIDAE) NO DIAGNÓSTICO AMBIENTAL DE
ESTUÁRIOS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

Recife
Maio – 2022

ANDERSON RODRIGUES BALBINO DE LIMA

**USO DE MARCADORES BIOLÓGICOS EM *Mugil curema*; VALENCIENNES, 1836
(ACTINOPTERYGII: MUGILIDAE) NO DIAGNÓSTICO AMBIENTAL DE
ESTUÁRIOS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
doutor em Ciências Biológicas

Área de concentração: Biologia
Química para a Saúde

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra
Coorientadora: Mônica Lúcia Adam

Recife
Maio - 2022

Catálogo na Fonte:
Biblioteca Natália Nascimento, CRB4/1743

Lima, Anderson Rodrigues Albino de.

Uso de marcadores biológicos em *mugil curema*; valenciennes, 1836 (actinopterygii: mugilidae) no diagnóstico ambiental de estuários da região nordeste do Brasil. / Anderson Rodrigues Albino de Lima. – 2022.

145 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra.

Coorientadora: Mônica Lúcia Adam.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Saúde ambiental. 2. Biomonitoramento. 3. Biomarcadores. 4. Estuários. 5. Peixes. I. Bezerra, Ranilson de Souza (orient.). II. Adam, Mônica Lúcia. (coorient). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-220

ANDERSON RODRIGUES BALBINO DE LIMA

**USO DE MARCADORES BIOLÓGICOS EM *Mugil curema*; VALENCIENNES, 1836
(ACTINOPTERYGII: MUGILIDAE) NO DIAGNÓSTICO AMBIENTAL DE
ESTUÁRIOS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30 / 05 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Diego de Souza Buarque (Examinador Externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Nédia de Castilhos Ghisi (Examinadora Externa)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof^o. Dr. Glauber Pereira de Carvalho Santos (Examinador Externo)

Instituto de Tecnologia de Pernambuco

Aos meus pais, esposa e filha.
Amo vocês de maneira incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pois sem Ele não teria chegado até aqui.

Aos meus pais (José e Betânia) por todo apoio mesmo quando tudo aqui materializado não passava de um sonho.

À minha esposa Isabela Leão com quem compartilho minhas angústias, meus medos e que vem construindo comigo uma jornada acadêmica desde os tempos de graduação (as monitorias rederam bons frutos hahaha).

Mais uma vez a Deus pela dádiva de ter me abençoado com a missão de ser pai da pequena Mariana. Sua chegada deu um novo significado à minha vida e hoje nada faz sentido sem tê-la por perto. Tudo é por você meu amor!

Aos meus queridos avós Jovino e Maria (*in memorian*) por todo cuidado, amor e zelo que tiveram com nossa família.

Aos meus tios, em especial Tia Nininha e Tio Joaquim por quem nutro um sentimento de amor, cuidado e respeito.

Às minhas irmãs Girlayne e Anatielly por serem para mim exemplos de garra, coragem e determinação.

Aos meus sobrinhos Pedro, Caroline e Davi pela alegria que trouxeram à nossa família.

Aos meus sogros Rose e Robson pelo apoio irrestrito e pela confiança em mim depositada.

Ao meu cunhado, afilhado, compadre, amigo e irmão Djalma Ferreira (Neto) por todos os conselhos, por todas as dicas... já rimos e choramos juntos e assim seguiremos por toda vida.

À minha afilhada, comadre e amiga Dannúbia Pires pelos ensinamentos na estruturação da tese, pelo apoio e pela torcida para que tudo desse certo.

À minha cunhada Maria Carla pelo carinho e por toda torcida, obrigado por tudo.

Aos tios do coração Maria Helena e Tarcísio Leão (*in memorian*) que me abraçaram nos momentos de dificuldade e que fizeram por mim e pela minha esposa o que apenas verdadeiros pais fazem pelos seus filhos. A dor de não tê-los conosco é aliviada pela certeza de que um dia estaremos novamente juntos.

À minha orientadora e amiga Mônica Adam, ainda recordo do dia que você me levou de Vitória de Santo Antão para o laboratório na federal em Recife e me apresentou ao Rodrigo, de lá pra cá minha vida mudou! Você não tem noção do que representa para mim. Obrigado, obrigado, obrigado...

Ao Rodrigo por abrir as portas do LAGEA para mim e assim tornar possível esse momento.

Ao meu orientador Ranilson Bezerra por abrir as portas do Labenz e por aceitar o desafio desse trabalho.

Ao amigo Zão por abrir as portas do seu laboratório na UFPR em Curitiba e assim possibilitar a realização das análises histológicas.

Ao amigo Caio Assis (*in memorian*) pelo carinho, pela paciência, por ter acreditado no meu potencial, pelos finais de semana e feriados desenvolvendo toda parte prática no Laboratório de Enzimologia. Um profissional brilhante, um ser humano extraordinário.

À amiga Marly pelos incentivos, ajuda, apoio e torcida! Você é uma benção de Deus na minha vida!

À amiga e professora Karla Teixeira por toda ajuda nas fases iniciais de processamento do material biológico, em especial na parte histológica. Sua ajuda foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

À amiga Mayara que me acolheu na UFPR em Curitiba e me deu todo apoio e suporte necessário para finalizar a parte histológica.

Ao amigo Demetrios pela ajuda nas coletas, na estatística e pela torcida para que tudo desse certo.

À amiga Bruna que quando eu já estava sem conseguir dar conta de tantas demandas que o doutorado impôs me ajudou analisando boa parte do material de genotoxicidade.

Aos amigos Juninho e Fernando por todo carinho, pela paciência, pela torcida, pelos incentivos, pelas orações e pelo amor investido nessa amizade verdadeira que se tornou irmandade. Prometo que após a defesa e CORREÇÕES volto a falar no grupo (Gigantes da resenha) kkkkkk

À todos os meus amigos da Secretaria de Educação, em especial ao Núcleo de Formação Continuada e Supervisão Escolar, nas pessoas do amigo Isaias Silva e da amiga Heronita Dantas, em nome das quais saúdo toda SEDUC / VITÓRIA.

À todos os companheiros do laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental.

Aos pescadores de cada um dos pontos de coleta. Pessoas fundamentais para que esse trabalho fosse possível.

À Adenilda, secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas por toda disponibilidade e pelo auxílio nas questões burocráticas.

À banca examinadora nas pessoas dos professores: Dr^a. Nédia de Castilhos Ghisi, Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior, Dr. Glauber Pereira de Carvalho Santos e Dr. Diego de Souza Buarque.

Ao Laboratório de Enzimologia representado pelo professor Ranilson.

Ao Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental representado pelo professor Rodrigo.

Ao Laboratório de Reprodução e Comunidade de Peixes representado pelo professor Luís Fernando (Zão).

À Universidade Federal do Paraná – UFPR.

À Universidade Federal de Pernambuco, minha casa da graduação ao doutorado.

Ao Centro Acadêmico de Vitória pela possibilidade de realização das análises genotóxicas no laboratório de Biodiversidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de realizar um doutoramento de excelência em um programa de nível internacional.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE pela bolsa ofertada durante os 4 anos da minha jornada no doutorado.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse possível.

“Não andem ansiosos por coisa alguma, mas em tudo, pela oração e súplicas, e com ação de graças, apresentem seus pedidos a Deus”.

Filipenses 4:6

RESUMO

Na Região Nordeste do Brasil, os grandes centros urbanos localizam-se nas regiões costeiras próximos a ambientes estuarinos. Como consequência, estes ambientes têm sofrido uma grande intervenção ambiental, decorrente da descarga de efluentes produzidos pela intensa atividade humana. Esses compostos podem induzir nas espécies que utilizam os estuários de forma transitória ou definitiva uma série de alterações genéticas, bioquímicas e histológicas, podendo assim comprometer a adaptabilidade e sobrevivência dessas espécies neste ecossistema. Além do mais, ferramentas que avaliam alterações enzimáticas, genotóxicas ou teciduais nessas espécies, por exemplo, podem ser muito úteis na elaboração de diagnósticos ambientais, importantes para monitorar e até prever possibilidades de maiores tragédias ambientais. O objetivo deste trabalho foi realizar o biomonitoramento de seis sistemas estuarinos da região nordeste do Brasil, por meio de marcadores enzimáticos, histológicos e genotóxicos da espécie *M. curema*. As coletas ocorreram de forma semestral (Inverno – Verão) durante os anos de 2019 e 2020 em seis sistemas estuarinos distribuídos nos estados da Paraíba, Pernambuco e Alagoas. Para os dados de genotoxicidade amostra controle foi utilizada da estação ecológica da Juréia-Itatins (Litoral Sul do Estado de São Paulo) conforme dados da literatura. Em cada um dos estuários uma média de 8 espécimes de *M. curema* foram capturados, das quais foi coletado sangue para realização dos ensaios genotóxicos (Teste do Micronúcleo – MN e Ensaio Cometa – EC). Em seguida foram retirados tecidos (cérebro) para análise das atividades das enzimas colinesterases (ChEs). Concomitantemente tecidos das brânquias e fígado foram retirados para análise histológica. Os resultados dos marcadores genotóxicos apontam para diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os estuários avaliados e o grupo controle (Juréia-Itatins) em especial aqueles relacionados às microlesões no genoma (Ensaio Cometa) representados pelo Índice de Danos (ID) e pela Frequência de Danos (FD). O marcador enzimático representado pela Acetilcolinesterase (AChE) foi caracterizado e alguns parâmetros físico-químicos ideais foram definidos. Alguns inibidores específicos foram testados, entre eles o BW284c51 (inibidor específico da AChE) sendo comprovado que a atividade colinesterásica predominante do tecido cerebral de *M. curema* é a da AChE. A enzima também apresentou alta sensibilidade para alguns pesticidas organofosforados (OPs) e carbamatos (CBs), além dos íons

metálicos. A atividade específica da AChE sugere que os estuários avaliados encontram-se sob forte pressão antrópica, inclusive aqueles inseridos nas Áreas de Proteção Ambiental – APAs. A análise histopatológica revelou diversos tipos de lesões nas brânquias (aneurisma, fusão, necrose, atrofia, hiperplasia entre outras) e no fígado (necrose, centro de melanomacrófagos, infiltração leucocitária e congestão). Os dados apresentados demonstram que os estuários do Nordeste do Brasil encontram-se fortemente impactados e que as APAs tem sido pouco efetivas na proteção da biodiversidade do ecossistema estuarino. Foi observado efeito da sazonalidade nos padrões de contaminação dos estuários, indicando que as diferentes dinâmicas de fluxo hídrico entre o inverno e o verão exercem efeito direto na expressão dos biomarcadores.

Palavras-chave: Saúde Ambiental; Biomonitoramento; Biomarcadores; Estuários; Peixes.

ABSTRACT

In the Northeast Region of Brazil, the large urban centers are located in coastal regions close to estuarine environments. As a consequence, these environments have suffered a great environmental intervention, resulting from the discharge of effluents produced by intense human activity. These compounds can induce a series of genetic, biochemical and histological alterations in species that use estuaries in a transitory or permanent way, thus compromising the adaptability and survival of these species in this ecosystem. Furthermore, tools that evaluate enzymatic, genotoxic or tissue alterations in these species, for example, can be very useful in the elaboration of environmental diagnoses, important for monitoring and even predicting possibilities of greater environmental tragedies. The objective of this work was to carry out the biomonitoring of six estuarine systems in the northeast region of Brazil, using enzymatic, histological and genotoxic markers of the *M. curema* species. The collections took place every six months (Winter – Summer) during the years 2019 and 2020 in six estuarine systems distributed in the states of Paraíba, Pernambuco and Alagoas. For genotoxicity data, a control sample was used from the ecological station of Juréia-Itatins (South Coast of the State of São Paulo) according to literature data. In each of the estuaries, an average of 8 specimens of *M. curema* were captured, from which blood was collected for genotoxic assays (Micronucleus Test – MN and Comet Assay – EC). Tissues (brain) were then removed for analysis of the activities of cholinesterase enzymes (ChEs). Concomitantly, tissues from the gills and liver were removed for histological analysis. The results of the genotoxic markers point to statistically significant differences ($p < 0.05$) between the evaluated estuaries and the control group (Juréia-Itatins), especially those related to microlesions in the genome (Comet Assay) represented by the Damage Index (ID) and by Damage Frequency (FD). The enzyme marker represented by Acetylcholinesterase (AChE) was characterized and some ideal physicochemical parameters were defined. Some specific inhibitors were tested, among them the BW284c51 (specific inhibitor of AChE) being proven that the predominant cholinesterase activity of the brain tissue of *M. curema* is that of AChE. The enzyme also showed high sensitivity to some organophosphate pesticides (OPs) and carbamates (CBs), in addition to metal ions. The specific activity of AChE suggests that the evaluated estuaries are under strong anthropic pressure, including those located in Environmental Protection Areas – APAs.

Histopathological analysis revealed different types of lesions in the gills (aneurysm, fusion, necrosis, atrophy, hyperplasia, among others) and in the liver (necrosis, melanomacrophage center, leukocyte infiltration and congestion). The data presented show that the estuaries of Northeast Brazil are heavily impacted and that APAs have been ineffective in protecting the biodiversity of the estuarine ecosystem. An effect of seasonality was observed on the contamination patterns of estuaries, indicating that the different dynamics of water flow between winter and summer have a direct effect on the expression of biomarkers.

Keywords: Environmental Health; Biomonitoring; Biomarkers; Estuaries; Fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Estimativas anuais do crescimento da população brasileira realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.....	27
Figura 2 - Padrão de distribuição da população brasileira.....	28
Figura 3 - Panorama de utilização dos recursos hídricos no Brasil.....	31
Figura 4 - Esquema representativo das fases do ciclo de vida dos mugilídeos. Eclosão e desenvolvimento das larvas, recrutamento dos alevinos para áreas estuarinas, desenvolvimento e maturação sexual dentro dos estuários e retorno ao oceano no período reprodutivo.....	37
Figura 5 - Representação esquemática da formação de micronúcleos como consequência de uma lesão no material genético de uma célula em divisão. (a) Origem de um micronúcleo a partir de um cromossomo inteiro; (b) formação de micronúcleo a partir de uma quebra cromossômica.....	40
Figura 6 - Eritrócito micronucleado de peixe sinalizado pela seta vermelha.....	41
Figura 7 - Imagem de um nucleóide com DNA preservado após corrida eletroforética.....	42
Figura 8 - Imagem de um nucleóide com nível máximo de dano genômico.....	42
Figura 9 - Imagens dos diferentes níveis de danos pelo EC.....	43
Figura 10 - Imagem de uma macrolesão no genoma, evidenciada pelo MN.....	44
Figura 11 - Imagem de microlesões no genoma, evidenciadas pelo EC.....	44
Figura 12 - Desenho esquemático da AChE.....	47
Figura 13 - Desenho esquemático de uma sinapse colinérgica.....	48
Figura 14 - Sinapse colinérgica sem e com efeito de um agente neurotóxico.....	48
Figura 15 - Inibição da AChE por organofosforado (OPs) e carbamato (CBs).....	49
Figura 16 - Isoformas da enzima AChE.....	51
Figura 17 - Filamento branquial, corte transversal, H&E. 1) lamela primária; 2) lamela secundária; 3) célula epitelial; 4) célula mucosa; 5) célula pilar; 6) lúmen capilar (lacuna); 7) eritrócitos na luz do capilar; 8) célula de cloreto; 9) células basais.....	53
Figura 18 - Área de Preservação Ambiental de Guadalupe, litoral sul de Pernambuco.....	56

Figura 19 - Área de Preservação Ambiental Costa dos Corais, litoral sul de Pernambuco e norte de Alagoas.....57

Figura 20 - Área de proteção Ambiental da Barra do Rio Mamanguape, litoral norte da Paraíba.....58

ARTIGO 1

Figura 1 – Mapa da costa brasileira, indicando a localização dos estuários avaliados e a região controle..... 77

Figura 2 – Gráfico das médias de células micronucleadas - MNs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2019 comparadas ao grupo controle (Juréia-Itatins) 81

Figura 3 – Gráfico das médias de células micronucleadas - MNs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2020 comparadas ao grupo controle (Juréia-Itatins)81

Figura 4 – Gráfico com as médias de índices de danos - IDs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2019 comparadas ao grupo controle (Juréia).....82

Figura 5 – Gráfico com as médias de índices de danos - IDs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2020 comparadas ao grupo controle (Juréia)..... 82

Figura 6 – Gráfico com as médias das frequências de danos - FDs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2019 comparadas ao grupo controle (Juréia)..... 83

Figura 7 – Gráfico com as médias das frequências de danos - FDs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2020 comparadas ao grupo controle (Juréia)..... 84

ARTIGO 2

Figura 1 - Mapa do litoral brasileiro evidenciando a localização dos estuários ao longo dos estados da Paraíba (1 e 2), Pernambuco (3 e 4) e Alagoas (5 e 6). Os símbolos indicam as áreas de proteção ambiental e as regiões metropolitanas.....99

Figura 2 - Efeitos da temperatura (a) e do pH (b) sobre a atividade da AChE presente no cérebro de *M. curema*.....104

Figura 3 - Atividades específicas da AChE do cérebro de *M. curema* dos estuários da Paraíba, Pernambuco e Alagoas no Verão e Inverno de 2019 (a) e 2020 (b).....107

Dados Complementares (ARTIGO 2)

Figura 4 - a) Cinética de Michaelis-Menten da AChE do cérebro de *M. curema* usando o substrato acetiltiocolina (ASCh) **b)** Cinética de Michaelis-Menten da BChE do cérebro de *M. curema* usando o substrato butiriltiocolina (BSCh) e **c)** Cinética de Michaelis-Menten da PChE do cérebro de *M. curema* usando o substrato propioniltiocolina (PSCh).....114

Figura 5 - Efeito dos inibidores seletivos sobre a atividade da AChE presente no tecido cerebral de *M. curema*. **a)** BW284c51; **b)** Iso – OMPA; **c)** Eserina e **d)** Neostigmina.....115

Figura 6 - Efeito dos íons metálicos sobre a atividade da AChE presente no tecido cerebral da espécie *M. curema* a) Zn^{2+} ; b) Hg^{2+} ; c) Cu^{2+} e d) As^{2+} 116

Figura 7 - Efeito dos pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a atividade da AChE presente no tecido cerebral da espécie *M. curema*. **a)** Diclorvos, **b)** Temefos, **c)** Carbaril e **d)** Carbofuran.....116

ARTIGO 3

Figura 1 - Mapa do litoral brasileiro evidenciando a localização dos estuários ao longo dos estados da Paraíba (1 e 2), Pernambuco (3 e 4) e Alagoas (5 e 6). Os símbolos indicam as áreas de proteção ambiental e as regiões metropolitanas.....125

Figura 2 - Iorg das brânquias em cada estação e estuário. a) Inverno, b) Verão.....128

Figura 3 - Resultados do Iorg das brânquias comparando a interação entre estação e estuário.....129

Figura 4 - Caracterização histopatológica das lesões branquiais de exemplares de *Mugil curema*, coletados em diferentes estuários nos estados de Pernambuco,

Alagoas e Paraíba. A – Deslocamento de epitélio (setas finas pretas); B – Aneurisma (estrela amarela); C – Hipertrofia (setas finas azuis), desestruturação das lamelas secundárias (seta preta grossa); D – Edema (estrela preta), hipertrofia (setas finas azuis); E – Hipertrofia (seta fina azul), fusão (seta grossa branca), hiperplasia (seta fina branca); F – Ovos de parasitos (setas finas vermelha), fusão (seta grossa branca), hiperplasia (seta fina branca). Coloração Hematoxilina e Eosina.....	130
Figura 5 - Iorg dos fígados em cada estação e estuário. Inverno (a), Verão (b).....	131
Figura 6 - Iorg dos fígados comparando a interação entre estação e estuário.....	131
Figura 7 - Caracterização histopatológica das lesões hepáticas de exemplares de <i>Mugil curema</i> , coletados em diferentes estuários nos estados de Pernambuco, Alagoas e Paraíba. A – Parasito (seta fina branca), sinusóides (setas finas pretas); B – Congestão (estrela branca), infiltração leucocitária (seta grossa preta); C – Necrose (estrela preta), sinusóide (seta fina preta); D – Infiltração leucocitária (seta grossa preta), centro de melanomacrófagos (seta grossa branca), sinusóides (setas finas pretas). Coloração Hematoxilina e Eosina.....	132

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 - Classificação das enzimas de acordo com a reação por elas realizadas.....	46
---	----

ARTIGO 2

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos da AChE de várias espécies de peixes	102
---	-----

Tabela 2 – Valores das concentrações capazes de inibir em 50% a atividade enzimática (IC ₅₀) para cada um dos compostos testados.....	105
--	-----

ARTIGO 3

Tabela 1 - Unidades federativas, estuários e número de espécimes coletados no Verão e Inverno de 2019.....	126
---	-----

Tabela 2 - Valores de fator de importância (w) e respectivas lesões histopatológicas consideradas para a determinação do índice de Bernet de cada brânquia e fígado coletados, conforme protocolo adaptado de Bernet <i>et al.</i> (1999)	127
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
APA	Área de Proteção Ambiental
ANA	Agência Nacional de Águas
ANOVA	Análise de Variância
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
CBs	Carbamatos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPRH	Agência Estadual de Meio Ambiente
ChEs	Colinesterases
Cd	Cádmio
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5' Ditiobis (2-nitrobenzóico)
EC	Ensaio Cometa
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco
FD	Frequência de Dano
FEPAM	Fundação Estadual de Proteção Ambiental
Fe	Ferro
HAPs	Hidrocarbonetos policíclicos Aromáticos

Hg	Mercúrio
ID	Índice de Dano
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
Km	Constante de Michaelis-Menten
mA	Miliampére
MN	Micronúcleo
NaCl	Cloreto de Sódio
NaAsO ₂	Arsenito de Sódio
OPs	Organofosforados
PChE	Propionilcolinesterase
PCBs	Bifenilpoliclorado
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
Pb	Chumbo
TBE	Tris/Borato/EDTA
UFPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
V	Volt
V _{max}	Velocidade máxima de catálise atingida por uma enzima
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REFERENCIAL TEÓRICO	27
3.1	A DENSIDADE POPULACIONAL NAS ZONAS COSTEIRAS E O IMPACTO SOBRE A BIODIVERSIDADE MARINHA.....	27
3.2	O GERENCIAMENTO DOS RECURSOS HIDRICOS NO BRASIL: UM PANORAMA DAS PRINCIPAIS BACIAS HIDROGRÁFICAS DO PAÍS	30
3.3	A IMPORTÂNCIA DOS PEIXES NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL: <i>Mugil curema</i> COMO SENTINELA DE AMBIENTES ESTUARINOS.....	34
3.4	OS EFEITOS DA POLUIÇÃO NO AMBIENTE ESTUARINO: A RESPOSTA DAS ESPÉCIES NATIVAS.....	38
3.5	BIOMARCADORES GENÉTICOS.....	39
3.5.1	Teste do Micronúcleo	39
3.5.2	Ensaio Cometa.....	41
3.5.3	Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo: Uma comparação	43
3.6	BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS	45
3.6.1	Enzimas.....	45
3.6.2	Biomarcadores Neurotóxicos: Enzimas Colinesterases.....	46
3.7	BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS.....	52
3.7.1	A utilização da histologia como ferramenta de monitoramento ambiental.....	52
3.7.1.1	Brânquias	52
3.7.1.2	Fígado	53
3.8	O TURISMO E AS ÁREAS DE PRESERVAÇÃO AMBIENTAL NO LITORAL DE PERNAMBUCO, PARAÍBA E ALAGOAS	55
	REFERÊNCIAS.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1	ARTIGO 1.....	73

4.2	ARTIGO 2.....	95
4.3	ARTIGO 3.....	123
5	CONCLUSÕES	141
6	SÚMULA CURRICULAR	144

1 INTRODUÇÃO

O avanço dos sistemas industriais, associado com os crescentes níveis de urbanização em regiões próximas de recursos hídricos, têm contribuído de maneira alarmante com a introdução de compostos químicos prejudiciais à saúde ambiental e das espécies (GHISI *et al.*, 2014; PASSOS *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2021). Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa em função de múltiplos impactos ambientais advindos do lançamento de grandes quantidades de efluentes sem tratamento adequado e/ou com intensidade, em concentração e características discordantes dos padrões estabelecidos em legislação (FRINHANI E CARVALHO, 2010; WADE *et al.*, 2021). Como consequência, tem-se observado uma expressiva queda da qualidade da água, perda de biodiversidade aquática, além de desequilíbrios à fauna, à flora e aos ciclos biogeoquímicos (TALLINI *et al.*, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2022).

No nordeste do Brasil, os grandes centros urbanos localizam-se nas regiões costeiras próximos a ambientes estuarinos (IBGE, 2022). Como consequência, estes ambientes têm sofrido uma grande intervenção ambiental, decorrente da descarga de efluentes produzidos pela intensa atividade humana (BENINCÁ *et al.*, 2011; PASSOS *et al.*, 2021). A poluição das regiões estuarinas compromete o equilíbrio ecológico e ameaça a exploração econômica dos recursos biológicos, tendo efeitos negativos sobre a economia, além de constituir uma questão de saúde pública pelo risco do consumo de organismos contaminados (ABESSA *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2019). Isto representa uma problemática antiga, que vem se agravando atualmente (KENNISH, 1994; LIU *et al.*, 2022)

A utilização de peixes como espécies bioindicadoras da qualidade dos ecossistemas aquáticos vem crescendo substancialmente nos últimos anos. Esse crescimento está associado à sua relação íntima com o ambiente (ADAM *et al.*, 2010; PRAGNYA *et al.*, 2021), constituindo-se em excelentes monitores de ambientes aquáticos que sofreram ou estão sofrendo algum tipo de estresse ou mudança nas suas condições naturais (CARMO *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2019).

Espécies do gênero *Mugil* tem sido consideradas sentinelas e consequentemente utilizadas para diagnósticos da saúde de ambientes costeiros (HAUZER-DAVIS *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2019). Algumas de suas características reforçam tal condição como sua capacidade de adaptação a uma gama de variações ambientais, como salinidade, turbidez, oxigênio dissolvido e temperatura (WHITFIELD *et al.*, 2012). Além disso outra característica que torna a espécie um bioindicador importante dos ambientes estuarinos é o seu ciclo de vida. Após a desova no mar, as larvas e juvenis migram para os estuários, em especial nos habitats com abundância de manguezais, em um processo conhecido como “recrutamento” e permanecem nesses ambientes até a fase adulta (CROSETTI E BLABER, 2016).

Mugilideos possuem uma considerável importância econômica regional. Em geral, representam boa parte do pescado consumido no mundo e a pesca artesanal representa uma das principais atividades desenvolvidas pelas comunidades ribeirinhas no Nordeste do Brasil (ARAÚJO E SILVA, 2013). Em especial, *Mugil curema* é um dos recursos pesqueiros mais consumidos por estas comunidades, em termos de alimentação e geração de renda com mais de 18 mil toneladas de pescado ao ano (PESCA, 2011).

Frente a essa problemática, grande atenção tem sido despendida com relação ao monitoramento das ações antropogênicas e seus efeitos em espécies nativas (ADAM *et al.*, 2010; FALCÃO *et al.*, 2020). Uma urgência maior tem sido dada ao desenvolvimento de métodos de acesso a esses efeitos, com técnicas diagnósticas e prognósticas mais informativas e efetivas, destacando-se as abordagens genéticas, histológicas e bioquímicas (SINGH *et al.*, 1988; BOLOGNESI E HAYASHI, 2011; SAOCA *et al.*, 2022). Nesse contexto, as técnicas de diagnóstico ambiental, e ou biomoléculas classificadas como biomarcadoras surgem como ferramentas com o poder de monitorar e determinar a magnitude dos efeitos do impacto de determinados contaminantes sobre os organismos em nível individual, populacional ou de comunidade biológica, uma vez que são ferramentas ou compostos baseados ou originados de tecido animal, vegetal ou de micro-organismos que, além de permitirem caracterizar quimicamente os poluentes e determinar suas concentrações, também podem estimar o impacto causado por esses poluentes nos organismos bioindicadores (COIMBRA *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2022; KARTAL E BILDIK *et*

al., 2022). Nesse contexto, o presente estudo buscou avaliar a saúde ambiental dos principais sistemas estuarinos da Região Nordeste, através de marcadores biológicos em espécie sentinela, visando contribuir com estudos posteriores na construção de um sistema fiscalizador sobre o controle da poluição ao longo do litoral Nordestino.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o diagnóstico ambiental, baseado no biomonitoramento de seis sistemas estuarinos da Região Nordeste do Brasil, por meio de marcadores enzimáticos, histológicos e genotóxicos de *M. curema*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o dano genômico por macrolesões em células sanguíneas de *M. curema* pelo Ensaio Micronúcleo.
- Avaliar o dano genômico por microlesões em células sanguíneas de *M. curema* pelo Ensaio Cometa.
- Comparar os resultados de micro e macrolesões entre os estuários das regiões metropolitanas e das Áreas de Proteção Ambiental (APAs) com o grupo controle.
- Avaliar o efeito da sazonalidade (Inverno e Verão) na expressão dos marcadores genéticos.
- Sugerir os níveis de preservação ambiental dos estuários a partir dos dados genotóxicos.
- Caracterizar físico-química e cineticamente a acetilcolinesterase (AChE) cerebral de *M. curema*.
- Determinar a temperatura ótima e o pH ótimo de atividade da enzima.

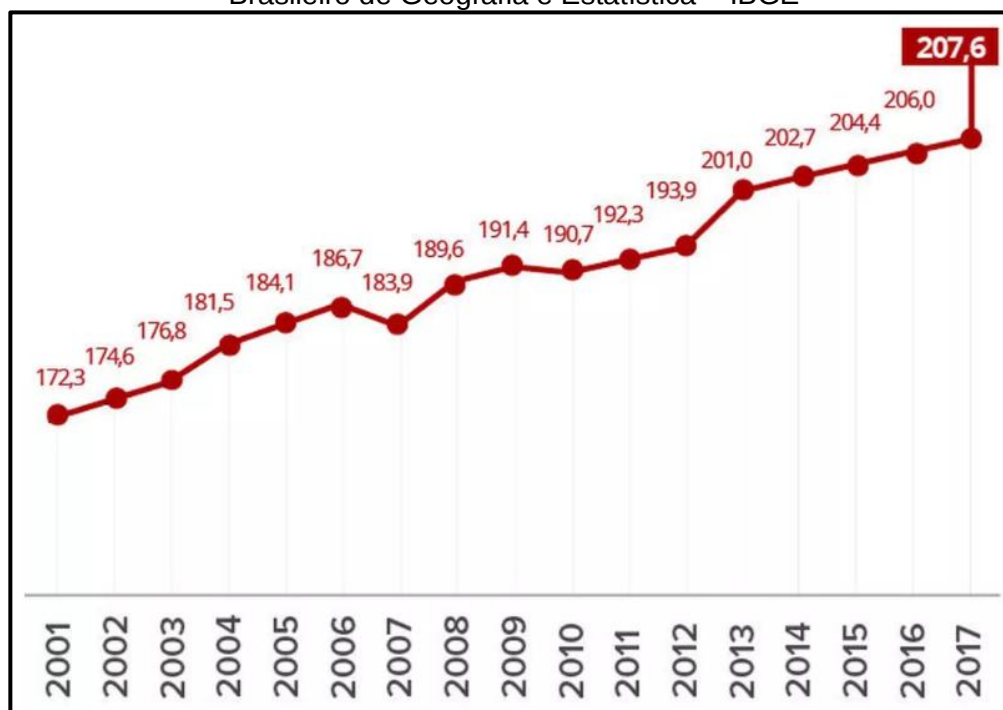
- Avaliar o efeito *in vitro* de pesticidas carbamatos e organofosforados, dos inibidores específicos, bem como investigar o efeito de íons metálicos sobre a atividade colinesterásica.
- Determinar o poder inibitório dos íons metálicos avaliados.
- Comparar os dados de atividade específica da AChE entre os estuários da Paraíba, Pernambuco e Alagoas nas diferentes estações (Inverno e Verão) de 2019 e 2020.
- A partir dos dados de atividade específica da AChE sugerir os estuários mais e menos preservados.
- Avaliar a partir dos resultados da atividade específica da AChE se os estuários inseridos nas Áreas de Proteção Ambiental apresentam melhores condições do que os das regiões metropolitanas.
- Avaliar possíveis alterações histopatológicas na brânquia e fígado da espécie *M. curema* nos estuários avaliados.
- Avaliar se existem diferenças nos padrões de expressão das alterações histopatológicas entre os tecidos avaliados, nos diferentes estuários e estações (Inverno/Verão).
- Elencar as alterações histopatológicas nas brânquias e fígado dos espécimes avaliados, identificando as mais e menos incidentes.
- Sugerir a necessidade de melhorias no gerenciamento das APAs dos estuários avaliados
- Sugerir o status de preservação dos estuários avaliados a partir dos resultados dos marcadores biológicos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A DENSIDADE POPULACIONAL NAS ZONAS COSTEIRAS E O IMPACTO SOBRE A BIODIVERSIDADE MARINHA

O rápido crescimento da população global resulta no aumento da demanda em vários setores da economia, entre eles a produção industrial, a agricultura e o turismo se destacam por sofrerem influência direta dos níveis populacionais do planeta (CHAKRABORTY *et al.*, 2020). No Brasil o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE realiza censos demográficos a cada 10 anos. As pesquisas tem demonstrado um crescimento considerável da população brasileira a cada censo realizado, a última estimativa realizada em 2017 indica que o Brasil já ultrapassou a marca de 200 milhões de habitantes (Figura 1).

Figura 1 - Estimativas anuais do crescimento da população brasileira realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE

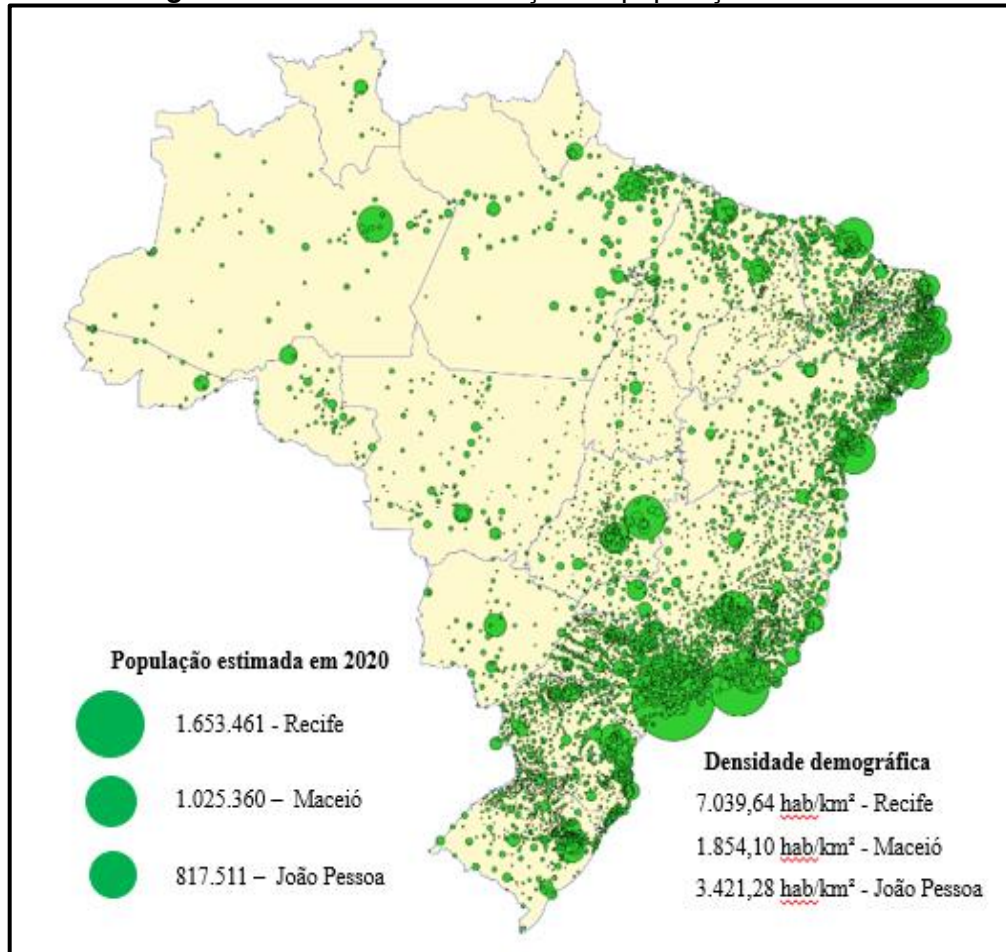


Fonte: IBGE, 2017

Tais dados também revelam que o crescimento da população no Brasil não ocorre de maneira homogênea ao longo do território, sendo as regiões costeiras

aquelas que apresentam as maiores densidades demográficas do país (Figura 2) (IBGE, 2020).

Figura 2 - Padrão de distribuição da população brasileira



Fonte: Adaptado IBGE, 2020

As áreas costeiras apresentam características que as tornam atrativas para o estabelecimento e desenvolvimento de grandes centros urbanos, como a facilidade de escoamento da produção agrícola através dos portos e a possibilidade de explorar a pesca e o turismo. O nordeste do Brasil caracteriza-se por apresentar belas praias ao longo do seu litoral e um clima favorável praticamente o ano inteiro. Dos nove estados dessa região, em oito a capital é litorânea, isso revela que os grandes centros urbanos do nordeste brasileiro estão localizados próximos a costa (IBGE, 2020).

Sistemas marinhos vem sendo fortemente impactados pelas atividades humanas, incluindo a exploração excessiva, eutrofização, poluição e introdução de espécies (HALPERN *et al.*, 2008; HOEGH-GULDBERG E BRUNO, 2010; BURROWS *et al.*, 2011; BEAUMONT *et al.*, 2019). Uma consequência desses fatores de estresse é uma mudança documentada na composição e riqueza das espécies (SAX E GAINES, 2003; BEAUGRAND *et al.*, 2010; MACLEOD *et al.*, 2021). Evidências na costa do Atlântico (STACHOWICZ *et al.*, 2002) e do Pacífico (SORTE *et al.*, 2010) da América do Norte, indicam que as espécies não nativas em comunidades de invertebrados incrustantes, são favorecidas em detrimento de espécies nativas em águas mais quentes. Desta maneira, o aquecimento pode conduzir a uma tendência de homogeneização da composição de comunidades marinhas (BURROWS *et al.*, 2011; MACLEOD *et al.*, 2021).

Desde a publicação dos primeiros experimentos que estudam os efeitos das mudanças na biodiversidade dos ecossistemas (NAEEM *et al.*, 1994; TILMAN *et al.*, 1994), há o consenso de que o declínio da biodiversidade tem consequências negativas para as funções do ecossistema, tais como produção, eficiência no uso dos recursos e ciclagem de nutrientes.

Outro fator que contribui para a redução da biodiversidade de ambientes aquáticos é a introdução de compostos químicos produzidos pela atividade humana (EGANHOUSE E SHERBLOM, 2001; DACHS E MÉJANELLE, 2010; MACIEL *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2021). Entre aqueles classificados como poluentes orgânicos, os que mais preocupam são os poluentes orgânicos persistentes (POPs), como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAPs), e inúmeros compostos utilizados como pesticidas (DACHS E MÉJANELLE, 2010; SPONCHIADO *et al.*, 2011; SMALLING *et al.*, 2013; MACIEL *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2021). Os poluentes inorgânicos, tais como os metais pesados, também possuem grande relevância nos estudos dos efeitos antrópicos sobre as comunidades de organismos marinhos (PINHEIRO E TOLEDO, 2010; AMOOZADEH *et al.*, 2014; SHARIF *et al.*, 2014; PRAGNYA *et al.*, 2021).

Muitos destes poluentes persistem por longos períodos nos sistemas marinhos, onde as suas concentrações e os efeitos continuam aumentando (SOUZA *et al.*, 2013; AMOOZADEH *et al.*, 2014; SHARIF *et al.*, 2014; LEPAGE *et al.*, 2022). A maioria destes compostos acumula-se ao longo do tempo e biomagnificam-se através das

teias alimentares, tornando-se mais concentrados e prejudiciais em níveis tróficos superiores (SUN *et al.*, 2021).

A gama completa de efeitos destes compostos é desconhecida, mas incluem os cânceres, deformações e falhas reprodutivas (ADAM *et al.*, 2010; PINHEIRO E TOLEDO, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013; MALTSEVA *et al.*, 2022). Estes efeitos foram observados em vários tipos de organismos marinhos (SHAHIDUL ISLAM E TANAKA, 2004; AMOOZADEH *et al.*, 2014; FERRANTE *et al.*, 2022).

Shahidul Islam e Tanaka (2004), estimam que milhões de toneladas de óleo entram no ambiente marinho a partir de várias fontes, como a manutenção de refinarias e derrame da água de lastro, causando efeitos adversos em inúmeras espécies de peixes, invertebrados, aves e mamíferos marinhos. No entanto, os efeitos destes compostos vão além dos eventos de mortalidade imediata, e continuam a afetar de maneira indireta todo funcionamento do ecossistema (BEAUGRAND *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2019; LEPAGE *et al.*, 2022).

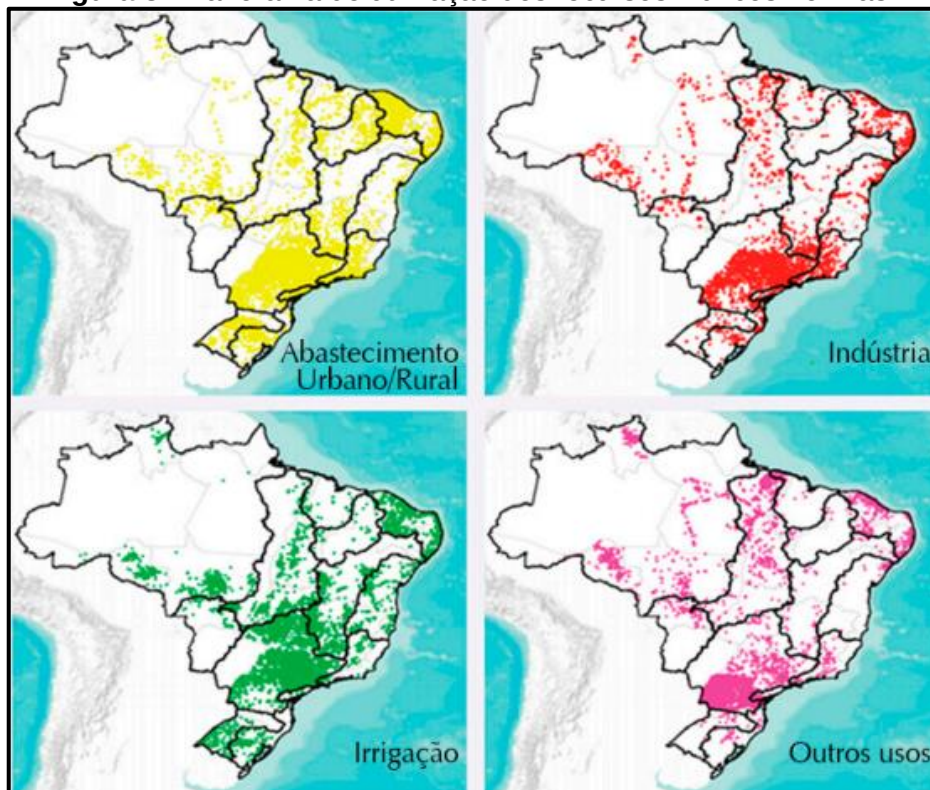
3.2 O GERENCIAMENTO DOS RECURSOS HÍDRICOS NO BRASIL: UM PANORAMA DAS PRINCIPAIS BACIAS HIDROGRÁFICAS DO PAÍS

A relevância dos recursos hídricos é incontestável tendo em vista que todas as formas de organizações sociais dependem deles para realizar suas atividades rotineiras. Sendo assim, a utilização da água pela sociedade humana visa a atender suas necessidades pessoais, atividades econômicas (agrícolas e industriais) e sociais (TUCCI E MENDES, 2006; GETIRANA *et al.*, 2021). No entanto, essa diversificação no uso da água, quando realizada de forma inadequada, provoca alterações na qualidade da mesma, comprometendo os recursos hídricos e por consequência seus usos para os diversos fins (TOMASONI *et al.*, 2009; GETIRANA *et al.*, 2021). Segundo Tucci (2008), há décadas o Brasil passa por um processo de urbanização que gera problemas relacionados com a infraestrutura dos recursos hídricos no ambiente urbano, destacando a falta de tratamento de esgoto e o aumento da carga de resíduos sólidos lançados nos mananciais. A Figura 3 mostra um panorama de utilização dos recursos hídricos entre as diferentes atividades.

Um fator importante que amplia a relevância do bom gerenciamento dos recursos hídricos em nosso país é que sua distribuição é heterogênea ao longo do

território nacional. Dados da Agência Nacional das Águas – ANA revelam que passam pelo território brasileiro, em média, 260.000 m³/s de água, dos quais 205.000 m³/s estão localizados na bacia do rio Amazonas, sobrando para o restante do território nacional apenas 55.000 m³/s de vazão média. A região em que há maior disponibilidade hídrica é onde há menor densidade populacional, e as regiões mais populosas do país, onde ocorre a maior demanda por água, são aquelas com menor disponibilidade hídrica. Esses dados expõem a urgência do gerenciamento adequado dos mananciais próximos aos grandes centros urbanos do país (PEREIRA *et al.*, 2020). O panorama das últimas décadas é preocupante e vários trabalhos revelam a grande pressão antrópica que esses recursos tem sofrido (AMOOZADEH *et al.*, 2013; GINEBRED A *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2019).

Figura 3 - Panorama de utilização dos recursos hídricos no Brasil



Fonte: Agência Nacional de Águas, 2016

No estado do Rio Grande do Sul, o Rio dos Sinos é um exemplo de importante manancial fortemente impactado pelas atividades humanas, o respectivo recurso hídrico é responsável pelo fornecimento de água potável para aproximadamente 2 milhões de pessoas (PETRY E SCHULZ, 2006). Segundo Petry e Schulz (2006), a introdução de compostos químicos neste manancial, ocorre principalmente na parte

média e inferior da bacia. Nessas regiões, os riachos que compõem a rede hidrológica passam por centros urbanos com elevada densidade populacional e alta atividade industrial (PETRY E SCHULZ, 2006). Os principais distúrbios que degradam os afluentes do Rio dos Sinos são a poluição originária de esgoto doméstico e industrial das áreas urbanas e a erosão provocada em grande parte pela eliminação da mata ciliar em áreas urbanas e agrícolas (FEPAM, 2009).

Segundo a Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM), cerca de 35 toneladas de metais pesado como cobre (Cu), zinco (Zn), cromo (Cr), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) são liberados pelas atividades humanas no rio dos Sinos a cada ano. As descargas de resíduos tóxicos provenientes das atividades industriais ocorrem rotineiramente, causando mortandade de peixes na haste principal do rio. Em outubro de 2006 mais de 100 toneladas de peixes morreram devido a tais descargas, causando um prejuízo ecológico e econômico de valor inestimável (FEPAM, 2009).

Segundo a Agência Nacional de Águas (ANA), situação semelhante é evidenciada na maioria dos mananciais do Estado de Santa Catarina, tais recursos apresentam diferentes níveis de poluição, principalmente de efluentes domésticos, industriais e pesticidas (ANA, 2012). A bacia hidrográfica do Rio Cubatão do Sul é a mais alarmante devido à sua importância no abastecimento de água (ANA, 2012). De acordo com a concessionária local de tratamento de águas e saneamento (Companhia Catarinense de Águas e Abastecimento) (CASAN, 2013), nos últimos anos, o Rio Cubatão do Sul sofreu significativa erosão devido à remoção da mata ciliar, como consequência, essa perda tem contribuído para uma diminuição do volume de água ao longo dos anos. Além disso, na bacia do Rio Cubatão do Sul há intensa atividade agropecuária, que juntamente com a remoção da mata ciliar, o escoamento de esgotos domésticos e industriais e a mineração de areia, estão prejudicando a qualidade e a quantidade de suas águas (EXTERCKOTER, 2006). A maior parte dos resíduos tóxicos encontrados nas águas do rio deriva do escoamento de atividades urbanas, indicando que a urbanização tem impacto negativo sobre a qualidade das águas superficiais (EXTERCKOTER, 2006).

No estado de São Paulo, a qualidade do solo e as características do clima fazem da região das bacias hidrográficas do Rio Pardo, uma das principais áreas agrícolas do Brasil (RIBEIRO, 2008). A região é caracterizada pela alta produtividade agrícola, especialmente de cana de açúcar, o que a torna na maior produtora de açúcar e álcool do mundo (CARNESECA *et al.*, 2012). Tais atividades acabam

resultando na descarga de pesticidas e herbicidas nesse manancial, que associados aos resíduos domésticos e industriais produzidos pelas atividades humanas, promovem uma degradação ambiental muito grave nessa região (RIBEIRO, 2008; CARNESECA *et al.*, 2012).

No estado de Minas Gerais, a indústria mineral tem um papel econômico fundamental, representando cerca de 55% do seu produto interno bruto. As múltiplas relações da mineração com as bacias hidrográficas, com áreas urbanas e protegidas, tornam a gestão ambiental desses recursos cada vez mais complexa (CIMINELLI, 2010; TUNDISI, 2014). Os municípios associados à bacia hidrográfica do Rio Doce possuem uma população estimada em 3,5 milhões de habitantes (FELIPPE *et al.*, 2016). O rompimento da barragem de Fundão no município de Mariana, ocorrido em novembro de 2015 trouxe graves consequências socioambientais para os municípios pertencentes a esta bacia, afetando a economia e gerando danos ambientais em proporções nunca antes observada para aquela região (DIAS *et al.*, 2018).

As bacias hidrográficas localizadas na região nordeste do Brasil incluem áreas altamente sensíveis aos impactos ambientais relacionados com as atividades humanas (LACERDA *et al.*, 2008). Um exemplo é a bacia do Pina no estado de Pernambuco, onde estudos indicam que a qualidade ambiental dos recursos hídricos e biológicos encontrasse fortemente impactada pela intensa atividade antrópica (VITÓRIO, 2006; VALENÇA, 2009; MACIEL *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2019).

A forte influência de esgotos domésticos na Bacia do Pina vem sendo demonstrada através do alto nível de coliformes fecais na água e em tecidos de invertebrados aquáticos (BARROS *et al.*, 2009; FARRAPEIRA *et al.*, 2010). O Parque dos Manguezais, localizado na parte Sudoeste da Bacia do Pina, também apresenta evidências da contaminação antrópica. Nesta localidade espécies de moluscos estão contaminados por metais pesados, podendo o consumo desses organismos ser altamente prejudicial à saúde humana (SILVA *et al.*, 2010). Lima *et al.* (2019) observaram através de análises genotóxicas em células sanguíneas de peixe, que o estuário do Rio Capibaribe constituinte da bacia do Pina, apresenta o maior impacto ambiental entre as principais bacias hidrográficas do estado de Pernambuco. Corroborando com os achados de outros trabalhos realizados em regiões costeiras com características semelhantes (PINHEIRO *et al.*, 2013; MARKICH, 2020).

3.3 A IMPORTÂNCIA DOS PEIXES NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL:

Mugil curema COMO SENTINELA DE AMBIENTES ESTUARINOS

O biomonitoramento de ambientes aquáticos é de extrema importância, uma vez que estes ambientes são o destino final para a maior parte dos resíduos urbanos, industriais e agrícolas (ADAM *et al.*, 2010; GINEBRED A *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2015; SANOU *et al.*, 2021). O desenvolvimento industrial, a intensa urbanização e práticas agrícolas não planejadas, introduziram grandes quantidades de substâncias biologicamente ativas, incluindo produtos químicos orgânicos (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HAPs) e inorgânicos (Metais pesados) (PINHEIRO *et al.*, 2013; MACIEL *et al.*, 2015; MANZANO *et al.*, 2015).

Muitos destes poluentes estão presentes no meio ambiente em níveis muito baixos, porém, podem acumular-se nos tecidos dos organismos aquáticos e induzirem danos no DNA destas espécies (ADAM *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010). No trabalho realizado por Ahmed *et al.* (2011), foram utilizados exemplares de tilápia (*Oreochromis mossambicus*) expostos a diferentes concentrações de Arsenito de Sódio (NaAsO₂) para evidenciar o potencial genotóxico desse composto, utilizando como metodologias o ensaio cometa (EC) e o teste do micronúcleo (MN), os resultados indicam que estas metodologias possuem diferentes sensibilidades na detecção de danos genômicos, fornecendo um panorama completo dos efeitos causados pelo composto.

Pinheiro *et al.* (2013), observaram que as altas concentrações de metais pesados como o cobre, cádmio, cromo, chumbo e mercúrio (Hg), quantificados em amostras de água e sedimento coletados em região de manguezal fortemente impactado, estão diretamente relacionados ao mecanismo de indução de danos genômicos em caranguejos da espécie *Ucides cordatus*, revelando o potencial mutagênico destes compostos em crustáceos. Adam *et al.* (2010), em trabalho realizado com exemplares da espécie de peixe *Poecilia vivípara* em lago urbano de Curitiba-Sul do Brasil, observaram que as concentrações de metais pesados e coliformes fecais dessa região, são capazes de produzir efeitos adversos ao genoma através da formação de micronúcleos nos eritrócitos avaliados. Outros estudos recentes indicam o potencial genotóxico destes contaminantes em diversos grupos taxonômicos de animais aquáticos, como os observados em mexilhões (ROCHA *et al.*, 2014; MUSRRI *et al.*, 2021), peixes (RAGUGNETTI *et al.*, 2011; SPONCHIADO *et*

al., 2011; BARSIENTE *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2019) e gastrópodes (SARKAR *et al.*, 2015; MALTSEVA *et al.*, 2022).

As espécies aquáticas são normalmente expostas a uma mistura complexa de substâncias químicas, que acabam induzindo danos genéticos que podem ser expressos em diferentes níveis de organização ecológica (individual, populacional ou ecossistêmico) (VOROSMARTY *et al.*, 2010; GINEBREDÁ *et al.*, 2014; CASTRO *et al.*, 2021). Uma enorme variedade de contaminantes ambientais pode causar alterações de forma direta ou indireta ao DNA, possuindo assim significativa relevância toxicológica, uma vez que estão relacionados a vários processos patológicos que incluem efeitos reprodutivos e carcinogênicos, que além de afetarem o indivíduo, se tornam ativos em gerações subsequentes (LEWIS E GALLOWAY, 2009; CASTRO *et al.*, 2021). A constante exposição a esses produtos químicos pode levar a respostas fisiológicas anormais e causar efeitos adversos sobre o desenvolvimento, o crescimento, comportamento e a taxa reprodutiva (EGANHOUSE E SHERBLOM, 2001; BISTODEAU *et al.*, 2006; PINHEIRO E TOLEDO, 2010; GINEBREDÁ *et al.*, 2014).

A utilização de peixes como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos vem crescendo substancialmente nos últimos anos, esse crescimento está associado à sua relação íntima com o ambiente (LIMA *et al.*, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2021; CASTRO *et al.*, 2021), constituindo-se em excelentes bioindicadores de ambientes aquáticos que sofreram ou estão sofrendo algum tipo de estresse ou mudança nas suas condições naturais (AUBRECHT E CABA, 2005; PATIRE, 2010; CARMO *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2021).

Entre as espécies de peixes estuarinos destaca-se a espécie *M. curema*. Os mugilídeos possuem alimentação majoritariamente detritívora, filtrando, ingerindo e concentrando em seus alimentos elevadas quantidades de matéria orgânica sedimentar, como também matéria orgânica proveniente de efluentes domésticos (VOLLRATH *et al.*, 2021). Vollrath *et al.* (2021) em estudo sobre os hábitos alimentares de *M. curema*, relatam que após o recrutamento dos juvenis, a espécie torna-se iliófaga, alimentando-se no fundo da coluna de água. Tal hábito expõe os espécimes a uma grande quantidade de substâncias tóxicas, desencadeando modificações como reflexo das condições adversas em que vivem (CROSETTI E BLABER, 2016; VOLLRATH *et al.*, 2021). O modo de alimentação detritívoro posiciona os mugilídeos na base da cadeia alimentar, o que possibilita sua atuação como

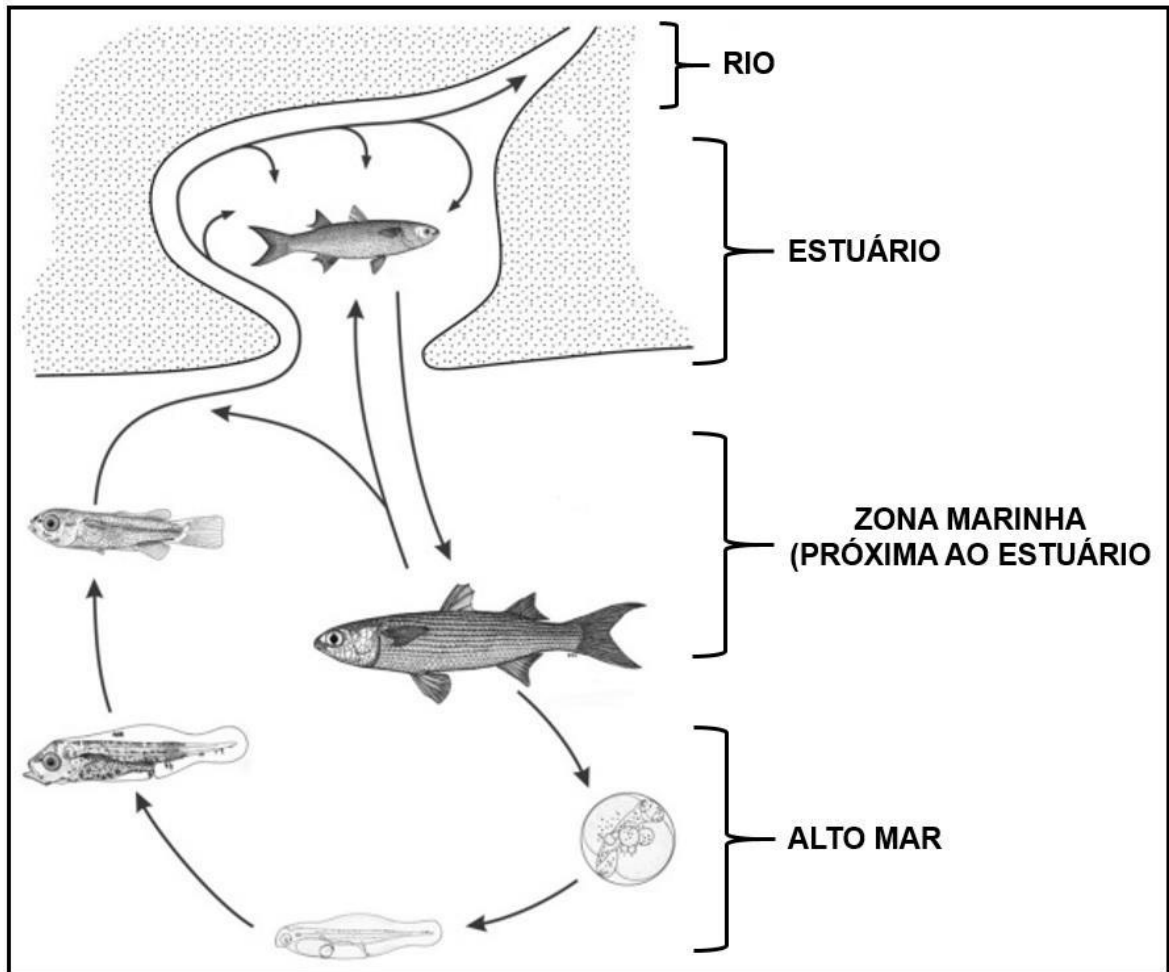
colonizadores iniciais em sistemas aquáticos, resultando em seu uso como possível indicador de recuperação de ambientes degradados (MOHAMED *et al.*, 2012).

Devido a sua ampla distribuição, abundância, importância socioeconômica e hábitos alimentares essa espécie já foi utilizada em diversos estudos de monitoramento ambiental (CARMO *et al.*, 2011; GARCÍA-GASCA *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2019).

Carmo *et al.* (2011), analisaram as concentrações de metais pesados em diferentes tecidos da espécie *M. curema* de dois rios (Branco e Mariana) do estuário de Santos/São Vicente-SP e encontraram altas concentrações de Cr e ferro (Fe) nas brânquias e de Cu e Zn no fígado, observando diferentes padrões de bioacumulação que podem refletir potenciais genotóxicos distintos. Patire (2010), avaliou a biodisponibilidade de Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, através da análise de metabólitos biliares de *M. curema* dos estuários de Santos e Cananéia, São Paulo, constatando uma maior concentração nos indivíduos coletados no estuário de Santos, indicando um maior nível de contaminação deste estuário. Lima *et al.* (2019) em estudo realizado em cinco sistemas estuarinos da Região Nordeste utilizando *M. curema* como organismo bioindicador, observaram através de marcadores genéticos diferentes níveis de degradação ambiental resultantes de diversas fontes de contaminação, elencando os estuários mais e menos preservados de acordo com os padrões de micro e macrolesões detectados na espécie.

Portanto, a classificação de *M. curema* como espécie sentinela de ambientes estuarinos, se dá devido a algumas de suas características como: ampla distribuição, hábito alimentar, capacidade de adaptação a variações ambientais (salinidade, turbidez, oxigênio dissolvido, temperatura e etc) e principalmente ao seu ciclo de vida (Figura 4).

Figura 4 - Esquema representativo das fases do ciclo de vida dos mugílídeos. Eclosão e desenvolvimento das larvas, recrutamento dos alevinos para áreas estuarinas, desenvolvimento e maturação sexual dentro dos estuários e retorno ao oceano no período reprodutivo.



Fonte: Adaptado de CROSETTI E BLABER, 2016

3.4 OS EFEITOS DA POLUIÇÃO NO AMBIENTE ESTUARINO: A RESPOSTA DAS ESPÉCIES NATIVAS

É inquestionável que o crescimento populacional nas regiões costeiras está diretamente relacionado ao aumento na descarga de compostos químicos nos habitats aquáticos (HALPERN *et al.*, 2008; BARLETTA E COSTA, 2009; MACIEL *et al.*, 2015; ARIMORO *et al.*, 2021). Um dos ecossistemas mais afetados com o aumento do contingente populacional nas regiões costeiras são os estuários (DACHS E MÉJANELLE, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2019). Este ambiente possui algumas características que estimulam o estabelecimento de grandes centros urbanos em seu entorno, como: a capacidade natural de renovação periódica e sistemática de suas águas sob a influência das marés, a comunicação natural com regiões de manguezais, a abundante comunidade biológica e a facilidade de captação de água doce (BARLETTA E COSTA, 2009). Desta forma, o conhecimento sobre os efeitos que os efluentes produzidos pelas atividades humanas podem causar na biodiversidade do ambiente estuarino é de suma importância, tendo em vista o valor inestimável que ele possui para as comunidades ribeirinhas que dependem da pesca, além da enorme importância ecológica por constituir-se em berçário para inúmeras espécies (BARLETTA E COSTA, 2009; AZEVEDO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; MACIEL *et al.*, 2015; BLABER *et al.*, 2022).

Alguns compostos prejudiciais à saúde deste ambiente e das espécies nativas são relatados na literatura (PINHEIRO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; SHARIF *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2015; NICE, 2022), e dependendo do tempo de exposição e níveis de concentração podem conduzir às mais variadas alterações patofisiológicas, que incluem: perda de gametas devido à morte celular, esterilidade, mortalidade embrionária, inibição de crescimento, anormalidades do desenvolvimento, disfunções enzimáticas, desregulação metabólica, envelhecimento precoce e neoplasias (DEPLEDGE, 1996; BELFIORE E ANDERSON, 2001; PINHEIRO E TOLEDO, 2010; PAIXAO *et al.*, 2011). As espécies que são bioindicadoras da qualidade ambiental tendem a ser mais sensíveis aos efeitos destes compostos (MAI *et al.*, 2012; AMOOZADEH *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2019).

Amoozadeh *et al.* (2014), constataram que as cracas bioacumulam uma maior quantidade de metais quando comparadas com outros organismos estuarinos, sendo os efeitos dessa característica expressos na redução da taxa reprodutiva desses

animais. Paixão *et al.* (2011), observaram que a contaminação das regiões de manguezais está relacionada às anormalidades no desenvolvimento embrionário de espécies de ostras, associando a poluição com a redução dos padrões reprodutivos da espécie. Mai *et al.* (2012), constataram os efeitos de metais pesados e pesticidas na espécie de ostra *Crassostrea gigas* e observaram uma correlação entre os efeitos genotóxicos e anormalidades no desenvolvimento larval.

Estudos realizados por Nudi *et al.* (2007), revelaram uma capacidade peculiar que os caranguejos possuem para metabolizar algumas categorias de poluentes orgânicos, apresentando um baixo fator de bioacumulação de HAPs, refletido na sua facilidade de transformá-los em compostos polares, facilitando a excreção. Em contrapartida, estudos realizados por Pinheiro e Toledo (2010), revelaram mutações provocadas pela exposição a diferentes categorias de metais pesados na espécie de caranguejo *Ucides cordatus*, demonstrando a sua capacidade de acumular compostos inorgânicos. Smalling *et al.* (2013), em trabalho realizado no estuário do rio Santa Maria (Califórnia – USA), constataram que a forte contaminação por pesticidas, está afetando direta e indiretamente as comunidades de peixes estuarinos e migratórios. Os autores observaram que a exposição aos pesticidas está reduzindo drasticamente as comunidades de invertebrados (*Ceriodaphnia dubia* e *Hyalella azteca*) que servem como recurso alimentar para espécies de salmonídeos e peixes estuarinos, alterando o comportamento de forrageamento desses animais. De forma direta, este estudo verificou que a exposição das espécies de peixes a pesticidas, pode provocar o rompimento de neurônios sensoriais, podendo comprometer seu comportamento reprodutivo, alimentar e de defesa.

Inúmeros trabalhos demonstram que a exposição das espécies estuarinas aos compostos químicos orgânicos e inorgânicos, conduz esses animais aos mais variados tipos de alterações que podem comprometer o sucesso reprodutivo e consequentemente ameaçar a rica biodiversidade encontrada neste ambiente (LIMA *et al.*, 2019; BLABER *et al.*, 2022; NICE *et al.*, 2022).

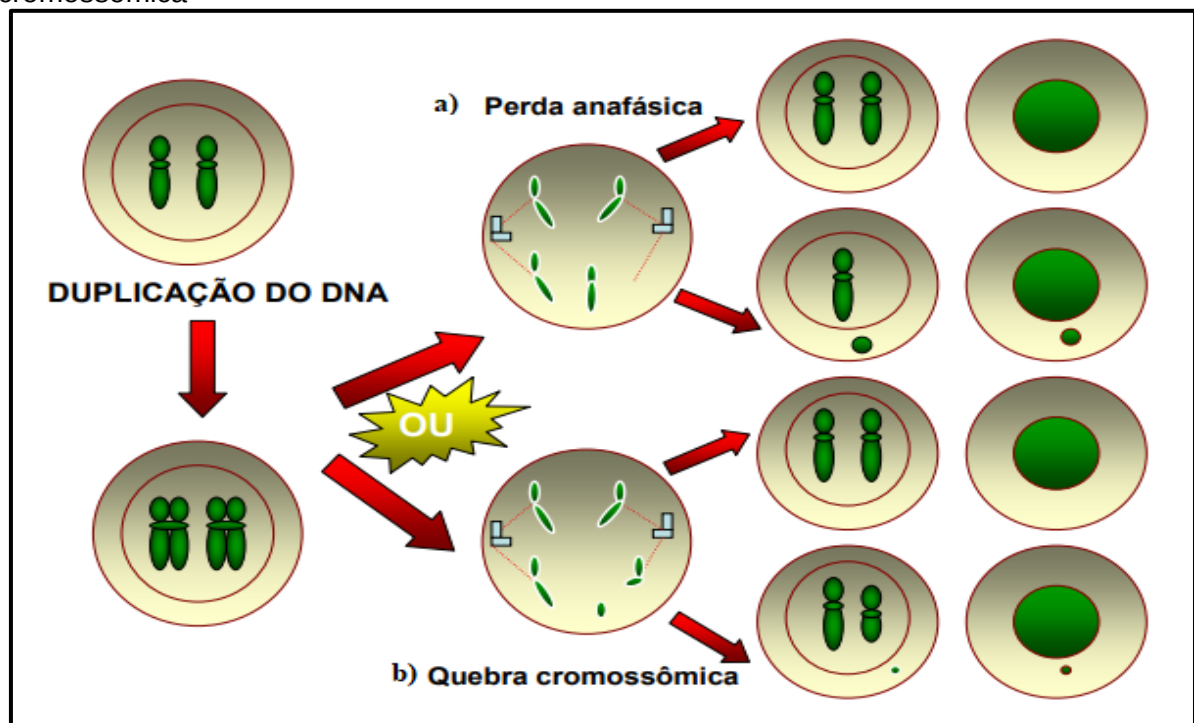
3.5 BIOMARCADORES GENÉTICOS

3.5.1 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) tornou-se um dos métodos mais utilizados para avaliação de alterações cromossômicas estruturais e numéricas (FENECH, 2000). De

modo geral, os micronúcleos podem se originar de regiões cromossômicas (cromossomos acêntricos, fragmentos cromatídicos produzidos por quebra cromossômica e cromossomos inteiros) que se atrasam ou migram irregularmente durante a anáfase (Figura 5) devido a distúrbios do fuso mitótico (NORPPA E FALCK, 2003; PALANIKUMAR E PANNEERSELVAM, 2011). Os micronúcleos são formados no processo de divisão celular e a sua expressão pode ocorrer em diferentes momentos após o evento de danos no DNA, dependendo da cinética do ciclo celular e o mecanismo de indução (BOLOGNESI E HAYASHI, 2011).

Figura 5 - Representação esquemática da formação de micronúcleos como consequência de uma lesão no material genético de uma célula em divisão. (a) Origem de um micronúcleo a partir de um cromossomo inteiro; (b) formação de micronúcleo a partir de uma quebra cromossômica



Fonte: Adaptada de MIRANDA, 2006.

Segundo Bolognesi e Hayashi (2011), em peixes, os micronúcleos podem ser visualizados em vários tipos celulares, embora o uso de eritrócitos do sangue periférico (Figura 6), seja mais amplamente utilizado, pois evita a complexidade dos procedimentos de preparação do material biológico e o sacrifício desses animais, além da alta taxa de divisão celular que esta linhagem possui, o que possibilita o rápido acesso aos efeitos dos agentes genotóxicos.

Figura 6 - Eritrócito micronucleado de peixe sinalizado pela seta vermelha



Fonte: O autor (2019)

3.5.2 Ensaio Cometa

O ensaio cometa (eletroforese em gel de células individuais) é uma técnica que permite a detecção de danos no DNA de células individualizadas (SPEIT E ROTHFUSS, 2012), consistindo em uma metodologia amplamente utilizada no biomonitoramento estratégico de agentes genotóxicos (HARTMANN *et al.*, 2003; AZQUETA E COLLINS, 2013). A crescente utilização dessa metodologia está atrelada às inúmeras vantagens que possui, como pode-se citar: a simplicidade, o rápido desempenho e alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (SPEIT E ROTHFUSS, 2012).

Através dos diferentes padrões de migração em gel de eletroforese, é possível determinar os níveis de danificação do DNA (FAIRBAIRN *et al.*, 1995). Em condições normais, a molécula de DNA encontrar-se fortemente compactada no interior do núcleo das células dos organismos eucariontes, no entanto, possíveis danos causados ao DNA acabam promovendo uma descompactação e ocasionalmente podem ocorrer quebras na estrutura da molécula (ROJAS *et al.*, 1999). Os fragmentos que resultam de tais quebras, acabam migrando de maneira diferenciada no gel em lâmina durante o procedimento de eletroforese. A célula onde o DNA não se encontrar

danificado, terá seu núcleo preservado durante a migração e, portanto, manterá sua forma circular (Figura 7) (OLIVE *et al.*, 1990; COLLINS, 2004).

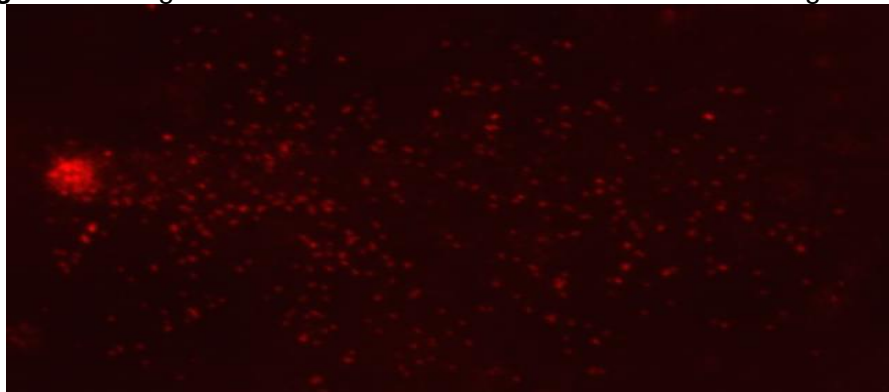
Figura 7 - Imagem de um nucleóide com DNA preservado após corrida eletroforética



Fonte: O autor (2019)

Olive *et al.* (1990), afirmam que ocorrendo um dano muito intenso em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se, então, a figura típica de um cometa (Figura 8).

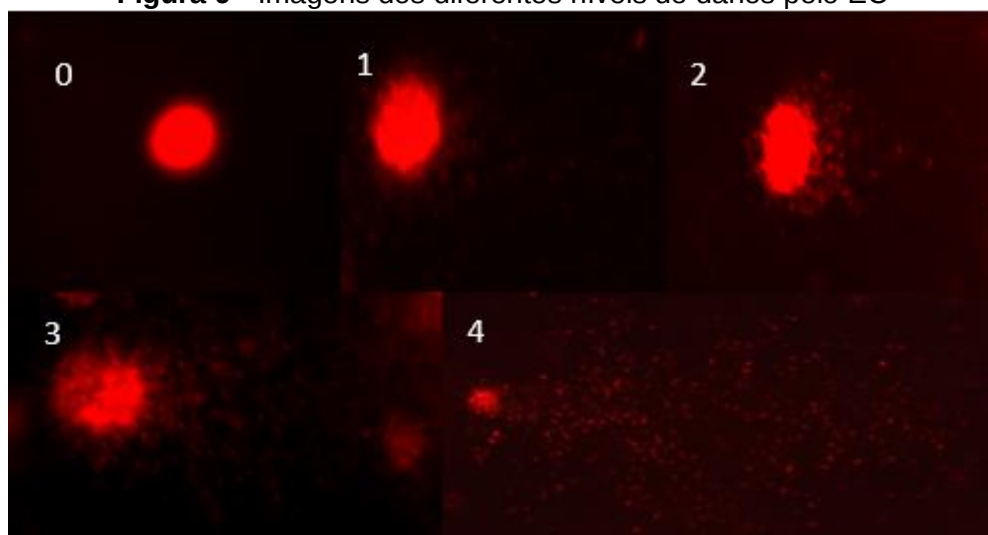
Figura 8 - Imagem de um nucleóide com nível máximo de dano genômico



Fonte: O autor (2019)

Collins (2004), sugeriu que a avaliação de tais danos seja feita levando em consideração o raio do núcleo e a extensão das caudas formadas pelo DNA que migrou durante o procedimento da eletroforese, classificando-os em nível 0 (zero) e sequencialmente até nível 4 (Figura 9), que representa a maior classe de dano.

Figura 9 - Imagens dos diferentes níveis de danos pelo EC



Fonte: O autor (2019)

3.5.3 Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo: Uma comparação

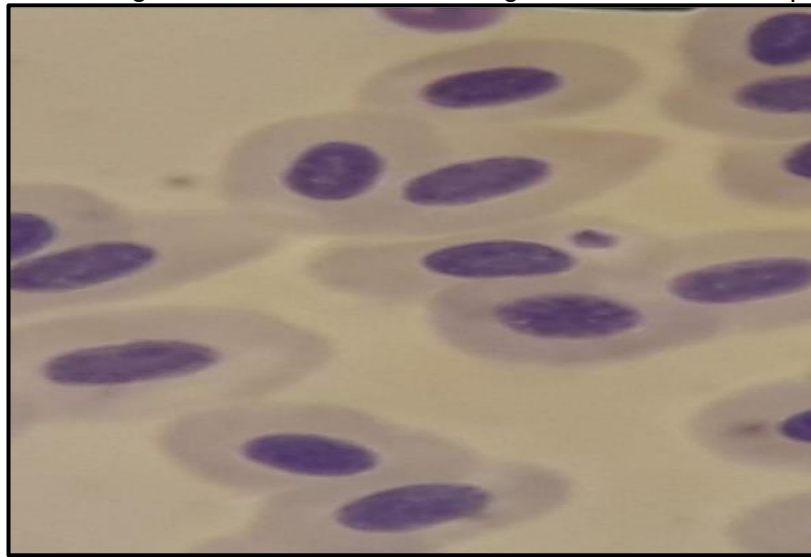
A aplicação de biomarcadores é uma abordagem de extrema importância quando investigamos a relação causal entre a exposição aos poluentes ambientais e a observação dos efeitos a longo prazo em indivíduos e populações (COTELLE E FERARD, 1999).

Nas últimas décadas tem ocorrido um aumento considerável na utilização de métodos genéticos que permitem a obtenção de diagnósticos e realização de monitoramento da qualidade ambiental (DE FLORA *et al.*, 1991; ADAM *et al.*, 2010; AHMED *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2022). O ensaio cometa e o teste do micronúcleo são os métodos mais amplamente empregados para detectar lesões no DNA (SINGH *et al.*, 1988; FENECH, 2000). O impacto genotóxico de produtos químicos sobre a integridade do DNA celular é um dos primeiros eventos nos organismos expostos aos contaminantes (WHITE E RASMUSSEN, 1998; ADAM *et al.*, 2010; BENINCÁ *et al.*, 2011; SPONCHIADO *et al.*, 2011). O dano cromossômico manifestado após a

replicação celular, representa um efeito acumulado, associado com a exposição em longo prazo (SIU *et al.*, 2004).

Na verdade, enquanto o teste do micronúcleo detecta danos irreparáveis, através da formação de núcleos secundários (micronúcleos), o ensaio cometa detecta lesões recentes que podem ser reparadas (COLLINS, 2004; PALANIKUMAR E PANNEERSELVAM, 2011). De maneira geral, podemos dizer que o teste do micronúcleo detecta as macrolesões (Figura 10).

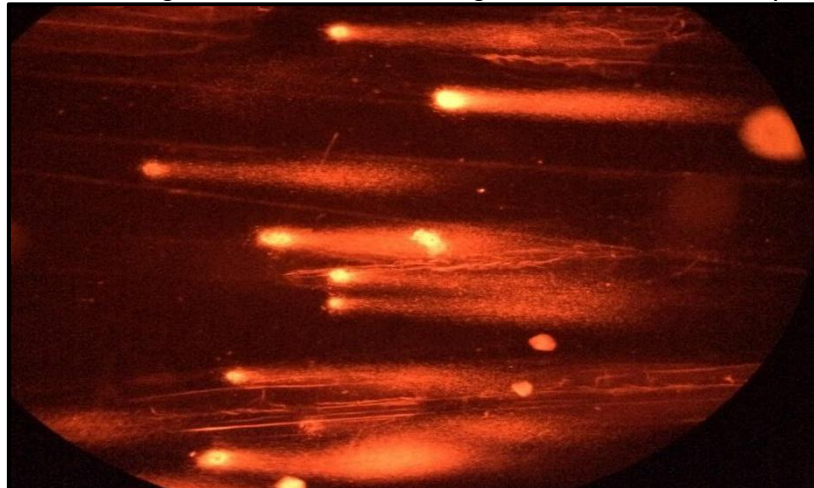
Figura 10 - Imagem de uma macrolesão no genoma, evidenciada pelo MN



Fonte: O autor (2020)

Enquanto o ensaio cometa detecta as microlesões no genoma (Figura 11) (SIU *et al.*, 2004).

Figura 11 - Imagem de microlesões no genoma, evidenciadas pelo EC



Fonte: O autor (2020)

Vários estudos têm sido realizados usando tanto o ensaio cometa quanto o teste do micronúcleo para avaliar o impacto genotóxico dos poluentes ambientais (ADAM *et al.*, 2010; MAI *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2013; MANZANO *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2019). Uma elevada concordância entre os efeitos genotóxicos detectados pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo, foi relatada por diferentes autores para vários organismos (SPONCHIADO *et al.*, 2011; BARSIENTE *et al.*, 2013; SARGSYAN *et al.*, 2019). Entretanto, em alguns casos a maior sensibilidade do ensaio cometa torna possível a essa técnica detectar danos não observados pelo teste do micronúcleo (ARALDI *et al.*, 2015). Masuda *et al.* (2004), encontraram resultados positivos para o ensaio cometa em eritrócitos de peixes injetados com dois corantes mutagênicos, mas não encontraram resultados positivos para micronúcleos no mesmo tipo de célula. Tais achados indicam que diferentes biomarcadores de genotoxicidade possuem níveis de sensibilidade distintos e fornecem resultados que nem sempre são semelhantes.

Em geral, quando se leva em conta informações complementares decorrentes da utilização dessas metodologias, sugere-se que ambas devem ser empregadas simultaneamente, devido as suas capacidades distintas para detectar os diferentes níveis de impacto genotóxico (MOUCHET *et al.*, 2006; AHMED *et al.*, 2011; ARALDI *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2019).

3.6 BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS

3.6.1 Enzimas

As enzimas foram descobertas ainda no século XVIII através dos estudos de digestão de alimentos realizados pelo pesquisador Jons Jakob Berzelius. Ele notou que algumas substâncias apresentavam a capacidade de acelerar as reações químicas. Nos dias atuais sabemos que essas substâncias são as enzimas e elas funcionam como catalizadores biológicos. Esses catalizadores aceleram a velocidade da reação, sendo a maioria de origem proteica, no entanto também existem enzimas cujos precursores são moléculas de RNA (Ribozimas) (ASSIS *et al.*, 2014).

As enzimas apresentam características fundamentais como sua especificidade e eficiência a ponto de catalisar reações com intensidade 100 milhões de vezes mais rápido do que uma reação sem enzima. Elas estão sujeitas a controles celulares e

podem ser classificadas em seis classes de acordo com a reação por elas realizadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação das enzimas de acordo com a reação por elas realizadas

CLASSES DE ENZIMAS		
Classe 1	Oxirredutases	Catalizam reações de oxirredução, transferindo elétrons, hidretos (H-) ou prótons (H+)
Classe 2	Transferases	Transferem grupos químicos entre moléculas
Classe 3	Hidrolases	Utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas
Classe 4	Liasas	Formam ou destroem ligações duplas, retirando ou adicionando grupos funcionais
Classe 5	Isomerases	Transformam uma molécula em seu isômero
Classe 6	Ligases	Formam ligações químicas por reações de condensação, consumindo energia na forma de ATP

Fonte: ORLANDELLI et al., 2012

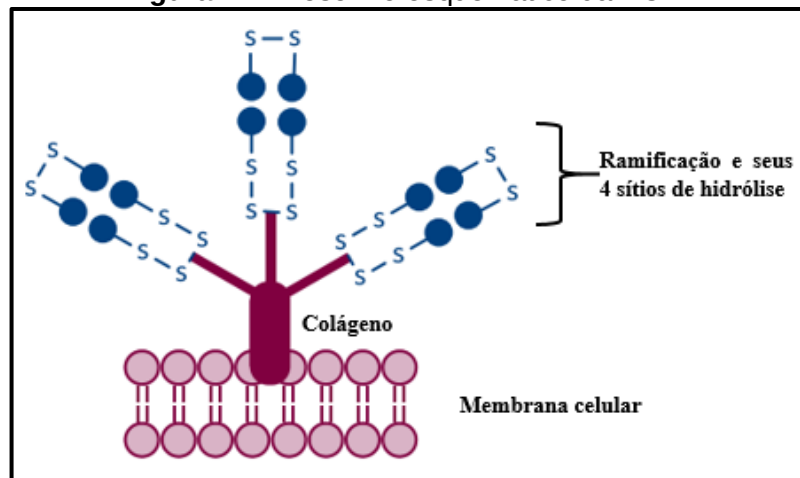
3.6.2 Biomarcadores Neurotóxicos: Enzimas Colinesterases

Duas colinesterases distintas são encontradas nos organismos aquáticos vertebrados e invertebrados, a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8). A AChE é uma enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) presente nas fendas sinápticas durante a transmissão colinérgica. Constitui-se em uma hidrolase que predomina principalmente nos eritrócitos, neurônios, gânglios do sistema nervoso autônomo e placas motoras terminais. A AChE é uma enzima que apresenta três ramificações, ligadas por pontes dissulfeto, sendo fixada à membrana celular por colágeno. Cada ramificação é uma unidade enzimática composta por quatro subunidades proteicas, resultando desta forma, num total de 12 sítios ativos por enzima (Figura 12) (PATRICK, 2009).

As subunidades catalíticas da AChE possuem aminoácidos que são fundamentais para sua atividade. Os resíduos de histidina e serina são importantes para a hidrólise da ACh. Existem também dois pontos essenciais para a interação do neurotransmissor com a enzima. O primeiro é o sítio iônico, onde há uma interação

entre a carga positiva do nitrogênio da ACh e a carga negativa produzida pelo resíduo de aspartato da AChE. O segundo é o sítio esteárico, onde o grupo éster da ACh faz ligação de hidrogênio com o resíduo de tirosina da AChE (BERGMANN *et al.*, 1950; WILSON E BERGMANN, 1950). A hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE depende dos resíduos de histidina, que funciona como um catalisador ácido-base, e de serina, que age como um nucleófilo. Na verdade, a serina por si só é incapaz de hidrolisar um éster, levando a histidina a exercer um papel importante na catálise.

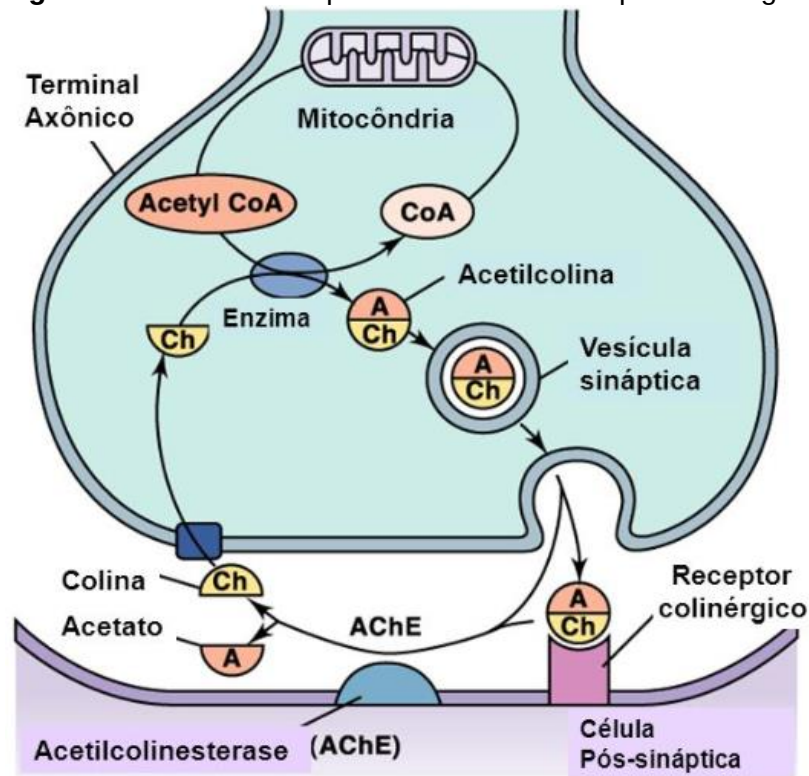
Figura 12 - Desenho esquemático da AChE



Fonte: Adaptado de PATRICK, 2009

Ao promover a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, ocorre a liberação de acetato e colina nas sinapses colinérgicas como ilustrado na Figura 13.

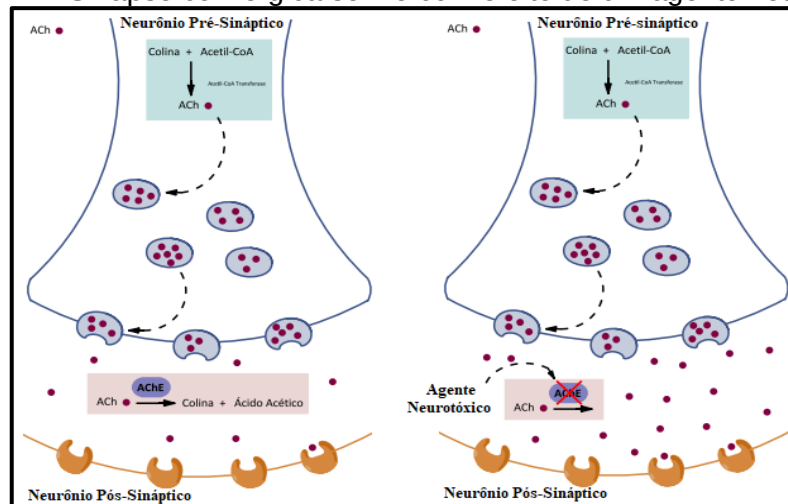
Figura 13 - Desenho esquemático de uma sinapse colinérgica



Fonte: Adaptado de ARAÚJO, 2016

Desta forma, devido à sua função chave no controle da transmissão sináptica, esta enzima se torna um dos alvos moleculares mais vulneráveis à ação de agentes neurotóxicos (Figura 14) e por essa razão seu estudo constituísse em importante instrumento dos programas de monitoramento ambiental, dada a sua sensibilidade (ASSIS *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2016).

Figura 14 - Sinapse colinérgica sem e com efeito de um agente neurotóxico

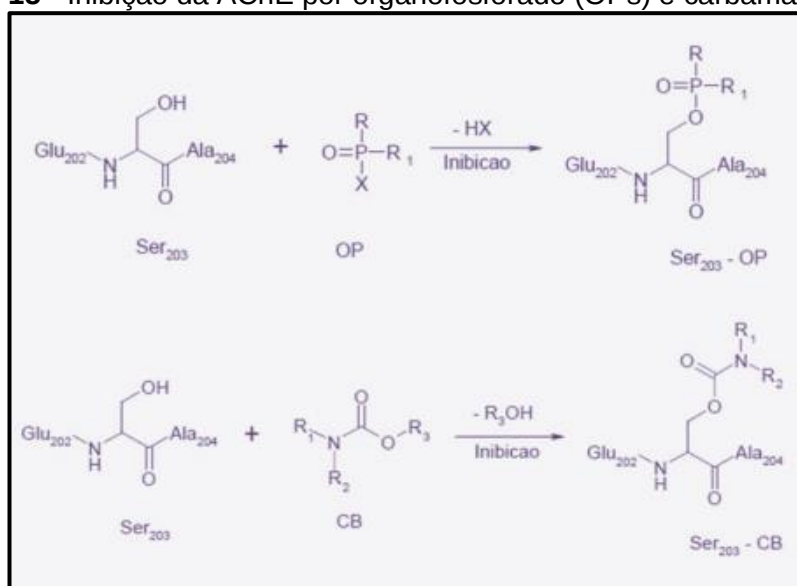


Fonte: Adaptado de ARAÚJO, 2016

Embora sejam evolutivamente semelhantes AChE e BuChE diferenciam-se quanto a sua distribuição nos tecidos, as suas propriedades cinéticas e pela especificidade para com os seus substratos. A AChE encontra-se mais abundantemente no sistema nervoso central, nos músculos esqueléticos e na membrana dos eritrócitos. Enquanto que a BuChE encontra-se, em sua maioria, no plasma sanguíneo sendo por este motivo conhecida também como colinesterase plasmática (MULLER *et al.*, 2002). A BuChE também pode ser observada no fígado, neuróglia, pâncreas e paredes do tubo digestivo. Ela não tem sua função totalmente elucidada e a ausência de sua atividade foi relatada no cérebro de várias espécies de peixes (PEZZEMENTI E CHATONNET, 2010; SILVA *et al.*, 2013).

As enzimas colinesterases (ChEs; EC 3.1.1.x) são amplamente utilizadas no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos como biomarcadores da presença de metais pesados e um grupo específico de pesticidas, tais como carbamatos e organofosforados os quais geralmente apresentam uma baixa persistência a nível ambiental, especialmente quando comparados aos pesticidas organoclorados. Entretanto, essas substâncias agem inibindo a atividade enzimática pela interação com o sítio esterásico por fosforilação no caso dos organofosforados ou carbamilação no caso dos carbamatos (Figura 15) (ASSIS *et al.*, 2011, MATOS, 2012). No que se refere aos metais pesados, a inibição ocorre por meio de ligações com grupamentos tióis proteicos, alterando o estado de hidratação do sítio ativo (MARQUES *et al.*, 2011).

Figura 15 - Inibição da AChE por organofosforado (OPs) e carbamato (CBs)



Fonte: HÖRNBERG *et al.*, 2007; MATOS, 2012

Os OPs se ligam covalentemente ao resíduo catalítico Ser203, impedindo a ligação do substrato e tendendo à irreversibilidade. Os CBs também se ligam ao sítio ativo da enzima, entretanto, o grupo hidroxil do resíduo de serina promove um ataque nucleofílico ao grupo carbonil do CB, resultando em uma ligação que pode ser hidrolisada.

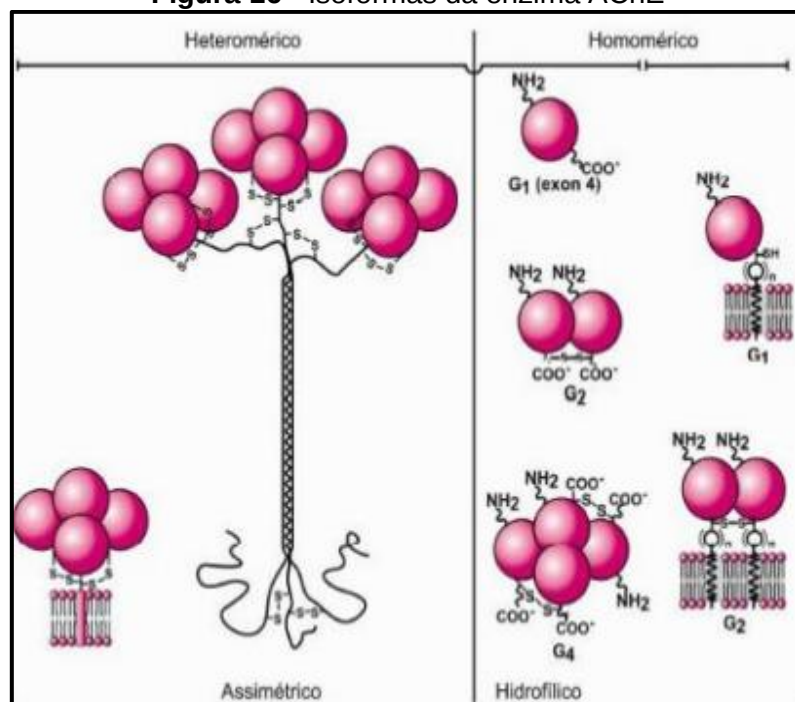
A inibição uma vez iniciada tende a gerar quadros de intoxicação aguda ou crônica, e dependendo do grau de exposição à substância tóxica, o indivíduo pode vir a morrer, pela superestimulação de seu sistema nervoso já que com a inibição da AChE ocorre um acúmulo de acetilcolina nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas (VALBONESI *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2014). Os sinais e sintomas de intoxicação por carbamatos são semelhantes à dos organofosforados diferindo apenas na duração e na intensidade da toxicidade. Os efeitos moderados dos carbamatos comparativamente aos organofosforados 22 devem-se ao fato de inibirem de forma reversível a acetilcolinesterase (hidrólise com regeneração da enzima) e serem rapidamente metabolizados *in vivo* (JEBALI *et al.*, 2013). A ação anticolinesterásica desses pesticidas ocasiona, concomitantemente, a inibição da AChE do tecido nervoso central e periférico e as inibições da AChE eritrocitária e da BChE plasmática (ASSIS *et al.*, 2010).

Segundo dados da Food and Agriculture Organization (2007), uma inibição da atividade colinesterásica a partir de 20% caracteriza a ação de agentes anticolinesterásicos. Após 50% de inibição, sinais clínicos são visualizados e após 90% de inibição, verifica-se a morte do organismo.

O estudo *in vitro* da atividade da acetilcolinesterase de várias espécies de peixes tais como *Colossoma macropomum*, *Cichla ocellaris*, *Prochilodus lineatus*, *Parachromis managuensis*, *Arapaima gigas*, *Rachycentron canadum*, *Oreochromis niloticus* e *Danio rerio* tem sido proposto para serem utilizados na detecção dos efeitos fisiológicos deletérios causados por pesticidas e metais a estes organismos aquáticos (MADUENHO E MARTÍNEZ, 2008; ASSIS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013; DAI *et al.*, 2014; ASSIS *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2016). Estes estudos têm confirmado os peixes como uma fonte prática e economicamente viável de acetilcolinesterase, capazes de tornar rotineiros os procedimentos de biomonitoramento de recursos hídricos, uma vez que esta enzima está disponível de forma abundante principalmente no cérebro, órgão que é descartado juntamente com outras partes não aproveitadas do pescado.

As ChEs são altamente polimórficas tanto interespecífica quanto intraespecificamente com alta variabilidade de formas, podendo apresentar-se como monômeros, dímeros ou tetrâmeros entre as diferentes espécies e diferentes tecidos (Figura 16). Segundo Silman e Sussman (2005), o provável motivo para a acetilcolinesterase apresentar-se em uma série de formas moleculares em um mesmo indivíduo seria o de atender aos diversos tipos de sinapses colinérgicas presentes no tecido nervoso. Portanto torna-se imprescindível caracterizá-la em condições de normalidade nas diversas espécies (ASSIS *et al.*, 2010, HOWCROFT *et al.*, 2011; NIGAM *et al.*, 2012). A AChE existe em duas classes gerais de formas moleculares: como oligômeros homoméricos e como associações heteroméricas. Os oligômeros homoméricos simples aparecem como monômeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4), dando origem assim as formas globulares. As associações heteroméricas resultam nas formas assimétricas (A12)

Figura 16 - Isoformas da enzima AChE



Fonte: Internet. Disponível em http://www.chemistry.emory.edu/ach_inactivation.htm

3.7 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS

3.7.1 A utilização da histologia como ferramenta de monitoramento ambiental

A histologia é uma ferramenta sensível para se diagnosticar efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetem tecidos animais. Por isso é considerada um excelente método de avaliação de bioindicadores de impacto ambiental causado por agentes tóxicos sobre os animais constituintes de uma determinada fauna e, portanto, é utilizada em análises do efeito de xenobióticos sobre bioindicadores (SCHWAIGER *et al.*, 1997; ALBINATI, 2009). No entanto, não é um método específico de determinada contaminação. Isoladamente, a histopatologia gera dados sobre lesões em níveis teciduais não especificando a causa pontual da lesão, ou seja, não diagnostica contaminação, mas sim resposta biológica à agressão, ao estresse. No entanto, quando associados a outros métodos de análises, estudos histológicos podem auxiliar na compreensão profunda de determinadas situações. Para isso, a escolha dos órgãos que serão alvos de estudo é crucial para a relevância dos dados obtidos. Órgãos de contato direto com o agente toxicante, como as brânquias e os órgãos de metabolismo e excreção de xenobióticos – como o fígado, podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos de peixes.

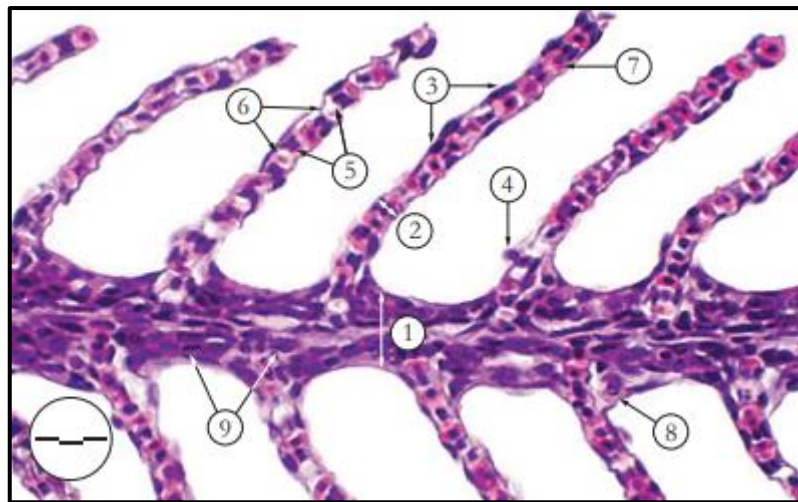
3.7.1.1 Brânquias

As brânquias refletem as condições ambientais dos ecossistemas aquáticos devido ao seu contato direto e permanente com os contaminantes na água (BARISIC *et al.*, 2015). Esses órgãos fornecem uma ampla área superficial para o fluxo de oxigênio, gás carbônico, eletrólitos, água, amônia e íons hidrogênio entre o sangue do peixe e o meio externo (WINKALER *et al.*, 2001), respondendo sensivelmente de forma aguda a contaminantes ambientais, mesmo em baixas concentrações (MONTEIRO *et al.*, 2008).

Castro *et al.* (2018) em um estudo realizado em duas áreas do complexo estuarino de São Marcos no estado do Maranhão (MA) utilizaram possíveis alterações nas brânquias da espécie *Sciades herzbergii* para avaliar a saúde ambiental da região que abriga a segunda maior estrutura portuária para transporte de cargas do Brasil – O porto de Itaqui. Os autores observaram que as alterações branquiais foram mais frequentes na região portuária quando comparadas com as observadas na área

controle. Esses achados indicam que os peixes da região potencialmente contaminada estão apresentando respostas biológicas ao estresse local. Os dados também apoiam outros resultados observados em regiões estuarinas com características similares (SCHLACHER *et al.*, 2007; MAURYA *et al.*, 2019), indicando que a brânquia é um tecido alvo chave em estudos de monitoramento ambiental de ecossistemas aquáticos. A Figura 17 esboça as características das brânquias em condições normais.

Figura 17 - Filamento branquial, corte transversal, H&E. 1) lamela primária; 2) lamela secundária; 3) célula epitelial; 4) célula mucosa; 5) célula pilar; 6) lúmen capilar (lacuna); 7) eritrócitos na luz do capilar; 8) célula de cloreto; 9) células basais



Fonte: YONKOS, 2000

3.7.1.2 Fígado

O fígado é o principal órgão metabólico dos peixes e desempenha um papel importante na absorção, acumulação, biotransformação e excreção de elementos tóxicos (Pedlar *et al.*, 2002).

As alterações do fígado dos peixes têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores histopatológicos (ANGGITASARI *et al.*, 2019; RAJA *et al.*, 2019; MACÊDO *et al.*, 2020), por serem ferramentas eficazes na obtenção de respostas realistas quanto ao estado de toxicidade dos indivíduos expostos aos contaminantes. Desta forma, têm sido realizados estudos, com grande relevância, com base na utilização de biomarcadores para a avaliação do risco ambiental e da saúde humana,

tendo em conta os processos de bioacumulação de diversos contaminantes nas cadeias tróficas (ALI E KHAN 2018; MILLER *et al.*, 2020).

O fígado é uma glândula digestiva composta por parênquima celular (hepatócitos) e por fibras que promovem sua sustentação. A superfície hepática é revestida por uma membrana serosa e o tecido conectivo dessa cápsula penetra no parênquima hepático. Os hepatócitos são células uninucleadas com forma poligonal que possuem importantes funções metabólicas. Também é possível visualizar no fígado vascularização de grande calibre, sinusoides (vasos sanguíneos de pequeno calibre), ductos biliares, tecido pancreático e centro melanomacrófago (HIBIYA, 1982). Os centros de melanomacrófagos são agrupamentos de monócitos contendo melanossomas entre os lisossomas, além de um acúmulo de ceroides e lipofuscina. A literatura sugere que esses melanossomas têm como função a produção de radicais livres utilizados como bactericidas (ROBERTS, 1975).

As principais alterações observadas no fígado de peixes dependem do tempo de exposição, da concentração das substâncias xenobióticas, do grau de toxicidade, da interação entre contaminantes e das condições fisiológicas dos indivíduos (RAJA *et al.*, 2019; MACÊDO *et al.*, 2020).

Azevedo *et al.* (2013) em estudo realizado nos estuários de Santos/São Vicente e Cananéia utilizando a espécie *Cathorops spixi* observaram que os padrões de alterações histológicas mais comuns nas células hepáticas foram as respostas inflamatórias, núcleo picnótico e a necrose, revelando diferenças sazonais significativas nos padrões de alterações entre o inverno e o verão, sendo o período chuvoso aquele associado aos maiores padrões de alterações em ambos os estuários.

Pinheiro-Sousa *et al.* (2021) avaliaram a saúde ambiental de duas regiões da baía de São Marcos – MA utilizando a espécie *Sciades herzbergii* como bioindicadora das condições ambientais. Os autores observaram que a área do complexo estuarino mais associada a região portuária apresentou os maiores níveis de alterações histológicas no fígado, indicando que os compostos intermediários oriundos do metabolismo de vários xenobióticos exercem efeito tóxico nas células hepáticas. O estudo também revelou diferenças significativas nos padrões de alterações histopatológicas entre os invernos de 2018 e 2019, indicando que as maiores precipitações pluviométricas provocadas pelo fenômeno da *la niña* no ano de 2018

diluíram boa parte dos contaminantes e minimizaram os efeitos destes sobre a saúde ambiental e das espécies.

3.8 O TURISMO E AS ÁREAS DE PRESERVAÇÃO AMBIENTAL NO LITORAL DE PERNAMBUCO, PARAÍBA E ALAGOAS

Seguindo as tendências mundiais de exploração turística das regiões costeiras, foi elaborado um plano de ação para o desenvolvimento do turismo no Nordeste do país. Na década de 1990, foram encomendados estudos ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDS) com o objetivo de identificar atividades econômicas com potencial competitivo para a região. A conclusão desses estudos indicou o turismo como atividade econômica estratégica para a região dada as condições favoráveis, por apresentar recursos cênicos e culturais significativos, além de mão-de-obra em abundância e com custos relativamente baixos (CORDEIRO, 2007; SILVA, 2010).

No estado de Pernambuco, a instalação desse plano resultou na criação do Centro Turístico (CT) de Guadalupe, que teve como objetivo a criação de uma região de exploração intensiva do turismo, por meio da concepção de polos turísticos dotados da infraestrutura necessária à implantação de megaprojetos hoteleiros e de lazer, situados na porção litorânea Sul do estado de Pernambuco e Norte do estado de Alagoas (SELVA, 2012).

Uma alternativa de minimizar os conflitos e impactos socioambientais provocados pelos projetos de desenvolvimento turístico da região, impulsionado com a implantação do CT de Guadalupe, foi a criação pelo Governo do Estado de Pernambuco da APA de Guadalupe (APAG), unidade de uso sustentável, situada na porção meridional do Litoral Sul do estado, abrangendo os municípios de Sirinhaém, Rio Formoso, Tamandaré e Barreiros (Figura 18).

A APAG abrange áreas continentais e marinhas, tem alta importância biológica e é considerada como área de conservação prioritária do estado, cujo os objetivos principais são proteger e conservar os sistemas naturais essenciais à biodiversidade, especialmente os recursos hídricos, visando a melhoria da qualidade de vida da população local, a proteção dos ecossistemas e o desenvolvimento sustentável.

Figura 18 - Área de Preservação Ambiental de Guadalupe, litoral sul de Pernambuco

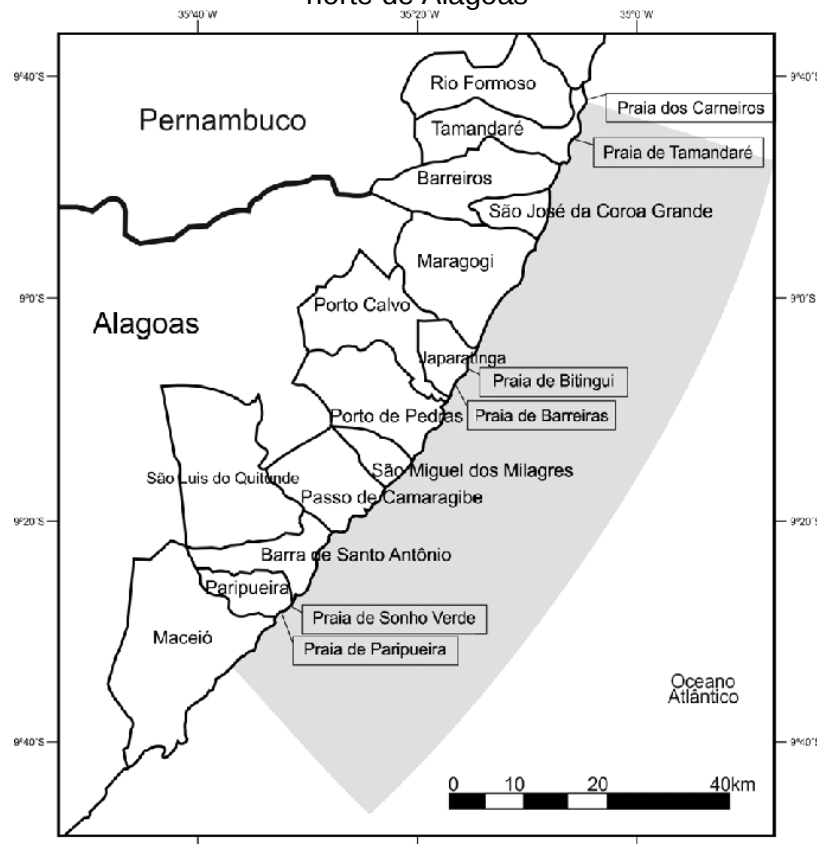


Fonte: Adaptado de SILVA, 2020

Outra APA importante que abrange o litoral dos estados de Pernambuco e Alagoas é a Costa dos Corais – APACC. Localiza-se no litoral sul de Pernambuco e norte de Alagoas, entre os municípios de Tamandaré (PE) e Maceió (AL) (Figura 19) constituindo-se na maior unidade de conservação federal costeira do Brasil. Encontram-se entre os principais objetivos da APACC, a conservação dos recifes de corais; a proteção dos manguezais em toda a sua extensão; bem como, a preservação da população de peixes-boi marinhos, mantendo a integridade do seu habitat (ICMBio/APACC, 2013).

Inserido nesta APA estão os estuários dos rios Tatuamunha e Formoso, localizados nos municípios de Porto de Pedras – AL e Rio Formoso – PE, respectivamente. A UC abrange uma área de mais de 413 mil hectares sendo considerada um imenso berçário da vida marinha, com mais de 185 espécies de peixes registradas e presença de animais ameaçados de extinção como o peixe-boi marinho, o mero e a tartaruga marinha (ICMBio, 2011; ICMBio/APACC, 2013).

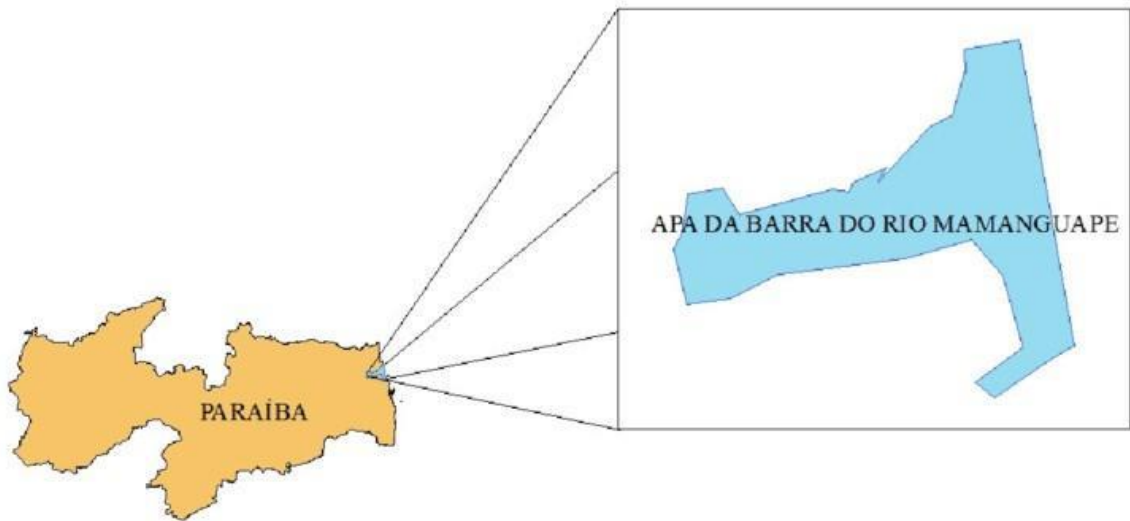
Figura 19 - Área de Preservação Ambiental Costa dos Corais, litoral sul de Pernambuco e norte de Alagoas



Fonte: Adaptado de STEINER et al., 2015

Podemos citar outra importante APA de região costeira do nordeste brasileiro presente no litoral norte da Paraíba, a barra do rio Mamanguape – PB que foi criada pelo decreto nº 924 de 10/09/1993. Dentre os objetivos de criação desta Unidade de Conservação de Uso Sustentável, consta como principal a preservação da maior população existente de peixe-boi-marinho do Nordeste do Brasil. Grande parte de sua área total está inserida no município de Rio Tinto (ALVES E NISHIDA, 2003). É constituída pelo estuário do rio Miriri, representando o limite litorâneo sul e os estuários dos rios Mamanguape e Estivas, representando o limite litorâneo Norte, constituindo desta maneira a maior área preservada de mangue do estado da Paraíba (Figura 20). Os nativos da área encontram-se distribuídos em 18 comunidades tradicionais no interior da APA e em seu entorno. Essas comunidades compõe as cooperativas, associações e colônias de pescadores artesanais (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Figura 20 - Área de proteção Ambiental da Barra do Rio Mamanguape, litoral norte da Paraíba



Fonte: Adaptado de COSTA et al., 2012

A atual gestão da APA vê no ecoturismo e na implantação de um projeto de hospedagens domiciliares uma alternativa sustentável para melhorar a qualidade de vida da comunidade local, entretanto, faz-se necessário uma capacitação da comunidade para melhor compreender a prática do ecoturismo (TEMOTEO *et al.*, 2018).

REFERÊNCIAS

- A WHITE, PAUL; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters¹. Summary of material presented at the workshop Sources, Effects and Potential Hazards of Genotoxic Complex Mixtures in the Environment held at the annual meeting of the Environmental Mutagen Society, April 20, 1997, Minneapolis, MN.1. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, [S.L.], v. 410, n. 3, p. 223-236, jun. 1998. Elsevier BV.
- ADAM, M. L.; et al. Environmental Degradation at a Public Park in Southern Brazil as Revealed Through a Genotoxicity Test (MN) on Peripheral Blood Cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). **Water, Air, & Soil Pollution**, [S.L.], v. 211, n. 1-4, p. 61-68, 10 dez. 2009. Springer Science and Business Media LLC.
- AHMED, M. K.; et al. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. **Chemosphere**, [S.L.], v. 84, n. 1, p. 143-149, jun. 2011. Elsevier BV.
- ALBINATI, A.C.L.; et al. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo roundup em piauçu (*Ieporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 621-627, jun. 2009. FapUNIFESP (SciELO).
- ALI, K.; KHAN, E. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. **Human And Ecological Risk Assessment: An International Journal**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 1353-1376, 23 maio 2018. Informa UK Limited.
- ALMEIDA, S. F.; et al. DNA damage in an estuarine fish inhabiting the vicinity of a major Brazilian port. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.L.], v. 93, n. 2, p. 0--2, 2021. FapUNIFESP (SciELO).
- ALVES, R.R.; NISHIDA, A.K. Aspectos socioeconômicos e percepção ambiental dos catadores de caranguejo-uçá *ucides cordatus cordatus* (L. 1763) (*decapoda, brachyura*) do estuário do rio mamanguape, nordeste do Brasil. **Interciência**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 36-43, 2003.
- AMOOZADEH, E. et al. Marine organisms as heavy metal bioindicators in the Persian Gulf and the Gulf of Oman. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 2386-2395, 18 jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC.
- ANA. **Gestão de Recursos Hídricos no Brasil**: Agência nacional de águas. Brasília: 2012. 2 p.
- ANGGITASARI, L.; SUPRAPTO, H.; NINDARWI, D. Change in Two-Spot Catfish Histopathological Liver (*Mystus nigriceps*) Accumulated with Heavy Metal Cadmium (Cd) in Ketingan Estuary, Sidoarjo - East Java, Indonesia. **Iop Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S.L.], v. 236, p. 1-8, 1 mar. 2019. IOP Publishing.

ARAUJO, C.R.M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: a pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

ARAÚJO, M. C. et al. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): from physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 177, p. 182-189, ago. 2016. Elsevier BV.

ARAÚJO, M. C. et al. Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 205, p. 213-226, 2018.

ARALDI, R.P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 72, p. 74-82, maio 2015. Elsevier BV.

ARIMORO, F.O.; MEME, F.K.; KEKE, U.N. Effects of effluent discharges from a cement factory on the ecology of macroinvertebrates in an Afrotropical river. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 28, n. 38, p. 53444-53457, 24 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC.

ASSIS, C. R. D. et al. Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. **Fish Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 40, n. 6, p. 1659-1668, 2014. Springer Science and Business Media LLC.

ASSIS, C. R. D. et al. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [S.L.], v. 29, n. 10, p. 2243-2248, 24 jul. 2010. Wiley.

ASSIS, C. R. D. et al. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 441, p. 141-150, dez. 2012. Elsevier BV.

ASSIS, C.R.D. et al. Effect of ions on the activity of brain acetylcholinesterase from tropical fish. **J. Coastal Life Medicine**, 3, 505-514, 2015.

AUBRECHT, J.; CABA, E. Gene expression profile analysis: an emerging approach to investigate mechanisms of genotoxicity. **Pharmacogenomics**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 419-428, jul. 2005. Future Medicine Ltd.

AZEVEDO, J.S. et al. Oliveira. Biochemical changes in the liver and gill of *Cathorops spixii* collected seasonally in two Brazilian estuaries under varying influences of anthropogenic activities. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 96, p. 220-230, out. 2013. Elsevier BV.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring dna damage and repair. **Archives Of Toxicology**, [S.L.], v. 87, n. 6, p. 949-968, 18 maio 2013. Springer Science and Business Media LLC.

BARSIENE, J. et al. Environmental genotoxicity and cytotoxicity levels in fish from the North Sea offshore region and Atlantic coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 68, n. 1-2, p. 106-116, mar. 2013. Elsevier BV.

BARIČIĆ, J. et al. Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as an indicator of river pollution. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s. l], v. 118, p. 158-166, 2015.

BARLETTA, M. Living and non-living resources exploitation in a Tropical Semi-arid Estuary. **Journal Of Coastal Research**, [s. l], p. 371-375, 2009.

BEAUGRAND, G.; EDWARDS, M.; LEGENDRE, L. Marine biodiversity, ecosystem functioning, and carbon cycles. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 107, n. 22, p. 10120-10124, 17 maio 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences.

BEAUMONT, N. J. et al. Global ecological, social and economic impacts of marine plastic. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 142, p. 189-195, maio 2019. Elsevier BV.

BELFIORE, N. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, [S.L.], v. 489, n. 2-3, p. 97-122, dez. 2001. Elsevier BV.

BELPAEME, K. et al. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 485-492, 1996. Oxford University Press (OUP).

BENINCÁ, C. et al. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. **Environmental Monitoring And Assessment**, [S.L.], v. 184, n. 4, p. 2045-2056, 15 maio 2011. Springer Science and Business Media LLC.

BERGMANN, F.; WILSON, I.B.; NACHMANSOHN, D. ACETYLCHOLINESTERASE. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 186, n. 2, p. 693-703, out. 1950. Elsevier BV.

BISTODEAU, T. J. et al. Larval exposure to environmentally relevant mixtures of alkylphenolethoxylates reduces reproductive competence in male fathead minnows. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 79, n. 3, p. 268-277, set. 2006. Elsevier BV.

BLABER, S. J.M.; ABLE, K. W.; COWLEY, P. D. Estuarine Fisheries. **Fish And Fisheries In Estuaries**, [S.L.], p. 553-616, 18 fev. 2022. Wiley.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 205-213, 16 dez. 2010. Oxford University Press (OUP).

BURROWS, M. T. et al. The Pace of Shifting Climate in Marine and Terrestrial Ecosystems. **Science**, [S.L.], v. 334, n. 6056, p. 652-655, 3 nov. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

CARMO, C.A. Metais em águas, sedimentos e peixes coletados no estuário de São Vicente-SP, Brasil. **O Mundo da Saúde**, [s. l.], v. 35, p. 64-70, 2011.

CARROLA, J. et al. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries—Portugal. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 21, n. 9, p. 6057-6068, 28 jan. 2014. Springer Science and Business Media LLC.

CASAN. **Relatório da Situação Hídrica do Rio Cubatão do Sul**. Florianópolis: Abastecimento, 2013.

CASTRO, J.S. et al. Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) capturados no Complexo Estuarino de São Marcos, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.L.], v. 70, n. 2, p. 410-418, mar. 2018. FapUNIFESP (SciELO).

CASTRO, M.S. et al. Genotoxic and mutagenic effects of chlorothalonil on the estuarine fish *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823). **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 29, n. 16, p. 23504-23511, 22 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

CHAKRABORTY, S.; SAHA, S.K.; SELIM, S.A. Recreational services in tourism dominated coastal ecosystems: bringing the non-economic values into focus. **Journal Of Outdoor Recreation And Tourism**, [S.L.], v. 30, p. 100-279, jun. 2020. Elsevier BV.

CIMINELLI, V. S. T.. **Os Recursos Hídricos e a Indústria Mineral – uma plataforma para o desenvolvimento nacional sustentável**. Belo Horizonte: Nota Técnica À Academia Bras. Ciências, 2010. 4 p.

COLLINS, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004. Springer Science and Business Media LLC.

CORDEIRO, J.D. Um Estudo sobre a Produção Capitalista do Espaço Turístico e as Perspectivas de Desenvolvimento Local na Praia de Gamela (Sirinhaém/PE). Dissertação de Mestrado em Geografia – Programa de Pós-graduação em Geografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2007.

COTELLE, S.; FRARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 246-255, 1999. Wiley.

CROSETTI, D.; BLABER, S. Biology, Ecology and Culture of Grey Mullet (*Mugilidae*). New York: Crc Press, 2016. 521 p. DEPLEDGE, Michael H. Genetic

ecotoxicology: an overview. **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, [S.L.], v. 200, n. 1-2, p. 57-66, nov. 1996. Elsevier BV.

DACHS, J.; MÉJANELLE, L. Organic Pollutants in Coastal Waters, Sediments, and Biota: a relevant driver for ecosystems during the anthropocene?. **Estuaries And Coasts**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 1-14, jan. 2010.

DEPLEDGE, M.H. Genetic ecotoxicology: an overview. **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, [S.L.], v. 200, n. 1-2, p. 57-66, nov. 1996. Elsevier BV.

DIAS, A. et al. MARIANA, O MAIOR DESASTRE AMBIENTAL DO BRASIL: uma análise do conflito socioambiental. **Planejamento e Gestão Territorial: a sustentabilidade dos ecossistemas urbanos**, [S.L.], p. 455-476, 2018. Ediunec.

EGANHOUSE, R.P; SHERBLOM, P.M. Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on boston harbor. **Marine Environmental Research**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 51-74, fev. 2001. Elsevier BV.

EISENMAN, P. Eisenman Architects: selected and current works. [S.L.]: **The Images Publishing Group**, 1996. 256 p.

EXTERCKOTER, R.K. Diagnóstico da qualidade das relações ambientais estabelecidas no uso da água na bacia hidrográfica do Rio Cubatão do Sul (SC). 2006. 159 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/reviews In Genetic Toxicology**, [S.L.], v. 339, n. 1, p. 37-59, fev. 1995. Elsevier BV.

FALCÃO, C.B.R. et al. Spatial-temporal genome damaging in the blue crab *Cardisoma guanhumi* as ecological indicators for monitoring tropical estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 156, p. 12-32, jul. 2020. Elsevier BV.

FARRAPEIRA, C.M.R. et al. Coliform accumulation in *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) (Cirripedia) and its use as an organic pollution bioindicator in the estuarine area of Recife, Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal Of Biology**, [S.L.], v. 70, n. 2, p. 301-309, maio 2010. FapUNIFESP (SciELO).

FELIPPE, F. Conexões geohistóricas e contemporâneas entre ocupação territorial, degradação ambiental e rarefação hídrica na Bacia do Rio Doce. **Revista Geografias**, [s. l.], p. 203-222, 2016.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [S.L.], v. 455, n. 1-2, p. 81-95, nov. 2000. Elsevier BV.

FEPAM. **Os Recursos Hídricos do Estado do Rio Grande do Sul**. Rio Grande do Sul: Ambiental, 2009.

FERRANTE, M.C. et al. The Pressing Issue of Micro- and Nanoplastic Contamination: profiling the reproductive alterations mediated by oxidative stress. **Antioxidants**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 193, 19 jan. 2022. MDPI AG.

FLORA, S. et al. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutation Research/reviews In Genetic Toxicology**, [S.L.], v. 258, n. 3, p. 285-320, nov. 1991. Elsevier BV.

GARCÍA-GASCA, A. et al. The white mullet (*Mugil curema*) as biological indicator to assess environmental stress in tropical coastal lagoons. **Environmental Monitoring And Assessment**, [S.L.], v. 188, n. 12, p. 1-15, 24 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

GETIRANA, A.; LIBONATI, R.; CATALDI, M. Brazil is in water crisis — it needs a drought plan. **Nature**, [S.L.], v. 600, n. 7888, p. 218-220, 8 dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

GINEBRED, A. et al. Assessment of multi-chemical pollution in aquatic ecosystems using toxic units: compound prioritization, mixture characterization and relationships with biological descriptors. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 468-469, p. 715-723, jan. 2014. Elsevier BV.

HALPERN, B. S. et al. A global map of human impact on marine ecosystems. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 948-952, 2008.

HARTMANN, A. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 45-51, 1 jan. 2003. Oxford University Press (OUP).

HOEGH-GULDBERG, O.; BRUNO, J. F. The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems. **Science**, [S.L.], v. 328, n. 5985, p. 1523-1528, 17 jun. 2010. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Estimativas de população por cidades. Available from: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. Estimativas de população por cidades. Available from: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>.

ICMBio/APACC - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/ APA Costa dos Corais. 2013. Plano de Manejo da Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais. Tamandaré. PE. p. 74. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/apacostadoscorais/>

ICMBio. **Plano de ação nacional para a conservação dos sirênios**: peixe-boi-da-amazônia *Trichechus inunguis* e peixe-boi-marinho *Trichechus manatus*. (Org.). LUNA, F.O.; De ANDRADE, M.C.M.; REIS, M.L. Brasília. Editora ICMBio. 80 p. 2011.

ISLAM, M.S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 48, n. 7-8, p. 624-649, abr. 2004. Elsevier BV.

KARTAL, M.E.; BILDIK, A. Assessment of pollution with biomarkers in fish culture. **Environmental Monitoring And Assessment**, [S.L.], v. 194, n. 2, p. 1-11, 20 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

KENNISH, M.J. Pollution in estuaries and coastal marine waters. **Journal Of Coastal Research**, [s. f], p. 27-49, 1994.

KIM, J.; ATIQUÉ, U.; AN, K.G. Relative Abundance and Invasion Dynamics of Alien Fish Species Linked to Chemical Conditions, Ecosystem Health, Native Fish Assemblage, and Stream Order. **Water**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 158, 12 jan. 2021. MDPI AG.

LACERDA, L.D. et al. Estimating the importance of natural and anthropogenic sources on N and P emission to estuaries along the Ceará State Coast NE Brazil. **Environmental Monitoring And Assessment**, [S.L.], v. 141, n. 1-3, p. 149-164, 18 set. 2007. Springer Science and Business Media LLC.

LEPAGE, M. et al. Estuarine Degradation and Rehabilitation. **Fish And Fisheries In Estuaries**, [S.L.], p. 458-552, 18 fev. 2022. Wiley.

LEWIS, C.; GALLOWAY, T. Reproductive Consequences of Paternal Genotoxin Exposure in Marine Invertebrates. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 928-933, fev. 2009. American Chemical Society (ACS).

LIMA, A.R.B. et al. Genomic damage in *Mugil curema* (Actinopterygii: mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 138, p. 63-69, jan. 2019. Elsevier BV.

LIU, Y. et al. Seasonal Variation and Contamination Risk Assessment of Heavy Metals in Surface Sediment of an Estuary Alluvial Island in Eastern China. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.L.], v. 108, n. 2, p. 337-343, 27 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

MACEDO, A. et al. Immunohistochemical Analysis of P-gp, LC3-II, and Cathepsin-D Associated with Histological Changes in Fish Liver: from the impacted environment to clean water. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [S.L.], v. 63, p. 1-9, 2020. FapUNIFESP (SciELO).

MACIEL, D.C. et al. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 101, n. 1, p. 429-433, dez. 2015. Elsevier BV.

MACLEOD, M. et al. The global threat from plastic pollution. **Science**, [S.L.], v. 373, n. 6550, p. 61-65, 2 jul. 2021. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

MAI, H. et al. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 64, n. 12, p. 2663-2670, dez. 2012. Elsevier BV.

MALTSEVA, A. et al. Effects of natural and anthropogenic stressors on fecundity, developmental abnormalities, and population recruitment in the intertidal gastropod *Littorina saxatilis*. **Estuarine, Coastal And Shelf Science**, [S.L.], v. 271, p. 107853, jul. 2022. Elsevier BV.

MANZANO, B.C. et al. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 1399-1407, 23 ago. 2014. Springer Science and Business Media LLC.

MARKICH, S.J. Dataset of genotoxic and cytotoxic effects on the pygmy mussel, *Xenostrobus securis*, from the highly urbanised Sydney Estuary, Australia: relationships with metal bioaccumulation. **Data In Brief**, [S.L.], v. 30, p. 1-18, jun. 2020. Elsevier BV.

MASUDA, S. et al. Genotoxicity of -[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [S.L.], v. 560, n. 1, p. 33-40, maio 2004. Elsevier BV.

MAURYA, P. et al. Haematological and histological changes in fish *Heteropneustes fossilis* exposed to pesticides from industrial waste water. **Human And Ecological Risk Assessment: An International Journal**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 1251-1278, 11 fev. 2019. Informa UK Limited.

MILLER, M. E. et al. Bioaccumulation and biomagnification of microplastics in marine organisms: a review and meta-analysis of current data. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 10, p. 1-10, 16 out. 2020. Public Library of Science (PLoS)..

MIRANDA, MA.S.P.. **Micronúcleos e outras alterações nucleares: um teste de predição para o câncer bucal**. 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/1882>. Acesso em: 01 fev. 2006.

MOHAMED, A.R.M. et al. Ecological and biological aspects of fish assemblage in the Chybayish marsh, Southern Iraq. **Ecohydrology & Hydrobiology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 65-74, jan. 2012. Elsevier BV.

MOUCHET, F. et al. Comparative evaluation of genotoxicity of captan in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the

micronucleus test. **Environmental Toxicology**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 264-277, 2006. Wiley.

MUSRRI, C. A. et al. Environmental Genotoxicity Assessment Using Micronucleus (and Nuclear Abnormalities) Test on Intertidal Mussel *Perumytilus purpuratus*: a tool for biomonitoring the Chilean coast. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.L.], v. 107, n. 1, p. 77-83, 17 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

MÜLLER, T.C. et al. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Basis Of Disease**, [S.L.], v. 1587, n. 1, p. 92-98, maio 2002. Elsevier BV.

NAEEM, S. et al.. Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. **Nature**, [S.L.], v. 368, n. 6473, p. 734-737, abr. 1994. Springer Science and Business Media LLC.

NICE, H.E. The application of sediment quality guidelines and toxicity assessment to identify contaminant hotspots in an urbanised West Australian estuary. **Environmental Monitoring And Assessment**, [S.L.], v. 194, n. 5, p. 1-22, 19 abr. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

NORPPA, H. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 221-233, 1 maio 2003. Oxford University Press (OUP).

NUDI, A.A.H. et al. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. **Environment International**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 315-327, abr. 2007. Elsevier BV.

OLIVE, P.L. et al. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the. **Radiation Research**, [S.L.], v. 122, n. 1, p. 86-94, abr. 1990. JSTOR.

ORLANDELLI, R.C. et al. ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **Revista de Saúde e Biologia**, [s. /], v. 3, n. 7, p. 1-12, 2012.

PAIXÃO, J.F. et al. Integrated assessment of mangrove sediments in the Camamu Bay (Bahia, Brazil). **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 74, n. 3, p. 403-415, mar. 2011. Elsevier BV.

PALANIKUMAR, L.; PANNEERSELVAM, N.. Micronuclei assay: a potential biomonitoring protocol in occupational exposure studies. **Russian Journal Of Genetics**, [S.L.], v. 47, n. 9, p. 1033-1038, set. 2011. Pleiades Publishing Ltd.

PASSOS, T. et al. Mangrove carbon and nutrient accumulation shifts driven by rapid development in a tropical estuarine system, northeast Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 166, p. 112219, maio 2021. Elsevier BV.

PATIRE, V.F.. **Avaliação da biodisponibilidade dos HAPs em Mugil curema do estuário de Santos e de Cananéia através**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Oceanografia, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PATRICK, G.L. **An introduction to medicinal chemistry**. 4. ed. Oxford: Online Resource Centre, 2009.

PEDLAR, R. Toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 57, n. 3, p. 167-189, maio 2002. Elsevier BV.

PEREIRA, M.A.F. et al. Importância do monitoramento e disponibilização de dados hidrológicos para a gestão integrada dos recursos hídricos. **Sociedade & Natureza**, [S.L.], v. 32, p. 308-320, 6 maio 2020. EDUFU - Editora da Universidade Federal de Uberlândia.

PETRY, A. C.; SCHULZ, U. H. Longitudinal changes and indicator species of the fish fauna in the subtropical Sinos River, Brazil. **Journal Of Fish Biology**, [S.L.], v. 69, n. 1, p. 272-290, jul. 2006. Wiley.

PINHEIRO, M. A. A. et al. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern brazil. **Environmental Monitoring And Assessment**, [S.L.], v. 185, n. 10, p. 8273-8285, 13 abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

PINHEIRO, M.A.A.; TOLEDO, T.R. Malformation in the crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)(Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), in São Vicente (SP), Brazil. **Revista Cepsul: Biodiversidade e Conservação Marinha**, [S.L.], v. 1, p. 61-65, 2010.

PINHEIRO-SOUSA, D.B. et al. Sediment contaminant levels and multibiomarker approach to assess the health of catfish *Sciades herzbergii* in a harbor from the northern Brazilian Amazon. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 208, p. 111540-9, jan. 2021. Elsevier BV.

PRAGNYA, M. et al. Bioaccumulation of heavy metals in different trophic levels of aquatic ecosystems with fish as a bioindicator in Visakhapatnam, India. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 165, p. 112162, abr. 2021. Elsevier BV.

RAGUGNETTI, M. et al. Ibuprofen Genotoxicity in Aquatic Environment: an experimental model using *oreochromis niloticus*. **Water, Air, & Soil Pollution**, [S.L.], v. 218, n. 1-4, p. 361-364, 24 nov. 2010. Springer Science and Business Media LLC.

RAJA, U.K.S. et al. Mass mortality of fish and water quality assessment in the tropical Adyar estuary, South India. **Environmental Monitoring And Assessment**, [S.L.], v. 191, n. 8, p. 1-10, 25 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

RIBEIRO, C.A.O. et al. Biomarkers Responses in Fish (*Atherinella brasiliensis*) of Paranaguá Bay, Southern Brazil, for Assessment of Pollutant Effects. **Brazilian Journal Of Oceanography**, [S. l.], v. 61, p. 1-11, 2013.

ROCHA, T.L. et al. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**, [S.L.], v. 101, p. 29-37, out. 2014. Elsevier BV.

ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal Of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, [S.L.], v. 722, n. 1-2, p. 225-254, fev. 1999. Elsevier BV.

SANOU, A. et al. Assessment of heavy metal contamination of fish from a fish farm by bioconcentration and bioaccumulation factors. **Egyptian Journal Of Aquatic Biology And Fisheries**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 821-841, 1 jan. 2021. Egypt's Presidential Specialized Council for Education and Scientific Research.

SANTOS, P.E. et al. Mutagenicity of blue rayon extracts of fish bile as a biomarker in a field study. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 173-179, 2009. Wiley.

SAOCA, C. et al. Seasonal Biodistribution of Some Trace Elements (Cd, Pb, Cr, Hg) and "Blood Biomarkers" Response in *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). **Biological Trace Element Research**, [S.L.], p. 1-9, 4 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC.

SARGSYAN, A. et al. Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in *Darevskia* lizards as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution. **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [S.L.], v. 842, p. 117-124, jun. 2019. Elsevier BV.

SARKAR, A. et al. Genotoxicity of cadmium chloride in the marine gastropod *Nerita chamaeleon* using comet assay and alkaline unwinding assay. **Environmental Toxicology**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 177-187, 27 jun. 2013. Wiley.

SAX, D.F.; GAINES, S.D. Species diversity: from global decreases to local increases. **Trends In Ecology & Evolution**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 561-566, nov. 2003. Elsevier BV.

SCHLACHER, T.A.; MONDON, J.A.; CONNOLLY, R.M. Estuarine fish health assessment: evidence of wastewater impacts based on nitrogen isotopes and histopathology. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 54, n. 11, p. 1762-1776, nov. 2007. Elsevier BV.

SCHWAIGER, J. et al. O uso de indicadores histopatológicos para avaliar o estresse relacionado a contaminantes em peixes. **Journal Of Aquatic Ecosystem Stress And Recovery**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997. Springer Science and Business Media LLC.

SELVA, V.S.F. Contributo à governança no ordenamento do turismo em ambientes insulares. **Anais do XIII do Encontro Nacional de Turismo de Base Local**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2014.

SHARIF, A. et al. Fate of mercury species in the coastal plume of the Adour River estuary (Bay of Biscay, SW France). **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 496, p. 701-713, out. 2014. Elsevier BV.

SILVA, H.K.P.. **Avaliação das concentrações de metais-traço e suas interações nos sedimentos e biota do parque dos manguezais, região metropolitana do recife (RMR) Pernambuco, Brasil**. 2010. 150 f. Tese (Doutorado) - Curso de Oceanografia, Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVA, L.M.B. **TURISMO NA ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DE GUADALUPE, PERNAMBUCO – BRASIL: uma análise da efetividade de gestão**. 2020. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, [S.L.], v. 175, n. 1, p. 184-191, mar. 1988. Elsevier BV.

SIU, W.H.L. et al. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 66, n. 4, p. 381-392, mar. 2004. Elsevier BV.

SMALLING, K.L. et al. Environmental fate of fungicides and other current-use pesticides in a central California estuary. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 144-153, ago. 2013. Elsevier BV.

SORTE, C.J.B. et al. Marine range shifts and species introductions: comparative spread rates and community impacts. **Global Ecology And Biogeography**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 303-316, 15 mar. 2010. Wiley.

SOUSA, R.S. et al. Connections among Land Use, Water Quality, Biodiversity of Aquatic Invertebrates, and Fish Behavior in Amazon Rivers. **Toxics**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 182, 7 abr. 2022. MDPI AG.

SOUZA, I.C. et al. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 180, p. 136-144, set. 2013. Elsevier BV.

SOUZA, M.R.R. et al. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in three environmental components from a tropical estuary in Northeast Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 171, p. 112726, out. 2021. Elsevier BV.

SPEIT, G.; ROTHFUSS, A. The Comet Assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of dna damage and repair. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 79-90, 2012. Humana Press.

SPONCHIADO, G. et al. Genotoxic Effects in Erythrocytes of *Oreochromis niloticus* Exposed to Nanograms-per-Liter Concentration of 17 β -Estradiol (E2): an assessment using micronucleus test and comet assay. **Water, Air, & Soil Pollution**, [S.L.], v. 218, n. 1-4, p. 353-360, 12 out. 2010. Springer Science and Business Media LLC.

STACHOWICZ, J.J. et al. Nonlinear partial differential equations and applications: linking climate change and biological invasions. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 99, n. 24, p. 15497-15500, 6 nov. 2002. Proceedings of the National Academy of Sciences.

STEINER, A.Q. et al. Zonação de recifes emersos da Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais, Nordeste do Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, [S.L.], v. 105, n. 2, p. 184-192, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

SUN, R.X. et al. Legacy and emerging halogenated organic pollutants in marine organisms from the Pearl River Estuary, South China. **Chemosphere**, [S.L.], v. 139, p. 565-571, nov. 2015. Elsevier BV.

SUN, S. et al. The toxic impacts of microplastics (MPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on haematic parameters in a marine bivalve species and their potential mechanisms of action. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 783, p. 147003, ago. 2021. Elsevier BV.

TEMOTEO, J.A.G.; BRANDÃO, J.M.F.; CRISPIM, M.C.. Turismo e Sustentabilidade em Unidades de Conservação: um estudo sobre as alternativas de emprego e renda na área de proteção ambiental da barra do rio mamanguape-pb. **Revista de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 43-61, 22 mar. 2018. University Nove de Julho.

TILMAN, D. et al. Habitat destruction and the extinction debt. **Nature**, [S.L.], v. 371, n. 6492, p. 65-66, set. 1994. Springer Science and Business Media LLC.

TOMASONI, M.A.; PINTO, J.E.S.; SILVA, H.P. A questão dos recursos hídricos e as perspectivas para o Brasil. **Geotextos**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 107-127, 22 jan. 2010. Universidade Federal da Bahia.

TUCCI, C.E.M. Águas urbanas. **Estudos Avançados**, [S.L.], v. 22, n. 63, p. 97-112, 2008. FapUNIFESP (SciELO).

TUCCI, C.E.M.; MENDES, A.C. Avaliação ambiental integrada de bacia hidrográfica. Brasília: **Pnud**, 2006. 311 p.

TUNDISI, J.G. RECURSOS HÍDRICOS NO BRASIL: problemas, desafios e estratégias para o futuro. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**, 2014. 76 p.

VALENÇA, A.P.C. As comunidades macrobentônicas na avaliação da qualidade ambiental de áreas estuarinas de Pernambuco. 2009. 86 f. **Dissertação (Mestrado)**

- **Curso de Oceanografia**, Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

VITÓRIO, U.S.R. Rotíferos (Rotatoria) como indicadores da qualidade ambiental da Bacia do Pina, Recife (PE/Brasil). 2006. 87 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Oceanografia, Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

VOLLRATH, S.R. et al. Trophic niches and diet shifts of juvenile mullet species coexisting in marine and estuarine habitats. **Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom**, [S.L.], v. 101, n. 2, p. 431-441, mar. 2021. Cambridge University Press (CUP).

VÖRÖSMARTY, C.J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, [S.L.], v. 467, n. 7315, p. 555-561, 29 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC.

WADE, M. et al. Risk Assessment of Water Quantity and Quality Stressors to Balance the Use and Protection of Vulnerable Water Resources. **Integrated Environmental Assessment And Management**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 110-130, 3 dez. 2020. Wiley.

WHITFIELD, A.K. et al. Paradigms in estuarine ecology – A review of the Remane diagram with a suggested revised model for estuaries. **Estuarine, Coastal And Shelf Science**, [S.L.], v. 97, p. 78-90, jan. 2012. Elsevier BV.

WILSON, I.B.; BERGMANN, F. ACETYLCHOLINESTERASE. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 186, n. 2, p. 683-692, out. 1950. Elsevier BV.

WINKALER, E.U. et al. Histological and physiological biomarkers to assess fish health in Londrina streams, state of Paraná / Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Sci. Biol. Sci.**, [s. /], v. 23, p. 507-514, 2001.

YONKOS, L.T. et al. **Atlas of fathead minnow normal histology**. Maryland: University Of Maryland, 2000.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigos.

4.1 ARTIGO 1

Perfil de dano genômico espaço-temporal em *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae), em estuários com diferentes padrões de integridade ambiental no Nordeste do Brasil

Anderson Rodrigues Balbino de Lima* ^{1, 2,4}, Demetrios Lucas da Silva ², Bruna Maria do Nascimento ², Marcelo Antonio Amaro Pinheiro ³, Ranilson de Souza Bezerra ⁴ & Mônica Lúcia Adam ²

1. Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Pernambuco, Brazil.
2. Centro de Biociências, Departamento de Zoologia, Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.
3. Laboratório de Biologia da Conservação de Crustáceos, Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais (DCBA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências (IB), Campus do Litoral Paulista (CLP). Pç. Infante Dom Henrique, s/n, São Vicente, São Paulo, Brazil.
4. Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

*Autor correspondente: Email: anderson_rodrigues.184@hotmail.com

Resumo

A ocupação das regiões costeiras no Brasil ainda tem ocorrido de forma desordenada, com várias irregularidades quanto à utilização dos recursos hídricos e biológicos. Na região nordeste, as grandes metrópoles localizam-se próximas ao litoral, sendo as atividades industriais, turísticas e agropecuárias as principais causadoras da contaminação dos corpos d'água, em especial o lançamento de efluentes sem tratamento. Alguns métodos que avaliam o material genético dos organismos expostos têm sido eficazes na indicação de condições ambientais adversas, favorecendo práticas de monitoramento que propiciam um panorama fidedigno da qualidade ambiental. O presente estudo avaliou possíveis danos genéticos na tainha (*Mugil curema*), um dos recursos pesqueiros mais consumidos e comercializados no nordeste brasileiro, como ferramenta para o monitoramento da qualidade ambiental dos principais sistemas estuarinos nessa região. Eritrócitos de *M. curema* foram analisados para verificar a presença de micronúcleos (macrolesões) e diferenciais em corrida eletroforética de DNA (microlesões). As comparações estatísticas entre os dados do inverno/verão de 2019 e 2020 revelaram níveis de danos genômicos (micro e macrolesões) consideravelmente maiores do que os encontrados no grupo controle ($p < 0,05$), especialmente nos estuários inseridos nas regiões metropolitanas. Quando comparados ao controle, os estuários inseridos nas APAs apresentaram elevados níveis de microlesões, no entanto não diferiram estatisticamente quanto as macrolesões ($p > 0,05$). Tal evidência indica um elevado grau de degradação ambiental dos sistemas estuarinos avaliados, sugerindo a necessidade de ações de gerenciamento e mitigação nessas áreas.

Palavras-chave: Ensaio cometa. Macrolesões. Microlesões. Micronúcleo. Sistemas estuarinos. Tainha.

INTRODUÇÃO

É comum que o desenvolvimento industrial e urbano estejam associados às áreas com recursos hídricos abundantes, o que têm elevado a introdução de diversos compostos químicos que são prejudiciais à saúde ambiental e da biodiversidade aquática. Tais impactos comprometem o equilíbrio ecológico e podem causar prejuízos às comunidades ribeirinhas tradicionais, que dependem da pesca como seu principal meio de subsistência (AMORIM, 2003; AZEVEDO *et al.*, 2013; GHISI *et al.*, 2014) e podem ter sua saúde afetada (ABESSA *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2012).

Em nível mundial, é confirmada uma tendência do homem se estabelecer principalmente junto às áreas costeiras, especialmente naquelas associadas a grandes rios, sistemas estuarinos e próximos a sua interface com o mar. Isso se deve, em grande parte, a necessidade de escoamento da produção agropecuária e industrial a partir de portos que se estabelecem nessas áreas. A costa sudoeste de Taiwan, por exemplo, abriga cerca de 8 milhões de pessoas, onde estudos recentes revelam efeitos adversos na qualidade hídrica, causados por contaminantes advindos da descarga de efluentes domésticos e industriais (JIANG *et al.*, 2014). Tal situação se repete em regiões costeiras de outros países da Ásia, Europa e Américas (HERNÁNDEZ-TERRONES *et al.*, 2015; SPITERI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

No Brasil, grande parte das regiões metropolitanas com elevado adensamento humano estão associadas à sistemas estuarinos, fato que caracteriza as principais capitais da região do Nordeste do país (IBGE, 2020). Tal elevada densidade demográfica tem potencializado a descarga de efluentes, promovendo redução da qualidade dos recursos hídricos próximos a estas áreas (BARLETTA E COSTA, 2009; SOUZA *et al.*, 2013). Como exemplos estão os estados de Pernambuco, Paraíba e Alagoas, que totalizam 56 municípios costeiros, distribuídos numa faixa litorânea de 549 Km, onde vivem a metade da população desses estados (IBGE, 2020). Essa expressiva agregação humana certamente acompanha o nível de perturbação imposta aos estuários dessa região, uma vez que todos os contaminantes produzidos são liberados nos rios ou diretamente no oceano.

Os sistemas estuarinos são relevantes hotspots de diversidade biológica, uma vez que grande parte das espécies de moluscos, crustáceos e peixes ali permanecem durante parte ou todo seu ciclo vital neste ecossistema. Estes organismos estão sujeitos a diversos contaminantes, entre eles os metais, hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs) e pesticidas (p. ex., carbamatos e organofosforados), que têm sido amplamente liberados em sistemas estuarinos (BIANCHI *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2013; MACIEL *et al.*, 2015; MANZANO *et al.*, 2015). Tais compostos podem promover conhecida propriedade genotóxica à esses organismos, ocasionando danos ao seu material genético (DE FLORA *et al.*, 1991; TSANGARIS *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2013), o que evidencia a relevância de estudos de monitoramento para este fim. Assim, a avaliação da saúde ambiental possibilita favorecer a conservação da biodiversidade local, fato que vem sendo efetuado com o uso de biomarcadores que quantifiquem danos genéticos causados pelos contaminantes já citados (OHE *et al.*, 2004; ADAM *et al.*, 2010; BOLOGNESI E HAYASHI, 2011; GUSSO-CHOUERI *et al.*, 2015; CATANHEDE *et al.*, 2016). Neste sentido, o estabelecimento de programas de monitoramento e diagnóstico da qualidade ambiental são ferramentas imprescindíveis para este fim (BENINCÁ *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012; AZEVEDO *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2013).

Métodos rápidos e precisos têm sido eficientes nestes diagnósticos, como é o caso do Ensaio Cometa (EC), que detecta quebras na molécula de DNA (SINGH *et al.*, 1988) e a quantificação de células com micronúcleos (MN), os quais são indicadores sensíveis a danos cromossômicos (BOLOGNESI E HAYASHI, 2011). Estes métodos já provaram sua eficácia quando aplicados em diferentes organismos aquáticos, como peixes (ADAM *et al.*, 2010; RAGUGNETTI *et al.*, 2011; SPONCHIADO *et al.*, 2011; BARSIENTE *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2019), crustáceos (PINHEIRO *et al.*, 2013) e moluscos (ROCHA *et al.*, 2014).

Espécies de tainhas (gênero *Mugil*) são exímias sentinelas já empregadas em diagnósticos de saúde de ambientes costeiros (HAUZER-DAVIS *et al.*, 2016), tendo em vista frequentarem os sistemas estuarinos, incluindo fazendo incursões nos bosques de manguezal por ocasião das marés altas. Em geral os mugilídeos representam boa parte do pescado consumido mundo afora, com sua pesca artesanal constituindo uma das principais atividades desenvolvidas pelas comunidades ribeirinhas no Nordeste do Brasil (ARAÚJO E SILVA, 2013). Em especial, *M. curema* é um dos recursos pesqueiros mais consumidos pelas comunidades brasileiras (ISAAC *et al.*, 2006), seja como alimento ou para a geração de renda, totalizando mais de 18 mil toneladas de pescado ao ano (PESCA, 2011). Além disso, espécimes < 16 cm de comprimento total têm sido capturados para servirem como isca para outras pescarias (DITTY E SHAW, 1996; IBÁÑEZ E GUTIÉRREZ-BENÍTEZ, 2004).

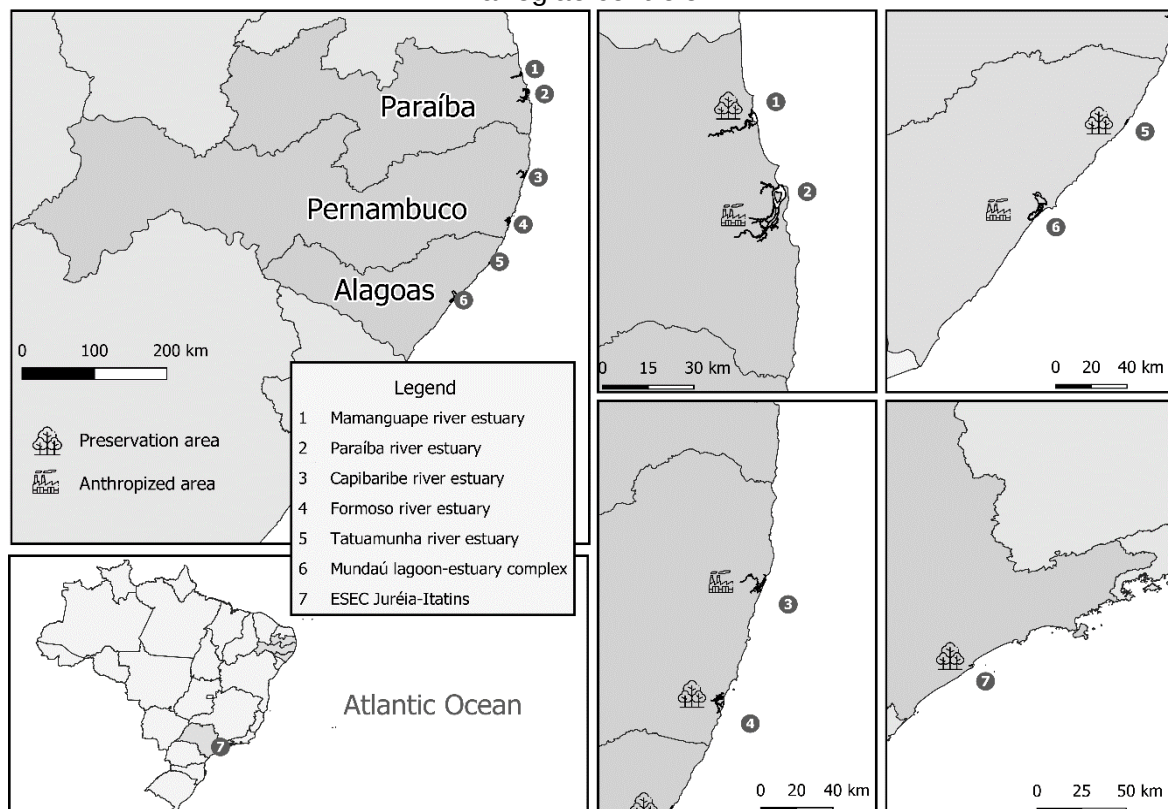
Considerando a expressiva perturbação dos ambientes aquáticos costeiros, a importância pesqueira de *M. curema* e seu potencial como sentinela para diagnósticos ambientais, o presente estudo avaliou a ocorrência de possíveis danos genômicos com vistas à quantificação da perturbação antropogênica em sistemas estuarinos do Nordeste do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e local da amostragem

Foram amostrados 214 espécimes de *M. curema*, durante dois ciclos climáticos consecutivos (2019 e 2020), em duas estações climáticas (verão e inverno), considerando seis sistemas estuarinos localizados em três estados da Região Nordeste do Brasil (Paraíba, PB; Pernambuco, PE e Alagoas, AL) (Figura 1).

Figura 1 – Mapa da costa brasileira, indicando a localização dos estuários avaliados e a região controle.



Fonte: O autor (2022)

A seleção dos estuários foi estabelecida segundo diferentes níveis de conservação, utilizando dados de monitoramentos sistemáticos de qualidade da água nas bacias hidrográficas que formam cada sistema estuarino (vide Resolução

CONAMA nº 357/2005 - CONAMA, 2012), realizadas pela Superintendência do Meio Ambiente da Paraíba (SUDEMA), pela Agência Estadual do Meio Ambiente de Pernambuco (CPRH) e pelo Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA). Assim, cada estado foi representado por dois sistemas estuarinos, sendo um deles em área metropolitana (maior adensamento humano, antropização e menor qualidade de água) e outro dentro de uma unidade de conservação federal, que visa manter a proteção da qualidade ambiental e da biodiversidade local (SNUC - Lei nº 9.985/2000 – veja Brasil, 2000 e MATTAR *et al.* 2018).

Os sistemas estuarinos metropolitanos foram representados por Rio Paraíba (PAR), Rio Capibaribe (CAP) e Complexo Estuarino-Lagunar Mundaú (MUN), enquanto os demais estão nas Áreas de Proteção Ambiental (APAs) do Rio Mamanguape (MAM), na APA da Barra do Mamanguape; Rio Formoso (FOR), nas APAs de Guadalupe / Costa dos Corais; e Rio Tatuamunha (TAT), na APA da Costa dos Corais. Exemplares de *M. curema* também foram capturados no estuário do Rio Una (JUR - Estação Ecológica da Juréia-Itatins), uma área de proteção ambiental do Estado de São Paulo, Região Sudeste do Brasil, os quais foram analisados e utilizados para fins comparativos, conforme realizado previamente por Lima *et al.* (2019).

Métodos analíticos

Teste do Micronúcleo (MN)

O teste do micronúcleo compreende a confecção de esfregaços a partir do sangue periférico de cada espécime amostrado. As lâminas foram coradas com Giemsa (7,5%), durante cinco minutos à 25 °C. Os eritrócitos foram analisados sob microscopia, com objetiva de imersão (100X), sob aumento total de 1.000X. A validação dos micronúcleos, para que tais células pudessem ser contabilizadas, foi efetuada a partir de sua morfologia (redonda), tamanho (micronúcleo $\leq 1/3$ do núcleo celular) e coloração (arroxeada, igual a do núcleo celular). O número total de eritrócitos analisados foi

padronizado em 3.000 células por amostra e os dados representados em número de células micronucleadas/1.000 analisadas (MN/1.000).

Ensaio Cometa (EC)

O ensaio cometa, foi efetuado a partir de amostras de sangue retiradas através da veia caudal de cada peixe, utilizando seringas heparinizadas. Uma amostra de 10 microlitros de cada espécime foi misturada a 120 microlitros de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). A suspensão foi espalhada em lâminas previamente revestidas com agarose padrão (1,5%). Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em porta-lâmina onde foi adicionada a solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, 1% Triton x-100, 10% DMSO, pH 10), previamente refrigerada (4°C), e mantidas no escuro por uma hora em refrigerador. Após a lise celular, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese, adicionando tampão (TBE, Tris Boro EDTA 1X), onde permaneceram por 20 minutos, para permitir a desnaturação do DNA. A eletroforese foi então realizada a 25 V e 300 mA, por 25 minutos. Terminado o procedimento, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto e coradas com solução de Gel Red (1:100). Um total de 100 núcleos por espécime foi analisado sob microscopia de epifluorescência, sendo classificados visualmente com base na migração de fragmentos de DNA, definidos em cinco classes que variam de 0 a 4, de acordo com o tamanho da cauda formada pelo DNA danificado, a partir de cada núcleo.

As análises dos dados foram realizadas utilizando dois parâmetros distintos: a) índice de danos (ID), resultante da multiplicação do número de cometas de cada classe pelo dígito que denomina essa classe (0, 1, 2, 3 e 4); e b) frequência de danos (FD), correspondente ao percentual do total de cometas (CO) (classes 1 a 4), em relação ao total de células avaliadas.

Análises Estatísticas

Os dados obtidos para cada parâmetro em análise (MN e CO) foram previamente submetidos a um teste de homogeneidade das variâncias (B, teste de Bartlett) e de normalidade da distribuição (W, teste de Shapiro-Wilk). Os parâmetros que apresentarem normalidade e homogeneidade poderão ter suas médias para cada estuário confrontadas por ANOVA "a posteriori" de Tukey ou, em caso de não

confirmação, as medianas para cada local serão confrontadas pelo teste de Kruskal-Wallis “a posteriori” de Nemenyi (ZAR, 1999).

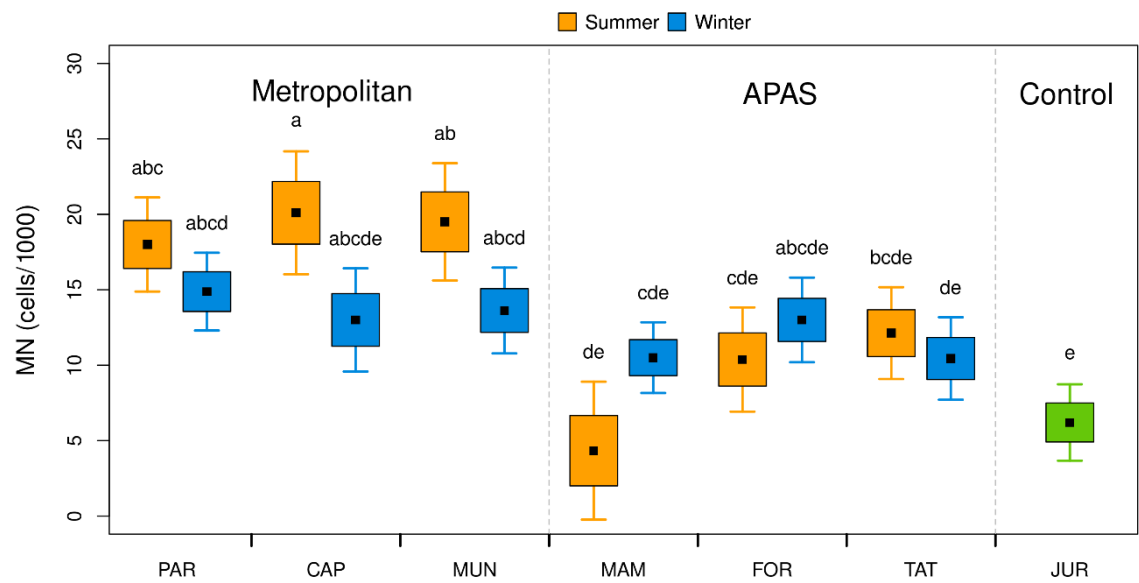
Em todos os casos foi estabelecido o nível de significância de 5%, com as análises estatísticas realizadas utilizando scripts estatísticos compatíveis à plataforma R 4.1.2 para Windows 64 bits (R CORE TEAM, 2020), seguindo as indicações estatísticas recomendadas por Sokal and Rohlf (2003).

RESULTADOS

A quantidade de células micronucleadas (MN) observadas nos exemplares de *M. curema* nos sistemas estuarinos onde foram amostrados variaram de 35 (Rio Mamanguape, no verão 2019) a 201 (Rio Capibaribe, no verão 2019), enquanto as médias por estuário foram de 4,3 a 20,1 MN/1.000, respectivamente. Todos os parâmetros avaliados apresentaram distribuição normal e homocedasticidade de variâncias, indicando a aplicação de ANOVA como teste paramétrico comparativo.

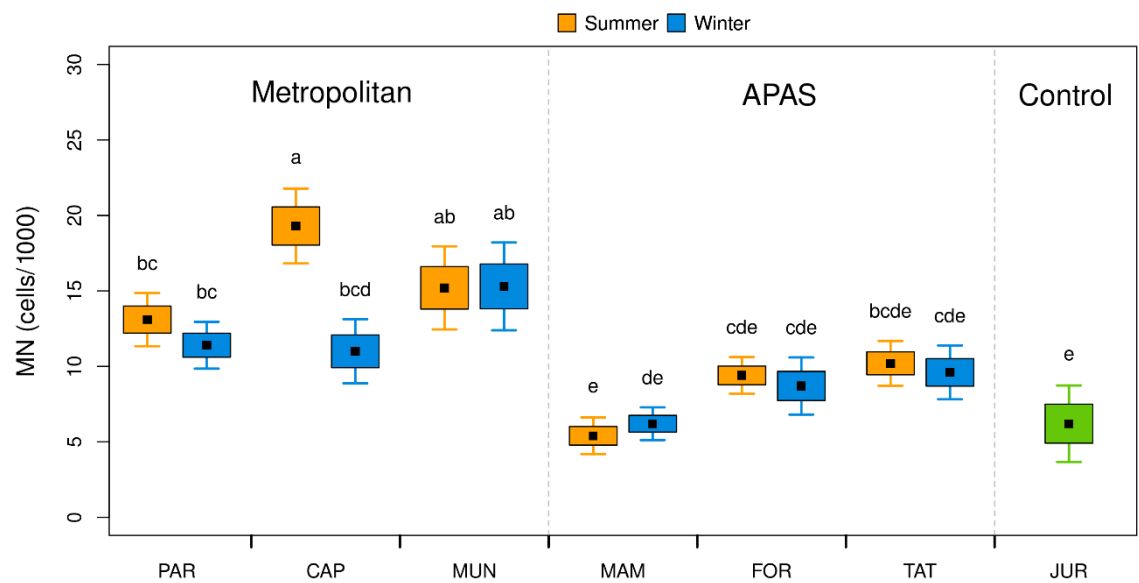
As análises dos eritrócitos revelaram diferenças significativas na quantidade de MNs entre o grupo controle, JUR (média $\pm$ desvio padrão: $6,2 \pm 5,0$) e os três estuários inseridos em regiões metropolitanas desses estados brasileiros – CAP, PE ($20,1 \pm 6,57$ e $19,3 \pm 4,0$); PAR, PB ($18 \pm 5,0$ e $13,1 \pm 2,85$) e MUN, AL ($19,5 \pm 5,6$ e $15,2 \pm 4,44$) avaliados para a estação seca (verão) de 2019 e 2020 respectivamente (ANOVA, $p < 0.05$; Figuras 2 e 3). O mesmo ocorreu durante a estação chuvosa (inverno) de 2019 e 2020 - PAR, PB ($14,88 \pm 3,72$ e $11,4 \pm 2,5$) MUN, AL ($13,62 \pm 4,1$ e $15,3 \pm 4,69$) (ANOVA, $p < 0.05$; Figuras 2 e 3) com exceção de CAP, PE no inverno de 2019 que não apresentou diferença estatística do controle (ANOVA, $p > 0.05$; Figura 2), diferindo apenas no inverno de 2020 ($11 \pm 3,43$) (ANOVA, $p < 0.05$; Figura 3). Para os outros três estuários (MAM, PB; FOR, PE e TAT, AL), inseridos em áreas de preservação ambiental (APAs) desses estados brasileiros, apresentaram resultados não contrastantes aos do grupo controle, independentemente da estação climática e do ano amostral (ANOVA, $p > 0.05$; Figuras 2 e 3).

Figura 2 – Gráfico das médias de células micronucleadas - MNs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2019 comparadas ao grupo controle (Juréia-Itatins)



Fonte: O autor (2022)

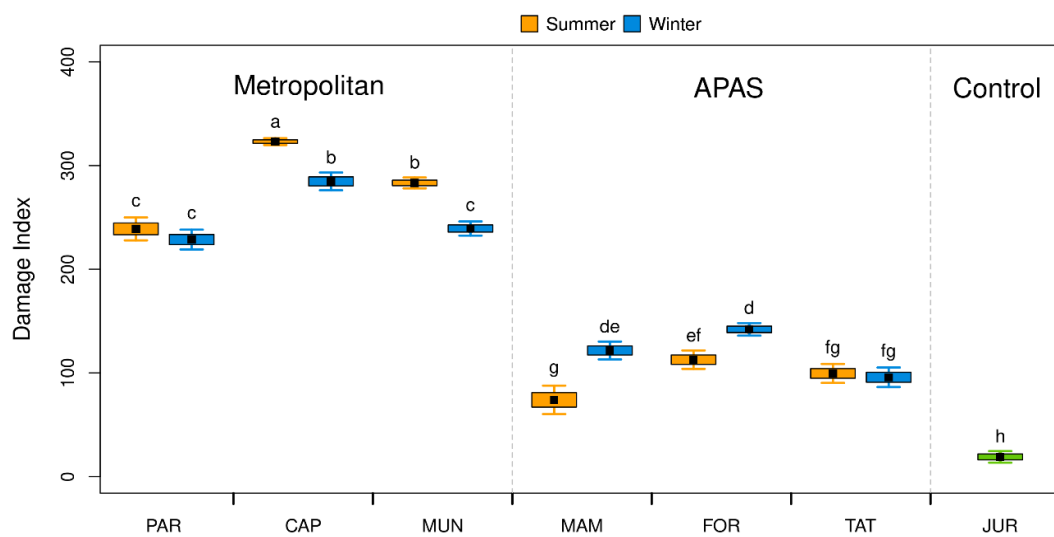
Figura 3 – Gráfico das médias de células micronucleadas - MNs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2020 comparadas ao grupo controle (Juréia-Itatins)



Fonte: O autor (2022)

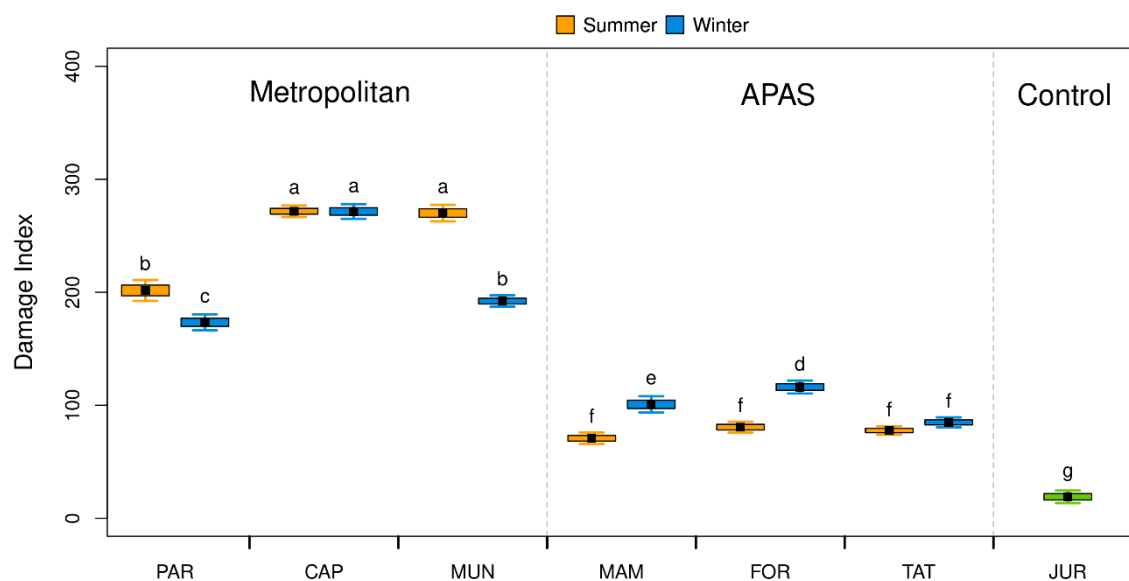
O ID diferiu estatisticamente entre o grupo controle e os seis sistemas estuarinos estudados independentemente da estação climática ou ano amostral (ANOVA, $p < 0.05$; Figuras 4 e 5).

Figura 4 – Gráfico com as médias de índices de danos - IDs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2019 comparadas ao grupo controle (Juréia)



Fonte: O autor (2022)

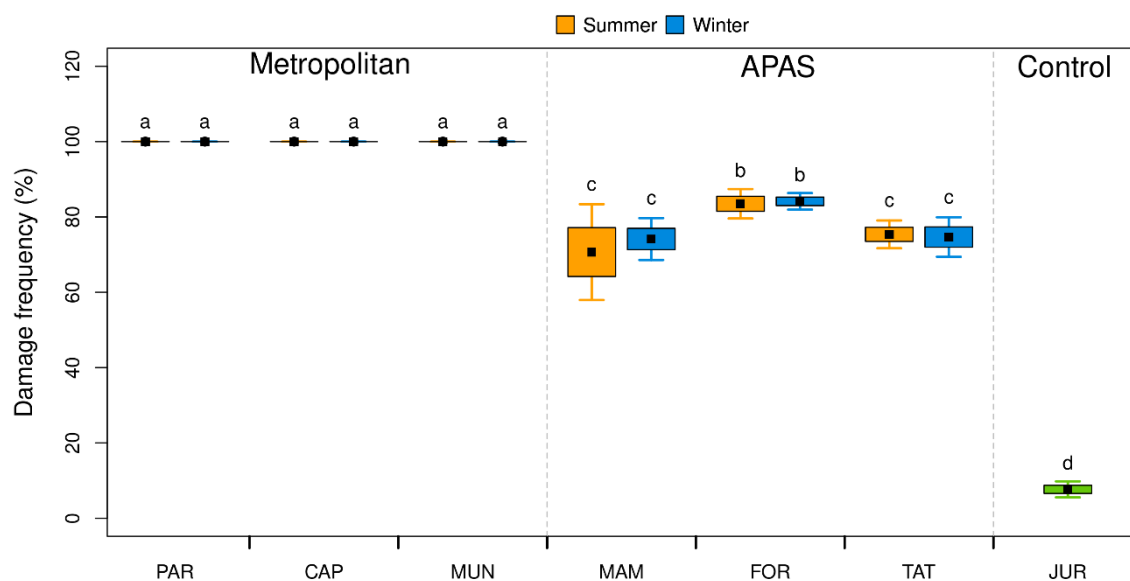
Figura 5 – Gráfico com as médias de índices de danos - IDs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2020 comparadas ao grupo controle (Juréia)



Fonte: O autor (2022)

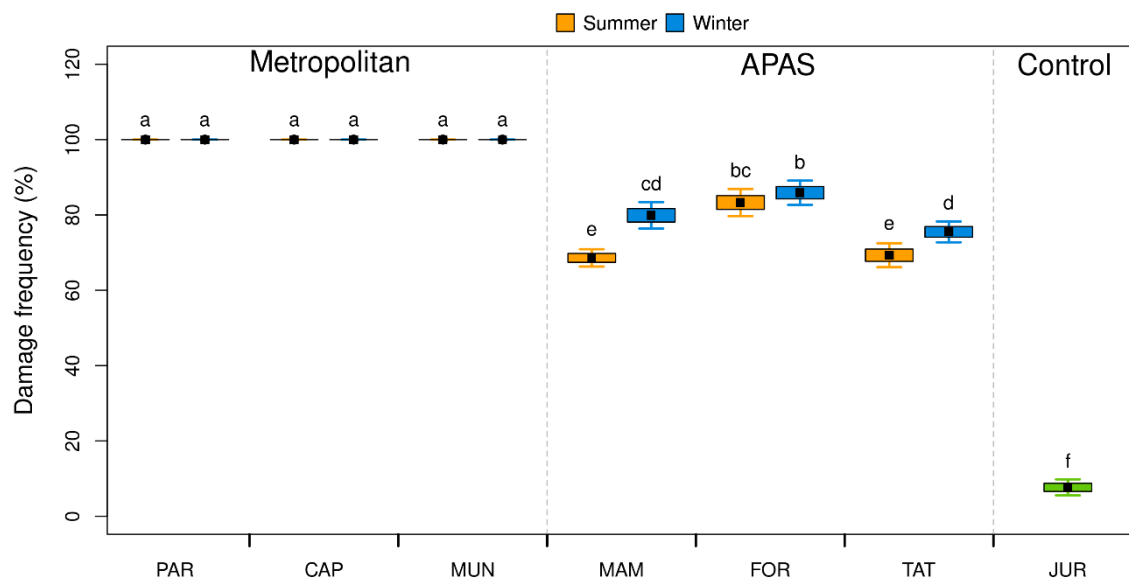
Nos estuários associados às regiões metropolitanas (PAR, CAP e MUN), a Frequência de Danos (FD) ocorreu em 100% dos nucleóides analisados, com similaridade estatística entre eles, independentemente da estação climática ou ano de coleta ($p > 0,05$). No entanto, nos estuários associados às unidades de conservação (MAM, FOR e TAT), foram observadas reduções no percentual das FDs, mas ainda bem acima da média observada para a região controle (Juréia-Itatins: $7,67 \pm 4,18$) (Figuras 6 e 7). Em todos os casos, a Juréia-Itatins contrastou estatisticamente de todos os estuários avaliados, independente da estação climática e ano amostral ($p < 0,05$).

Figura 6 – Gráfico com as médias das frequências de danos - FDs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2019 comparadas ao grupo controle (Juréia)



Fonte: O autor (2022)

Figura 7 – Gráfico com as médias das frequências de danos - FDs observadas em *M. curema* nos estuários avaliados no verão e inverno de 2020 comparadas ao grupo controle (Juréia)



Fonte: O autor (2022)

DISCUSSÃO

A elevada variação numérica dos hemócitos micronucleados (MN) e de cometas (CO), bem com das médias registradas nos espécimes analisados, em relação ao grupo controle, sugerem que *M. curema* apresenta estado crítico de conservação nos estuários estudados, confirmando seu uso como excelente sentinela em sistemas estuarinos. Tais resultados confirmam a suspeição de alto grau de perturbação nos estuários associados a áreas metropolitanas, com expressiva malha urbana e demografia explicando incremento nas atividades antrópicas nessas regiões costeiras do Nordeste do Brasil. Esses resultados assemelham-se aos de Markich (2020), na Austrália, que efetuou estudo comparativo entre um estuário altamente urbanizado (Estuário de Sidney) e outro inserido em área de preservação ambiental (Estuário de Hawkesbury), utilizando o molusco bivalve *Xenostrobus securis* como espécie

bioindicadora. Os estudos sobre dano genômico em espécies de áreas costeiras, quando parcial ou totalmente livres de adensamento humano, têm mostrado danos genômicos normalmente menos intensos do que em áreas com maior densidade demográfica humana (PINHEIRO *et al.*, 2013; GUSSO-CHOUERI *et al.*, 2015; CATANHÊDE *et al.*, 2016; DUARTE *et al.*, 2016; GUSSO-CHOUERI *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2019; MARKICK, 2020). No presente estudo, a área com menor prevalência de macro e microlesões (MN e CO, respectivamente) foi a área controle utilizada neste estudo (Área de Proteção Ambiental Juréia-Itatins), fato previamente indicado por Pinheiro *et al.* (2013) e confirmado por Lima *et al.* (2019), reforçando se tratar de uma área livre de perturbações antrópicas (VIDE DUARTE *et al.*, 2016). O uso de biomarcadores de DNA vem sendo sugerido com uma classe importante de parâmetros acerca da qualidade de ambientes marinhos (DAVIES E VETHAAK, 2012). Os resultados obtidos reforçam tal fato e confirmam dados de monitoramento da qualidade da água realizados periodicamente pelos órgãos ambientais dos estados de Pernambuco (CPRH, 2020), Paraíba (SUDEMA, 2020) e Alagoas (IMA, 2020), com indicação, pelos diferentes padrões de dano genômico, as áreas de menor ou maior preservação ambiental.

As microlesões genômicas (CO) sugerem que mesmo os sistemas estuarinos associados às áreas de preservação ambiental nos estados da Paraíba, Pernambuco e Alagoas, já vêm sofrendo efeito negativo pelas ações humanas, em especial pelas atividades turística e canavieira. O turismo vem sendo indicado como uma das ações humanas mais perturbadoras sobre os ecossistemas marinhos da costa Nordeste do Brasil (SARMENTO E SANTOS, 2012; SANTOS *et al.*, 2015), inclusive pelo aumento da descarga de esgoto não tratado nos ecossistemas costeiros. As perturbações ambientais advindas do acúmulo de esgoto nos ambientes costeiros vêm sendo documentadas no Atlântico Sul e demonstram séria gravidade e preocupação na conservação destes ambientes (BERBEL *et al.*, 2015). O cultivo da cana-de-açúcar também tem sido responsável por este impacto, ocorrendo no entorno de inúmeros estuários da região nordeste do Brasil, envolvendo o uso de herbicidas que podem afetar o desenvolvimento ontogenético e atividades bioquímicas (PROCÓPIO *et al.*, 2014), com comprovada toxicidade e dano genômico para diferentes organismos (FRANCO-BERNARDES *et al.*, 2014; MOURA E JONSSON, 2016). Os dados de dano genômico observados em *M. curema* assemelham-se àqueles encontrados em outras espécies de regiões similares mundo afora, como os mexilhões *Mytilus edulis* e

Xenostrobus securis da costa sudoeste da Inglaterra e da costa sudeste da Austrália, estudados por Dallas *et al.* (2013) e Markich, (2020), respectivamente; e do peixe *Mugil cephalus* em estuários do litoral de Portugal (CARROLA *et al.* 2014). O conjunto destas argumentações reforça o grande impacto que *M. curema* vem sofrendo nos ambientes aqui estudados, além de oferecer evidência do grau de deterioração do ecossistema estuarino.

O presente estudo registrou uma tendência de elevação das macrolesões (MN) para *M. curema* durante as estações secas (verão) nos estuários metropolitanos e mais impactados antropicamente (Capibaribe, PE; Paraíba, PB; e Mundaú, AL), em relação à estação chuvosa (inverno), indicando que o maior aporte de água minimiza os efeitos de macrolesões no genoma da espécie. O inverso ocorreu em estuários inseridos dentro de unidades de conservação (Formoso, PE; e Mamanguape, PB), com elevação das macrolesões (MN) durante a estação chuvosa (inverno) em relação à seca (verão). Esses achados revelam que na estação chuvosa o maior aporte hídrico nos estuários menos impactados acaba trazendo poluentes de outras regiões. Na última década, a implantação de polos industriais e a elevada atividade turística em regiões costeiras têm promovido modificações nas características físico-químicas dos estuários, reduzindo a qualidade da água pela descarga contínua de efluentes industriais e sanitários não tratados (GALINDO E MOREIRA, 2009; BENINCÁ *et al.*, 2011; SHARIF *et al.*, 2014; BERBEL *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2021). Este padrão também foi confirmado no litoral nordeste brasileiro, em especial em áreas associadas aos grandes centros urbanos de regiões metropolitanas, onde tem sido registrado níveis de poluição acima daqueles que caracterizam ambientes saudáveis (MACIEL *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2019; FALCÃO *et al.*, 2020). O impacto de tais alterações ambientais é revelado em estudos diagnósticos e de monitoramento em várias regiões costeiras do mundo, apresentando padrões similares aos obtidos nos sistemas estuarinos do nordeste brasileiro (BARSIENTE *et al.*, 2013; MARKICH, 2020; AMARAL *et al.*, 2021).

As microlesões (CO) registradas para *M. curema* nos seis estuários nordestinos avaliados também são efeito da poluição costeira no litoral, com um índice de danos (ID) em padrão idêntico ao verificado para as macrolesões (MN) sobretudo nos estuários metropolitanos. O simples confronto do quantitativo e das médias de CO analisados por estuário, com o de outras localidades ao redor do mundo revelam um

padrão similar entre os dados obtidos por diferentes autores (LEE E STEINERT, 2003; RANK *et al.*, 2005). Isso sugere que a mudança da qualidade natural desses ambientes altera a integridade do material genético das espécies que frequentam estas áreas, ameaçando sua sobrevivência e, por consequência, levando a perdas econômicas e ecológicas irreparáveis (ARALDI *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2019; AMARAL *et al.*, 2021).

Em outras regiões que apresentam áreas estuarinas densamente povoadas (MERHAHI *et al.*, 2021; DE SOUZA *et al.*, 2022; SCHWEIZER *et al.*, 2022), os problemas de contaminação já registrados são similares aos da costa nordeste brasileira, fato confirmado pelo padrão de danos genômicos e efeito da sazonalidade (ARSLAN *et al.*, 2015; FLOEHR *et al.*, 2015).

É importante salientar que micro e macrolesões decorrem de diferentes tipos de perturbadores ambientais, que podem estar presentes no ambiente em períodos distintos ou ao longo do ano (LIMA *et al.*, 2019), podendo atuar isolada ou sinergicamente.

Com base na associação dos dados de macro e microlesões ao DNA de *M. curema*, o ordenamento hierárquico das médias de MN e CO gerou a seguinte sequência decrescente de contaminação nos sistemas estuarinos em estudo: Capibaribe > Mundaú > Paraíba > Formoso > Tatuamunha > Mamanguape > Juréia-Itatins (grupo controle).

Outro aspecto importante é que não foram constatadas alterações significativas nos padrões de danos genômicos entre os anos de 2019 e 2020, mesmo com as restrições impostas pela pandemia da COVID-19. Mesmo considerando redução das atividades industriais e turísticas neste biênio, os efeitos não repercutiram para redução dos danos genotóxicos na espécie avaliada. Tal aspecto contrasta com os resultados obtidos em outros estudos em regiões estuarinas ao redor do mundo, durante o ano de 2020, que confirmaram que a redução das atividades antrópicas repercutiu em melhor qualidade das águas superficiais desses estuários durante a pandemia (p. ex., Estuário do Rio Ganga, na Índia - CHAKRABORTY *et al.*, 2021). Neste sentido, é relevante citar que a espécie objeto do presente estudo não se limita ao espectro das águas superficiais, explorando, sobretudo, as regiões mais profundas da coluna d'água. Além disso, todos os estuários das regiões metropolitanas (PAR-PB, CAP-PE e MUN-AL) recebem influência das atividades portuárias dessas regiões,

potencializando, assim, a pressão antrópica local, como já documentado em regiões similares do nordeste do Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2021).

Os atuais padrões de ocupação das áreas costeiras no mundo revelam a necessidade de um monitoramento constante dos recursos naturais, visando proteger a biodiversidade existente e os recursos naturais dos quais dependem para sobreviver (HONG *et al.*, 2012; DALLAS *et al.*, 2013; CARROLA *et al.*, 2014; AMARAL *et al.*, 2021). Nesse sentido, os resultados obtidos contribuem ao direcionamento mais racional e colaborativo de medidas pró-conservacionistas, para redução da deterioração dos ecossistemas e, por consequência, da depleção gênicas das espécies que neles vivem. Sendo assim, estes resultados ainda contribuem para a conservação de *M. curema* e dos sistemas de estuários avaliados, à medida que fornece subsídios que permitem um monitoramento da atual situação ambiental. Além disso, tais resultados possibilitam sugerir as áreas que devem ser consideradas prioritárias para a tomada de medidas conservacionistas.

CONCLUSÕES

Todos os seis estuários avaliados apresentaram níveis alarmantes de impacto ambiental, seja por macro, micro ou ambos níveis de dano genômico em relação ao estuário controle, permitindo sua ordenação por contaminação, conforme segue: Capibaribe > Mundaú > Paraíba > Formoso > Tatuamunha > Mamanguape.

Os estuários associados aos rios em Áreas de Preservação Ambiental (Mamanguape, Formoso e Tatuamunha) apresentaram resultados similares aos do grupo controle, quando foram avaliadas as macrolesões (MN), independentemente da estação climática (verão e inverno).

O estuário do Capibaribe apresentou uma menor média de genotoxicidade (MN) no período chuvoso, indicando que o maior aporte de água no estuário reduziu a expressão das macrolesões no genoma da espécie.

Mugil curema apresenta micro e macrolesões nos seis estuários estudados, causadas pelo elevado grau de perturbação, em especial nos manguezais metropolitanos, devido a maior contaminação na qualidade das águas, requerendo medidas mitigadoras para restaurar o equilíbrio e qualidade dos sistemas estuarinos.

A qualidade ambiental dos sistemas estuarinos encontra-se em perigo, bem como *M. curema*, que tem apresentado depleção gênica, com prejuízos à pesca artesanal, a qualidade do pescado e saúde daqueles que se alimentam destes animais.

O diagnóstico de degradação dos sistemas estuarinos avaliados contribui para um melhor direcionamento das medidas reparadoras pelos órgãos ambientais, em especial naqueles de regiões metropolitanas, onde a degradação ambiental, em média, foi 70 % superior à de estuários dentro de unidades de conservação.

REFERÊNCIAS

- ABESSA, D.M.S. et al. Integrative ecotoxicological assessment of a complex tropical estuarine system. **Marine Pollution: New Research**, 1-36, 2008
- ADAM, M.L. et al. Environmental Degradation at a Public Park in Southern Brazil as Revealed Through a Genotoxicity Test (MN) on Peripheral Blood Cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). **Water Air Soil Pollut**, 211, 61-68, 2010.
- ALMEIDA, S.F. et al. DNA damage in an estuarine fish inhabiting the vicinity of a major Brazilian port. **Academia Brasileira de Ciências**, 93(2), 20190652, 2021.
- AMARAL, T.F. et al. Temporal and spatial toxicogenetic damage in estuarine catfish *Cathorops spixii* from a marine protected area with evidence of anthropogenic influences. **Science of The Total Environment**, 799, 149409, 2021.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev Bras Epidemiol** 6, 158-170, 2003.
- ARALDI, R.P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomed Pharmacother**, 72, 74-82, 2015.
- ARAÚJO, M.C.B. et al. Análise da Ocupação Urbana das Praias de Pernambuco, Brasil. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, 97-104, 2007.
- ARAÚJO A.R; SILVA F.D. Aspects of the fishery and biology of mullet, *Mugil curema* (Osteichthyes: Mugilidae), in the Vaza Barris River estuary, Sergipe State, Brazil. **Arq. Ciên. Mar**, 46(1), 29 - 38, 2013.
- ARSLAN, O.C. et al. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliag̃a Bay Turkey. **Marine Pollution Bulletin**, 94, 48–54, 2015.
- AZEVEDO, J. S. et al. Biochemical changes in the liver and gill of *Cathorops spixii* collected seasonally in two Brazilian estuaries under varying in fluences of anthropogenic activities. **Ecotoxicol Environ Saf**, 2013.
- BARLETTA, M.; COSTA, M.F. Living and non-living resources exploitation in a Tropical Semi-arid Estuary. **J Coastal Res**, 56, 371-375, 2009.

BARSIENE, J. et al. Environmental genotoxicity and cytotoxicity levels in fish from the North Sea offshore region and Atlantic coastal waters. **Mar Pollut Bull**, 68(1-2), 106-116, 2013.

BENINCA, C. et al. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. **Environ Monit Assess**, 2011.

BERBEL G. B.B.; FAVARO D.I.T.; BRAGA E. S. Impact of harbour, industry and sewage on the phosphorus geochemistry of a subtropical estuary in Brazil. **Mar Poll Bull**, 93 (1–2), 44-52, 2015.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E.L.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicol Environ Saf**, 74(4), 826-833, 2011.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, 26(1), 205-213, 2011.

BRASIL. 2000. Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1o, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF (2000 jul. 19); Sec. 1:45.

CARROLA, J. et al. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries--Portugal. **Environ Sci Pollut Res Int**, 21(9), 6057-6068, 2014.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. **Environ. Mol. Mutagen**, 46, 64–70, 2005.

CHAKRABORTY, S. et al., Assessment of the surface water quality improvement during pandemic lockdown in ecologically stressed Hooghly River (Ganges) Estuary, West Bengal, India. **Marine Pollution Bulletin**, 171, 112711, 2021.

CPRH – Agência Estadual de Meio Ambiente/PE, 2020;
http://www.cprh.pe.gov.br/perfis_ambientais/areas_estuarinas/39751%3B33012%3B1802%3B0%3B0.asp.

DALLAS, L.J. et al. Relative sensitivity of two marine bivalves for detection of genotoxic and cytotoxic effects: A field assessment in the Tamar Estuary, South West England. **Environ Monit Assess**, 185, 3397–412, 2013.

DE FLORA, S.; BAGNASCO, M.; ZANACCHI, P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutat Res**, 258(3), 285-320, 1991.

DE SOUZA, C.A. et al. Seasonal effect on biomarker responses in sentinel species: innovation in mangrove conservation status assessment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, n. 6, p. 1-15, 2022.

DITTY J.G., SHAW R.F. Spatial and temporal distribution of larval striped mullet (*Mugil cephalus*) and white mullet (*M. curema*, Family: Mugilidae) in the northern Gulf of Mexico, with notes on mountain mullet, *Agonostomus monticola*. **Bull Mar Sci**, 59, 271–288, 1996.

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

FALCÃO, C.B.R. et al. Spatial-temporal genome damaging in the blue crab *Cardisoma guanhumi* as ecological indicators for monitoring tropical estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, 156, 12-32, 2020.

FLOEHR, T. et al. Yangtze Three Gorges Reservoir, China: A holistic assessment of organic pollution, mutagenic effects of sediments and genotoxic impacts on fish. **Journal of environmental sciences**, 38, 63 – 82, 2015.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mut Res**, 681, 80-92, 2009.

GALINDO, T.P.; MOREIRA, L.M. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). **Genet Mol Biol**, 32(2), 394-398, 2009.

GHISI, N.C. et al. In situ assessment of a neotropical fish to evaluate pollution in a river receiving agricultural and urban wastewater. **Bull Environ Contam Toxicol**, 93(6), 699-709, 2014.

GUTIÉRREZ, J.M.; VILLAR, S.; PLAVAN, A.A. Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay). **Marine Pollution Bulletin**, 91, 518-523, 2015.

HAUSER-DAVIS, R.A. et al. Metal bioaccumulation in edible target tissues of mullet (*Mugil liza*) from a tropical bay in Southeastern Brazil. **J. Trac. Elem. Med. Biol**, 36, 38-43, 2016.

HONG, Y.W. et al. Impacts of urbanization on surface sediment quality: evidence from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) contaminations in the Grand Canal of China. **Environ. Sci. Pollut. Res**, 19 (5), 1352–1363, 2012.

HONG, Y.W. et al. Impacts of urbanization on surface sediment quality: evidence from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) contaminations in the Grand Canal of China. **Environ. Sci. Pollut. Res**, 19 (5), 1352–1363, 2012.

IBÁÑEZ A.L.; GUTIÉRREZ-BENÍTEZ O. Climate variables and spawning migrations of the striped mullet and white mullet in the north-western area of the Gulf of Mexico. **J Fish Biol**, 65, 822–831, 2004.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. Estimativas de população por cidades. Available from: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>.

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

LIMA, A.R.B. et al. Genomic damage in *Mugil curema* (Actinopterygii: mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 138, 63-69, 2019.

MACIEL, D.C. et al. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. **Mar Pollut Bull**, 101, 429-433, 2015.

MANZANO, B.C. et al. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of Sao Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environ Sci Pollut Res Int**, 22(2), 1399-1407, 2015.

MARKICH, S. J. Dataset of genotoxic and cytotoxic effects on the pygmy mussel, *Xenostrobus securis*, from the highly urbanised Sydney Estuary, Australia: relationships with metal bioaccumulation. **Data In Brief**, [S.L.], v. 30, 1-18, 2020.

MATTAR, E.P.L. et al. Federal Conservation Units in Brazil: The Situation of Biomes and Regions. **Floresta e Ambiente**, 25(2), 2018.

MERHABI, F. et al. Occurrence, distribution, and ecological risk assessment of emerging and legacy contaminants in the Kadicha river in Lebanon. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 44, p. 62499-62518, 2021.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutat Res**, 567(2-3), 109-149, 2004.

PEREIRA, C.D. et al. Chronic contamination assessment integrating biomarkers' responses in transplanted mussels-A seasonal monitoring. **Environ. Toxicol**, 27, 257-267, 2012.

PINHEIRO, M.A. et al. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. **Environ Monit Assess**, 185(10), 8273-8285, 2013.

PROCÓPIO, S. O. et al. Toxicity of herbicides used in the sugarcane crop to diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Semina. **Ciências Agrárias**, 35(5), 2383-2398, 2014.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: The principles and practice of statistics in biological research**. 3rd Ed. New York: W.H. Freeman, 887, 2003.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2020. Available: <https://www.r-project.org/> [2022, May, 01].

RAGUGNETTI, M. et al. Ibuprofen Genotoxicity in Aquatic Environment: An Experimental Model Using *Oreochromis niloticus*. **Water Air Soil Pollut**, 218, 361-364, 2011.

RANK, J.; JENSEN, K.; JESPERSEN, P.H. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. **Mutation Research**, 585, 33–42, 2005.

ROCHA, T.L. et al. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Mar Environ Res**, 101, 29-37, 2014.

SANTOS, G. S. et al. The impact of trampling on reef macrobenthos in Northeastern Brazil: how effective are current conservation strategies? **Environ Manag**, 56, 847-858, 2015.

SARMENTO, V.C.; SANTOS, P.J.P. Trampling on coral reefs: tourism effects on harpacticoid copepods. **Cor Reef**, 31, 135-146, 2020.

SHARIF, A. et al. Fate of mercury species in the coastal plume of the Adour River estuary (Bay of Biscay, SW France). **Sci Total Environ**, 496, 701-713, 2014.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 175, 184-191, 1988.

SOUZA, I.C. et al. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environ Pollut**, 180, 136-144, 2013.

SPONCHIADO, G. et al. Genotoxic Effects in Erythrocytes of *Oreochromis niloticus* Exposed to Nanograms-per-Liter Concentration of 17 β -Estradiol (E2): An Assessment Using Micronucleus Test and Comet Assay. **Water Air Soil Pollut**, 218, 353-360, 2011.

TSANGARIS, C. et al. Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in grey mullet (*Mugil cephalus*) from a polluted environment in Saronikos Gulf, Greece. **Arch Environ Contam Toxicol**, 61(3), 482-490, 2011.

SCHWEIZER, M. et al. Fish health in the Nidda as an indicator for ecosystem integrity: a case study for Central European small streams in densely populated areas. **Environmental Sciences Europe**, v. 34, n. 1, p. 1-24, 2022.

ZAR J.H. **Biostatistical Analysis**, 4th Ed. New York, Prentice Hall, 663, 1999.

4.2 ARTIGO 2

Acetilcolinesterase de *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae): da caracterização ao potencial uso no biomonitoramento de estuários do Nordeste do Brasil

Anderson Rodrigues Balbino de Lima^{*1, 2, 3}, Caio Rodrigo Dias Assis ³ Mônica Lúcia Adam², Marlyete Chagas de Araújo³, Ranilson de Souza Bezerra ³

1. Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Pernambuco, Brazil.
2. Centro de Biociências, Departamento de Zoologia, Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.
3. Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

*Autor correspondente: Email: anderson_rodrigues.184@hotmail.com

Resumo

Os estuários são regiões que apresentam características que atraem o estabelecimento e desenvolvimento de grandes centros urbanos em seu entorno, devido a facilidade de capção de água doce e a possibilidade de implantação de áreas portuárias, movimentando o comércio de mercadorias entre o Brasil e outras regiões do mundo. No nordeste do Brasil também existe uma forte pressão antrópica das plantações de cana-de-açúcar associadas ao uso de pesticidas. Devido as

características que essas regiões apresentam, se faz necessário um constante monitoramento das condições ambientais, principalmente dos ecossistemas aquáticos, que são o destino final de boa parte de todos os resíduos gerados pelas atividades humanas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) na espécie *Mugil curema* (tainha) de seis sistemas estuarinos do nordeste brasileiro, caracterizar parâmetros cinéticos e físico-químicos da AChE cerebral de *M. curema*, bem como verificar o efeito in vitro de agrotóxicos e íons metálicos sobre sua atividade, a fim de ampliar as possibilidades de aplicação desta enzima em programas de biomonitoramento aquático. Os parâmetros cinéticos velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m) indicaram que o substrato mais eficientemente hidrolisado é o da AChE, comprovando a predominância desta ChEs no tecido cerebral da espécie. O inibidor específico da BChE (Iso-OMPA) não apresentou IC_{50} . Em contrapartida, quando exposta ao inibidor BW284c51 (inibidor específico da AChE) observou-se uma IC_{50} na concentração de 34,6 $\mu g/ml$ do inibidor, confirmando que a ChE predominante no cérebro de *M. curema* é a AChE. Os dados também revelam que a temperatura ótima de atividade da enzima foi de 40°C e o pH ótimo foi de 7,5. Dentre os íons metálicos avaliados o Cu^{2+} apresentou a menor concentração capaz de inibir 50% da atividade da AChE, seguido pelo Hg^{2+} e pelo As^{2+} . O Zn^{2+} não apresentou valores inibitórios significativos. Ao avaliarmos o poder inibitório de alguns pesticidas observamos que a AChE também apresenta alta sensibilidade para alguns pesticidas organofosforados (OPs) e carbamatos (CBs). Os resultados das atividades da AChE, evidenciaram a presença de compostos anti-colinesterasicos nos sistemas de estuários avaliados, uma vez que foram observadas uma diminuição significativa da atividade específica da AChE, na maioria dos estuários, quando comparados ao estuário do Rio Tinto/Mamanguape – PB que consistiu no mais preservado entre todos os estuários avaliados. A análise comparativa entre os pontos de amostragem nas diferentes estações de 2019 e 2020 revelam algumas diferenças significativas ($p < 0,05$). Os dados aqui apresentados apontam para a urgência no direcionamento de medidas que visem reduzir a pressão antrópica nos estuários avaliados e indicam que as áreas de preservação associadas aos estuários do presente estudo necessitam de um melhor gerenciamento.

Palavras - Chave: Atividade Enzimática. Biomarcador. Monitoramento Ambiental. Tainha.

INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de indicadores ambientais foi desenvolvida para detectar e avaliar a exposição a contaminantes em níveis subletais. Esses biomarcadores são amplamente utilizados em programas de monitoramento (HYNE E MAHER, 2003; WANG *et al.*, 2005; BONACCI *et al.*, 2007; DE LA TORRE *et al.*, 2007; KOPECKA E PEMPKOWIAK, 2008).

As colinesterases (ChEs) são um grupo de enzimas com alta afinidade para ésteres de colina e são representadas pela acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8). O primeiro hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares, desobstruindo as respectivas fendas e evitando a superestimulação dos receptores. O segundo apresenta uma ampla gama de ligantes com substrato desconhecido e é comumente considerada uma enzima detoxificante, além de estar envolvida no metabolismo da grelina (çokugras, 2003; COUSIN *et al.*, 2005; BRIMIJOIN *et al.*, 2016). A maior eficiência catalítica dessas enzimas para hidrolisar ésteres de colina e sua alta reatividade para vários inibidores são determinadas pela arquitetura funcional específica de seu sítio ativo.

Após a proibição da maioria dos compostos organoclorados devido à sua alta persistência no meio ambiente, o uso de carbamatos e organofosforados se intensificou; eles são atualmente os pesticidas mais usados no mundo. Estima-se que esses dois tipos de agrotóxicos representem mais de 50% de todos os agrotóxicos comercializados. Eles são conhecidos por terem uma ação neurotóxica (inibitória) sobre a atividade da acetilcolinesterase, que é uma enzima chave na regulação da transmissão sináptica (SOUZA *et al.*, 2018). A AChE promove a hidrólise do neurotransmissor, acetilcolina, para garantir impulsos nervosos intermitentes (que caracterizam a comunicação neuronal) enquanto evita a síndrome colinérgica aguda que pode resultar se este neurotransmissor se acumular nas terminações nervosas

do sistema nervoso central e periférico (KARCZMAR, 1998; KELLAR, 2006). Essa enzima é o principal alvo molecular da ação neurotóxica dos citados agrotóxicos e por esse motivo tem sido amplamente estudada e proposta para uso em programas de biomonitoramento, dada sua sensibilidade e disponibilidade abundante no cérebro de diversos organismos, incluindo peixes (GHAZALA *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2016). Além disso, poluentes inorgânicos, como metais pesados, também são descritos na literatura como inibidores da AChE (SILVA *et al.*, 2013; DAI *et al.*, 2014; ASSIS *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2018). Os metais pesados não são biodegradáveis e, portanto, tendem a se bioacumular nos organismos, onde manifestam sua toxicidade (NUNES *et al.*, 2014).

Devido aos efeitos deletérios causados por esses poluentes em espécies não-alvo, a medição da atividade da acetilcolinesterase cerebral (AChE) em peixes é um método diagnóstico amplamente aceito, ou seja, um biomarcador, para estimar a exposição dos peixes a agentes anti-AChE no ambiente aquático. Porém, a caracterização e o conhecimento prévio de suas propriedades enzimáticas são necessários, uma vez que a AChE é uma enzima polimórfica que pode se apresentar em uma série de formas moleculares, tanto inter quanto intraespecificamente. Segundo Pezzementi e Chatonnet (2010), várias espécies de peixes não expressam a outra colinesterase (ChE), a butirilcolinesterase (BChE) no cérebro e algumas delas não a expressam em nenhum tecido. Outra colinesterase, a PChE, é uma enzima controversa e não totalmente aceita na literatura (a PChE não possui o número EC). As enzimas mais próximas de ser uma PChE real são *Drosophila* AChE (GNAGEY *et al.*, 1987) e alguns moluscos ChEs (TALESA *et al.*, 1990). Assis *et al.* (2014) observaram atividade ChE atípica no cérebro de *Colossoma macropomum*. Este histórico de literatura justifica a caracterização dessas enzimas em cada espécie e sua suscetibilidade a contaminantes.

Mugil curema é uma espécie de peixe que habita os ambientes costeiros, possui ampla distribuição mundial e é relatada na literatura como excelente sentinela ambiental (LIMA *et al.*, 2019). É uma espécie de grande importância comercial no nordeste do Brasil, onde é utilizada como alimento por grande parte das populações ribeirinhas. As características genéticas dessa espécie já são descritas na literatura, mas as propriedades bioquímicas ainda não são conhecidas. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) na espécie *M. curema* (tainha) de seis sistemas estuarinos do nordeste brasileiro,

caracterizar parâmetros cinéticos e físico-químicos da AChE cerebral de *M. curema*, bem como verificar o efeito in vitro de agrotóxicos e íons metálicos sobre sua atividade, a fim de ampliar as possibilidades de aplicação desta enzima em programas de biomonitoramento aquático.

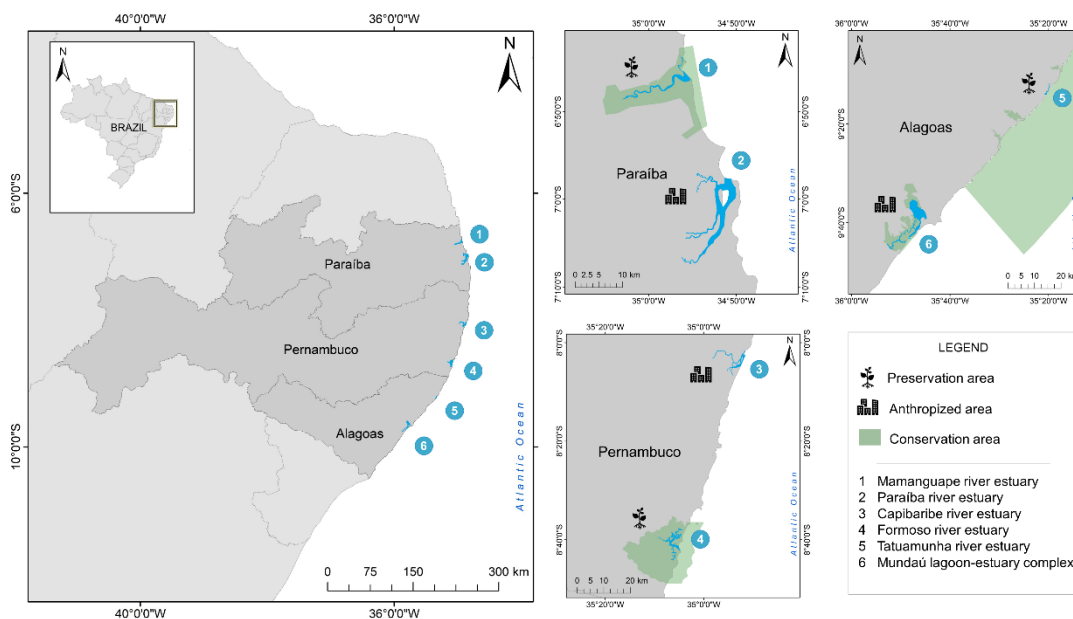
MATERIAIS E MÉTODOS

Áreas de estudo

Foram selecionados seis estuários distribuídos entre os estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco (Figura 1). Três destes, inseridos nas regiões metropolitanas das capitais dos respectivos estados, sendo em Alagoas o complexo estuarino lagunar Mundaú, na Paraíba o sistema estuarino do Rio Paraíba e em Pernambuco o sistema estuarino do Rio Capibaribe. Os outros três estuários inseridos em Áreas de Proteção Ambiental (APAs) de seus respectivos estados, sendo em Alagoas o estuário do Rio Tatuamunha inserido na APA Costa dos Corais, na Paraíba o estuário do Rio Tinto/Mamanguape inserido na APA da Barra do Mamanguape e em Pernambuco o estuário do Rio Formoso inserido nas APAs de Guadalupe e Costa dos Corais (Figura 1).

Figura 1 - Mapa do litoral brasileiro evidenciando a localização dos estuários ao longo dos estados da Paraíba (1 e 2), Pernambuco (3 e 4) e Alagoas (5 e 6). Os símbolos indicam as

áreas de proteção ambiental e as regiões metropolitanas



Fonte: O autor (2022)

Amostragem e obtenção do extrato bruto

Foram amostrados 214 espécimes de *M. curema* nos seis estuários dos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco, nordeste do Brasil, no verão e inverno (2019/2020). Após a morte, os cérebros dos peixes foram removidos e os tecidos homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 8,0, mantendo uma razão de 20 mg de tecido por ml de tampão, utilizando um disruptor de tecidos Potter-Elvehjem (IKA RW-20 digital). Os homogenatos foram centrifugados durante 10 min a $10.000 \times g$ (4°C) e os sobrenadantes (extratos brutos) foram congelados a -20°C (Assis *et al.*, 2014).

Atividade enzimática e determinação protéica

A atividade enzimática foi realizada da seguinte forma: DTNB 0,25 mM (200 µL) preparado em tampão HCl Tris 0,5 M pH 7,4 foi adicionado ao extrato bruto (20 µL). A reação foi iniciada pela adição de 62 mM de acetiltiocolina (20 µL) (Assis *et al.*,

2010; Silva *et al.*, 2013; Araujo *et al.*, 2016). A atividade foi determinada em quadruplicata por espectrofotometria (Bio-Rad xMark™) seguindo a absorbância a 405 nm durante 180 s, onde a reação exibiu um padrão de cinética de primeira ordem. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 μ mol de substrato por minuto. Preparou-se, de modo semelhante, um ensaio em branco. Neste ensaio, o tampão Tris-HCl a 0,5 mol/L, pH 8,0, substituiu a amostra de extrato bruto. O teor de proteína foi estimado de acordo com Sedmak and Grossberg (1977), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Parâmetros Cinéticos

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a taxa catalítica máxima (V_{max}) relacionada à interação entre a enzima e os substratos em estudo foram estimados pelo aumento das concentrações de cada substrato (ASCh, BSCh e PSCh de 0,8 a 20,8 mM concentração final).

Determinação do pH e temperatura ótima

Os ensaios foram realizados utilizando soluções de DTNB numa faixa de pH de 2,5 a 9,5 utilizando os tampões citrato-HCl (2,5 a 4,5), fosfato de citrato (4,0 a 7,5), Tris-HCl (7,2 a 9,0). A hidrólise não enzimática do substrato (ocorrida principalmente em pH básico) foi corrigida por subtração dos valores dos brancos nos respectivos pHs. A temperatura ótima foi estabelecida por ensaio da atividade da enzima exposta a temperaturas numa faixa de 5 a 80 °C durante 15 min com posterior adição do DTNB e leitura a 405 nm 180 s (Silva *et al.*, 2013).

Ensaio de inibição

Para identificar quais colinesterases estão presentes no cérebro de *M. curema*, o extrato bruto foi exposto aos inibidores seletivos do dibrometo de 1,5-bis (4-alildimetilamôniofenil) pentan-3-ona (BW284c51, inibidor de AChE), tetraisopropil fosforamida (Iso-OMPA, inibidor de BChE), brometo de neostigmina e eserina

(inibidores da colinesterases totais) durante 1 h em concentrações variando de 0,001 a 10 mM. O ensaio foi realizado em quadruplicada de acordo com Silva *et al.* (2013) e Araújo *et al.* (2016), incubando 10 µL de extrato bruto com 10 µL de inibidor em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 200 µL de DTNB 0,25 mM e a reação começou após a adição de 20 µL de acetiltiocolina 62 mM. A absorbância foi analisada a 405 nm durante 180 s e a atividade residual foi determinada utilizando a ausência de inibidor (10 µL de extrato bruto com 10 µL de água destilada) como 100% de atividade.

A inibição da AChE foi determinada utilizando quatro pesticidas, sendo eles: Diclorvos, Temefos, Carbaril e Carbofuran. Os inseticidas foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em água destilada, em cinco concentrações finais que variam de 10 a 0,001 mmol/L, sendo cada concentração subsequente 10 vezes mais diluída que a anterior. As soluções de pesticidas (10 µL) foram incubadas com extrato bruto (10 µL) durante 1 h, e a atividade residual (%) foi determinada como anteriormente descrito (para os inibidores seletivos) utilizando a ausência de pesticida como 100 % de atividade (ASSIS *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2016).

AChE foi exposta a quatro íons (Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} e As^{+2}) durante 40 min (BOCQUENÉ *et al.*, 1990) usando diluições iguais as utilizadas para os testes de inibição por pesticidas (10 a 0,001 mmol/L). A atividade enzimática foi realizada de acordo com o descrito acima para inibidores e pesticidas e a atividade residual foi determinada utilizando a ausência de inibidor como 100%.

As concentrações capazes de inibir em 50% a atividade enzimática (IC_{50}) foi estimada para cada inibidor (pesticidas, íons metálicos e inibidores específicos)..

RESULTADOS

Os parâmetros cinéticos velocidade máxima (V_{max}) e constante de Michaelis-Menten (K_m) foram analisados utilizando os substratos ASCh, BSCh e PSCh. O V_{max} , relativo à hidrólise de ASCh, é relatado como estando em uma faixa semelhante à de outras espécies (Tabela 1). O valor K_m foi comparado ao de várias espécies na Tabela 1. O substrato ASCh foi mais eficientemente hidrolisado por AChE de *M. curema* do que os substratos de BSCh e PSCh.

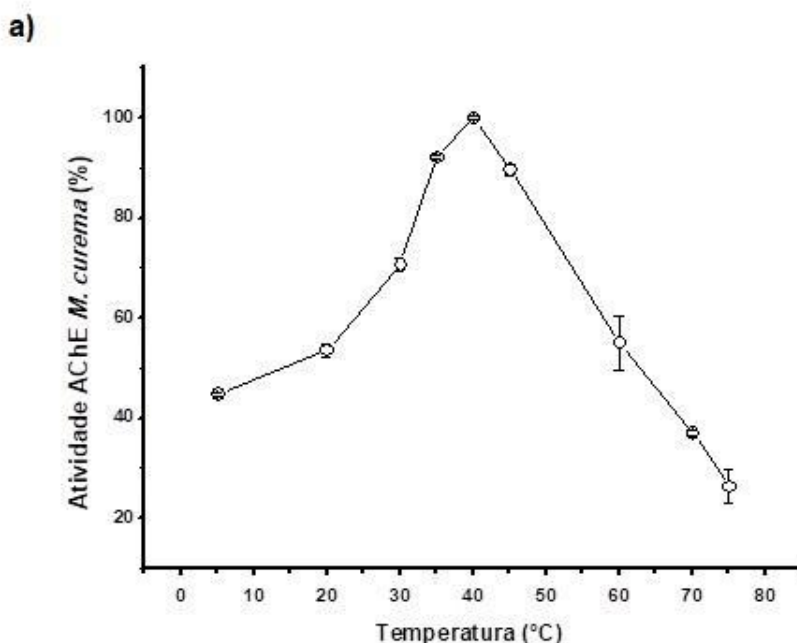
Tabela 1 - Parâmetros cinéticos da AChE de várias espécies de peixes

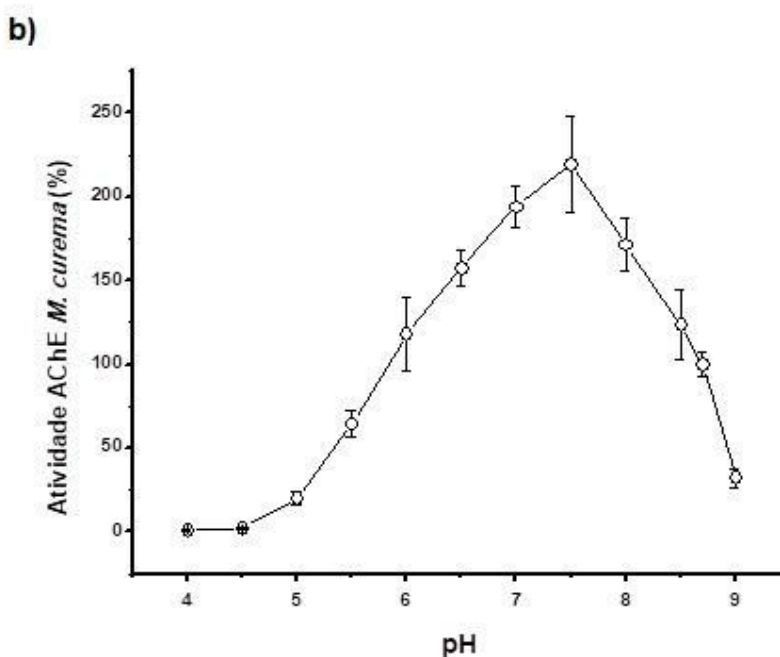
Espécies	Km (mM)	Vmax (U/mg proteína)	Referência
<i>Mugil curema</i> (ASCh) A	0.69	0.201	Trabalho atual
<i>Mugil curema</i> (BSCh) B	1.84	0.0825	Trabalho atual
<i>Mugil curema</i> (PSCh) P	3.51	0.0712	Trabalho atual
<i>Parachromis managuensis</i>	0.587 ± 0.95	0.529 ± 0.98	Araújo <i>et al.</i> , 2016
<i>Cichla ocellaris</i>	0.769 ± 0.27	0.189 ± 0.04	Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Oreochromis niloticus</i>	0.39 ± 0.20	0.218 ± 0.007	Assis <i>et al.</i> , 2012
<i>Oreochromis niloticus</i>	0.10 ± 0.03	0.229 ± 0.014	Rodríguez-Fuentes e Gold-Bouchot, 2004
<i>Pleuronectes vetulus</i>	1.69 ± 0.26	0.482 ± 0.034	Rodríguez-Fuentes <i>et al.</i> , 2008
<i>Pleuronchitis verticalis</i>	0.30 ± 0.07 ^a 0.23 ± 0.06 ^b	0.524 ± 0.032 ^a 0.120 ± 0.08 ^b	Rodríguez-Fuentes <i>et al.</i> , 2008
<i>Colossoma macropomum</i>	0.43 ± 0.02	0.129 ± 0.05	Assis <i>et al.</i> , 2010
<i>Arapaima gigas</i>	0.42 ± 0.09	0.116 ± 0.002	Assis <i>et al.</i> , 2012
<i>Electrophorus electricus</i> ^e	0.45 ± 0.11 0.08 ± 0.1	67.82 ± 1.98 ^c 52.29 ± 6.6	Assis <i>et al.</i> , 2012
<i>Rachycentron canadum</i>	0.43 ± 0.14	0.243 ± 0.02	Assis <i>et al.</i> , 2012

A análise comparativa dos dados representados na Tabela 1, revela que AChE apresentou a maior velocidade de hidrólise do substrato, $V_{max} = 201 \text{ mU/mg}$ comparativamente com BChE cuja V_{max} foi igual a $82,5 \text{ mU/mg}$ e com PChE que apresentou uma V_{max} de $71,2 \text{ mU/mg}$. Quando avalia-se os valores da constante de Michaelis-Menten (K_m) observa-se que AChE teve o menor valor, indicando sua maior afinidade e revelando que AChE é a colinesterase predominante no cérebro de *M. curema*.

A AChE cerebral de *M. curema* no presente estudo apresentou uma temperatura ótima de 40°C e a desnaturação total da enzima só foi observada quando a temperatura chegou próxima aos 80°C (Figura 2a). O pH ótimo para atividade da AChE de *M. curema* foi de 7,5 (Figura 2b).

Figura 2 - Efeitos da temperatura (a) e do pH (b) sobre a atividade da AChE presente no cérebro de *M. curema*





Fonte: O autor (2022)

A atividade ChE do cérebro da espécie *M. curema* apresentou uma forte redução na presença do inibidor específico BW284c51 o que confirma a presença de AChE nesse tecido (Tabela 2). Outras inibições intensas também foram observadas na presença dos inibidores de ChEs totais, Eserina e Neostigmina (Tabela 2). Entretanto, a presença do inibidor Iso-OMPA (Tabela 2) não apresentou grande poder de inibição, comprovando que a atividade enzimática em questão pode ser atribuída à AChE.

O Zn^{2+} foi o único íon que não apresentou inibição significativa ($p > 0,05$) da AChE, para a espécie *M. curema* dentro da faixa de concentração avaliada (0 – 10 mmol/L) (Tabela 2).

O Hg^{2+} foi capaz de inibir em 50% a atividade de AChE ao atingir uma concentração de 16,1 $\mu\text{mol/L}$ apresentando uma taxa de inibição significativa ($p < 0,05$) dentro da faixa de concentração avaliada (0 – 10 mmol/L) (Tabela 2). O Cu^{2+} foi capaz de inibir em 50% a atividade de AChE com uma concentração de 2,59 $\mu\text{mol/L}$, já o As^{2+} só conseguiu atingir essa taxa de inibição com uma concentração de 54,5 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 2).

Quando avaliada a taxa inibitória de alguns pesticidas da categoria dos organofosforados (OPs) e dos carbamatos (CBs) observou-se que o organofosforado Diclorvós apresentou o menor valor de IC_{50} entre todos os pesticidas com efeito

inibitório dentro da faixa de concentração avaliada (0 – 10 mmol/L) com 1,7 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 2). Outro OP avaliado foi o Temefos, no entanto o mesmo não promoveu a redução em 50% da atividade da AChE (IC_{50}) na espécie *M.curema* nas faixas de concentrações avaliadas (Tabela 2). O valor observado da concentração do pesticida CB Carbaril onde ocorreu 50% de inibição da atividade da AChE foi: 6,5 $\mu\text{mol/L}$ e para o outro CB Carbofuran, esse valor foi de 225,0 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores das concentrações capazes de inibir em 50% a atividade enzimática (IC_{50}) para cada um dos compostos testados

Compostos		IC_{50}
Inibidores específicos	BW284c51	34,6
	Iso-OMPA	-----
Inibidores totais	Eserina	0,92
	Neostigmina	1,28
Íons metálicos	Zn^{2+}	213,4
	Hg^{2+}	16,1
	Cu^{2+}	2,59
	As^{2+}	54,5
Pesticidas Organofosforados	Diclorvos	1,7
	Temefos	-----
Pesticidas Carbamatos	Carbaril	6,5
	Carbofuran	225,0

Fonte: O autor (2022)

Quando comparadas as atividades específicas de AChE em *M. curema* nos estuários de Pernambuco em 2019, observa-se que no inverno o Capibaribe diverge estatisticamente ($p < 0,05$) dos dados do verão do próprio Capibaribe e do Formoso

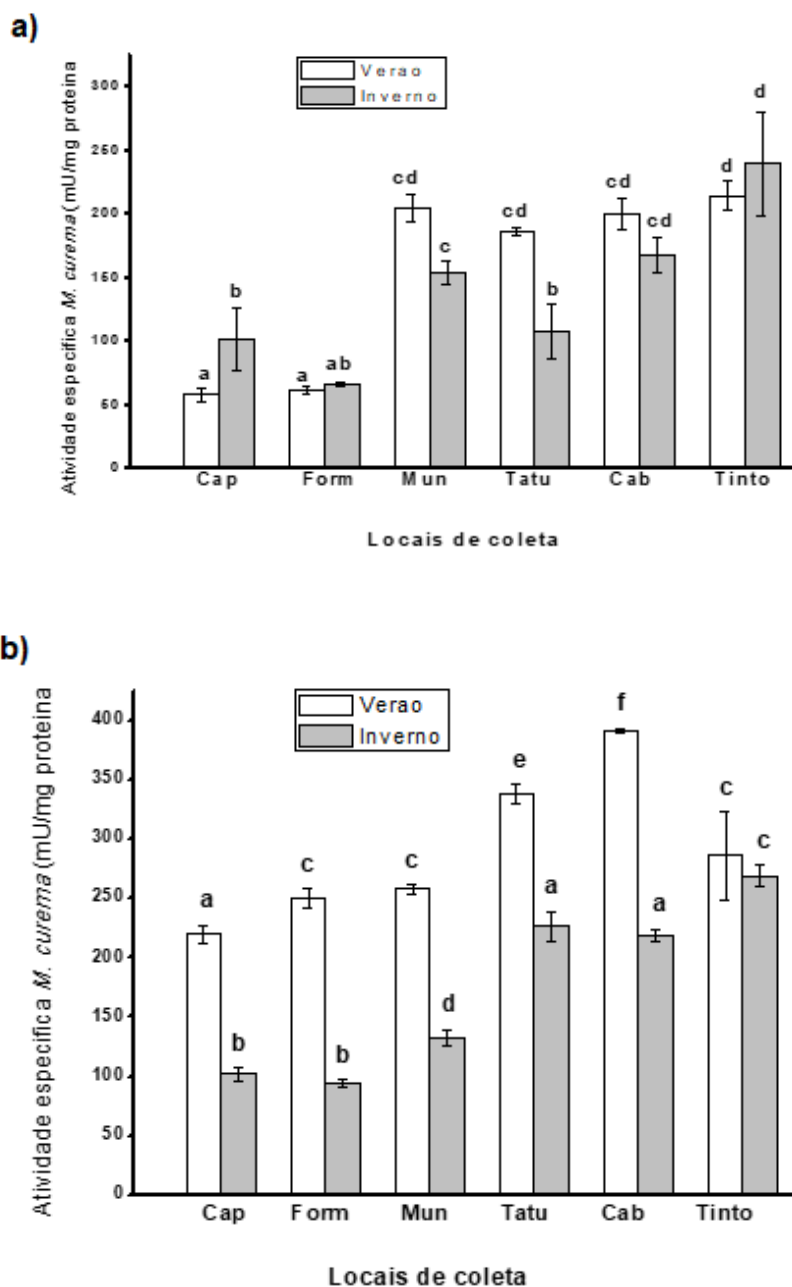
(Figura 3a). Ao analisarmos as atividades específicas de AChE em *M. curema* dos mesmos estuários, porém em 2020, verificamos uma diferença estatística ($p < 0,05$) das atividades do verão de ambos estuários em relação ao inverno (Figura 3b). Comparando os dados de 2019 (Figura 3a) e 2020 (Figura 3b) observa-se que a atividade específica de AChE aumentou significativamente entre os verões, tanto no Capibaribe quanto no Formoso, à medida que ao compararmos os dados do inverno não encontramos diferenças entre as atividades dos respectivos estuários em 2020.

Os dados de atividade observados nos estuários de Alagoas revelam que o Rio Tatuamunha na estação chuvosa diverge estatisticamente dele na estação seca e do Mundaú em ambas as estações no ano de 2019 ($p < 0,05$) (Figura 3a). Quando analisamos os dados de 2020 (Figura 3b) observamos diferença estatística entre as atividades específicas de AChE em ambas as estações (Seca/Chuvosa) dos dois estuários (Mundaú/Tatuamunha). Ao compararmos os dados de 2019 e 2020 constatamos uma tendência de maior atividade de AChE no verão em relação ao inverno de ambos os ciclos climáticos.

Nos estuários da Paraíba as atividades específicas de AChE não divergiram estatisticamente no verão de 2019 ($p > 0,05$), no entanto, apresentaram diferenças significativas no inverno do respectivo ano ($p < 0,05$) (Figura 3a). No verão de 2020 a atividade específica de AChE em Cabedelo (Rio Paraíba) diverge estatisticamente ($p < 0,05$) da atividade verificada para o inverno do próprio estuário e no verão e inverno do Rio Tinto/Mamanguape (Figura 3b). Ao compararmos as atividades de ambos ciclos climáticos, identificamos um aumento nas atividades de AChE entre o verão de 2019 e 2020.

Os resultados revelam que os estuários de Pernambuco no verão de 2019 divergiram estatisticamente de todos os demais estuários ($p < 0,05$), seja na estação seca ou na chuvosa do respectivo ano (Figura 3a). Capibaribe e Formoso apresentaram os menores níveis de atividade da enzima ao passo que Rio Tinto/Mamanguape demonstrou as melhores atividades. Quando analisamos os resultados de 2020 (Figura 3b) constatamos que no respectivo ano os estuários de Pernambuco divergiram estatisticamente de todos os demais estuários durante a estação chuvosa. Cabedelo na estação seca apresentou a maior atividade específica de AChE entre todos os estuários (Figura 3b).

Figura 3 - Atividades específicas da AChE do cérebro de *M. curema* dos estuários da Paraíba, Pernambuco e Alagoas no Verão e Inverno de 2019 (a) e 2020 (b)



Fonte: O autor (2022)

DISCUSSÃO

Observando os valores dos parâmetros cinéticos K_m assim como da taxa máxima de hidrólise V_{max} a colinesterase extraída do cérebro de *M. curema* expressou uma maior afinidade pelo substrato ASCh quando comparada com a afinidade pela BSCh e PSCh (Tabela 1) onde observamos um menor K_m e uma maior

V_{max} para o substrato acetilcolina, indicando uma melhor eficiência na hidrólise do respectivo substrato e evidenciando a maior presença de AChE entre as ChEs do tecido cerebral da espécie. Quando avaliada a exposição aos inibidores específicos, as variações de 0 – 10 mmol/L de concentração do Iso-OMPA (inibidor específico de BChE) não foram capazes de inibir 50% da atividade enzimática. Em contrapartida, quando exposta ao inibidor BW284c51 (inibidor específico da AChE) observa-se um IC₅₀ com uma concentração de 34, 6 µg/ml confirmando que a ChE predominante no cérebro de *M. curema* é a AChE. Outros estudos utilizando espécies de peixes estuarinos e marinhos apresentam dados similares aos observados para *M. curema* quanto a atividade de BChE em tecido cerebral (LOPES *et al.*, 2019; VIEIRA E NUNES, 2021) alguns revelam uma maior atividade desta enzima no plasma e em tecidos hepáticos (PARRINO *et al.*, 2020; OLIVARES E ESPINOSA, 2021). Os inibidores de colinesterases totais (Neostigmina e Eserina) ratificam a presença de atividade colinesterásica no cérebro de *M. curema*.

A AChE de *M. curema* atingiu sua atividade máxima a uma temperatura de 40°C, temperatura considerada normal para um peixe de regiões tropicais em comparação com outras espécies (ARAÚJO *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2019). Ao atingir os 60°C a atividade de AChE reduziu em 50% comparada a temperatura ótima (40°C) e a inibição total da atividade ocorreu quando a temperatura chegou próxima aos 80°C. Alguns estudos relatam uma inibição total da atividade de AChE do cérebro de espécies de peixes ao atingir 60°C (ASSIS *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2019) revelando que *M. curema* apresenta uma melhor tolerância às variações de temperatura que promovam inibição das atividades colinesterásicas no tecido cerebral.

O pH em que a espécie apresentou atividade máxima foi de 7,5. Este valor assemelhasse aos observados para várias espécies de peixes que vivem ou transitam pelos ambientes estuarinos (ASSIS *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2019). É possível notar que em pH entre as faixas de 7,0 a 8,0 a atividade de AChE foi superior a 80% da atividade ótima. Isso revela que de forma similar a temperatura, o pH também apresenta uma excelente amplitude para atividades da AChE em *M. curema* alinhando-se com resultados observados por outros autores em espécies de peixes (MONTEIRO *et al.*, 2005; AHMAD *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2019). A excelente resistência da AChE de *M. curema* diante das variações do pH e da temperatura comprovam a importância da utilização da espécie como sentinela em estudos de

biomonitoramento de ambientes com elevados níveis de flutuação destes parâmetros como os estuários.

Alguns íons metálicos podem inibir a atividade da AChE como já relatado por vários trabalhos na literatura (ASSIS *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2022). Em nosso estudo o Cu^{2+} apresentou a menor concentração capaz de inibir 50% da atividade de AChE $IC_{50} = 2,59 \mu\text{mol/L}$ revelando ser entre os íons testados o de maior poder inibitório. Araújo *et al.* (2016) em trabalho realizado com a espécie *P. managuensis* revelam padrões semelhantes do poder inibitório do Cu^{2+} ao expor a enzima ao respectivo íon. O Hg^{2+} inibiu 100% da atividade de AChE ao atingir a concentração de 0,1 mmol/L apresentando um $IC_{50} = 16,1 \mu\text{mol/L}$. Inibições ocasionadas por baixas concentrações de Hg^{2+} foram reportadas em trabalho realizado por Nordin *et al.* (2021) onde a AChE cerebral da espécie *Diodon hystrix* (Peixe espinho) foi inibida em 50% quando exposta a baixas concentrações do íon. O As^{2+} apresentou um $IC_{50} = 64,6 \mu\text{mol/L}$ e apesar de não apresentar o mesmo poder inibitório dos íons Cu^{2+} e Hg^{2+} também foi capaz de inibir em 50% a atividade da AChE em baixas concentrações. Resultados similares foram observados por Assis *et al.* (2015) que constataram poder inibitório em baixas concentrações do As^{2+} para as espécies *O. niloticus*, *C. macropomum*, *E. electricus* e *R. canadum* e não observaram poder inibitório acima de 50% para a espécie *A. gigas*. Dentre os íons avaliados o Zn^{2+} foi o único a não apresentar valores inibitórios significativos. Tais resultados assemelham-se aos observados por Santos *et al.* (2022) em trabalho realizado com a espécie de mexilhão *Mytella charruana* que dentre os íons metálicos avaliados teve o Zn^{2+} com o menor poder inibitório da AChE. Dos quatro íons cujos efeitos sobre a AChE de *M. curema* foram investigados, três tiveram efeito inibitório em ordem decrescente: $\text{Cu}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{As}^{2+}$. A sensibilidade de *M. curema* na resposta aos íons Cu^{2+} , Hg^{2+} e As^{2+} reforça a importância da AChE como biomarcador dos respectivos íons e a capacidade da espécie como excelente bioindicadora das condições ambientais.

A AChE também apresenta alta sensibilidade para alguns pesticidas organofosforados (OPs) e carbamatos (CBs) (ALBENDÍN *et al.*, 2016). O Diclorvos representa o composto mais volátil entre os OPs e apresentou a maior afinidade e poder inibitório contra a atividade da AChE de *M. curema*, com um $IC_{50} = 1,7 \mu\text{mol/L}$. O Temefos foi outro OP avaliado, no entanto não apresentou valores de IC_{50} dentro das faixas de concentrações testadas (0 – 10 mmol/L). Quando analisamos os CBs

observamos que o Carbaril apresentou maior poder inibitório $IC_{50} = 6,5 \mu\text{mol/L}$ quando comparado ao Carbofuran $IC_{50} = 225,0 \mu\text{mol/L}$. Tais achados expõem a importância de utilização da AChE como biomarcador de exposição a tais contaminantes, principalmente nas regiões que recebem aporte dessas substâncias (ASSIS *et al.*, 2012; SEVERO *et al.*, 2020; MARINS *et al.*, 2021).

A AChE apresenta uma atividade que quando inibida promove grave comprometimento fisiológico das espécies de ambientes marinhos e estuarinos (VIEIRA *et al.*, 2009; DUARTE *et al.*, 2019; MENA *et al.*, 2022). Tal inibição é indicativa de poluição ambiental provocada por agentes neurotóxicos (ARAÚJO *et al.*, 2018; DUARTE *et al.*, 2019). Alguns trabalhos sugerem a quantificação da atividade da AChE como a melhor maneira de indicar a contaminação ambiental por pesticidas OPs e CBs (SEVERO *et al.*, 2020; MARINS *et al.*, 2021; MENA *et al.*, 2022).

Quando avaliada a atividade da AChE de *M. curema* dos seis sistemas estuarinos nos dois anos (2019 e 2020) e nos dois ciclos climáticos (Inverno e Verão) observamos que os estuários de Pernambuco (CAP e FOR) divergem estatisticamente de todos os demais estuários quando analisamos os dados relativos ao verão de 2019 e inverno de 2020. É consolidado na literatura que o estuário do Rio Capibaribe sofre forte pressão antrópica advinda das mais diversas atividades humanas que acontecem no seu entorno (RÉGIS *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2019; PARDAL *et al.*, 2019). No entanto, Rio Formoso aparece em alguns estudos de diagnóstico ambiental com sendo área pouco impactada (LIMA *et al.*, 2019; FALCÃO *et al.*, 2020). Nesse sentido, os resultados aqui revelados indicam que Rio Formoso vem gradativamente perdendo o status de área preservada e que as Áreas de Proteção Ambiental (APAs) de Guadalupe e Costa dos Corais tem sido pouco efetivas na preservação da espécie objeto de estudo, pelos baixos níveis quantificados de atividade da AChE no tecido cerebral de *M. curema*. O estuário do Rio Tinto/Mamanguape e o do Rio Paraíba (Cabedelo) apresentaram as melhores atividades da AChE no inverno de 2019 e verão de 2020. No entanto, alguns trabalhos retratam a forte pressão antrópica que estes estuários sofrem, como os realizados por Pereira *et al.* (2020) que analisaram a bioacumulação de metais nos tecidos de várias espécies de peixes e invertebrados do estuário do Rio Mamanguape, identificando concentrações acima dos limites estabelecidos pela legislação para consumo humano, inclusive na espécie *M. curema*. Quando comparamos os resultados de 2019 e 2020 também observamos que entre as estações secas dos respectivos anos há

um aumento nítido das atividades específicas da AChE em 2020. Tal evidência sugere que a redução das atividades antrópicas devido ao lockdown imposto pela pandemia da covid-19 melhorou as condições ambientais dos estuários avaliados. Alguns trabalhos retratam melhorias das condições ambientais de ecossistemas aquáticos após o isolamento social (EDWARD *et al.*, 2021; MALLIK *et al.*, 2022). De maneira oposta, ao analisarmos os dados da estação chuvosa observamos baixos níveis de atividade da AChE mesmo no ano pandêmico de 2020. Tal evidência pode ser explicada pela suspensão de contaminantes depositados nos sedimentos com o maior aporte de água nos estuários devido a estação chuvosa e como *M. curema* possui alimentação majoritariamente detritívora (VOLLRATH *et al.*, 2021), alimentando-se de elevadas quantidades de matéria orgânica sedimentar, esse maior contato acaba evidenciando mudanças significativas do marcador enzimático.

Os dados de atividades da AChE aqui apresentados reforçam a urgência de um melhor gerenciamento ambiental das áreas estudadas, afim de tonar as APAs de fato efetivas na preservação da biodiversidade local e de buscar soluções para as áreas historicamente degradadas.

CONCLUSÕES

- A cinética de hidrólise dos substratos e os inibidores específicos comprovaram a maior prevalência da AChE entre as ChEs presentes no cérebro de *M. curema*;
- A temperatura de melhor atividade da enzima foi 40°C, reduzindo a atividade em 50% (IC₅₀) ao atingir os 60°C e tendo 100% das suas atividades inibidas apenas quando a temperatura chegou próxima aos 80°C. Revelando a excelente amplitude térmica de atividade da enzima, característica fundamental para utilizá-la como biomarcadora de contaminantes ambientais;
- O pH ótimo foi de 7,5 e assemelhasse ao de outras espécies de peixes estuarinos;
- Entre os pesticidas o organofosforado Diclorvos apresentou a maior afinidade e poder inibitório contra a atividade da AChE de *M. curema*;
- Dos quatro íons cujos efeitos sobre a AChE de *M. curema* foram investigados, três tiveram efeito inibitório em ordem decrescente: $\text{Cu}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{As}^{2+}$
- Os dados de atividade específica da AChE em *M. curema* sugerem que os estuários de Pernambuco encontram-se mais impactados quando comparados aos de Alagoas e Paraíba;

- O estuário com as melhores taxas de atividade enzimática foi o do Rio Tinto/Mamanguape no inverno de 2019 e no Rio Paraíba (CAB) no verão de 2020;
- Os dados de atividade da AChE observados nos estuários inseridos nas APAs comparados aos estuários das regiões metropolitanas não são capazes de justificar a grande importância que as APAs possuem para preservação da enorme biodiversidade que tais regiões estuarinas abrigam.
- Os resultados aqui apresentados reforçam a necessidade de um melhor gerenciamento das APAs ao longo do litoral brasileiro.

DADOS SUPLEMENTARES

Figura 4 - a) Cinética de Michaelis-Menten da AChE do cérebro de *M. curema* usando o substrato acetilticolina (ASCh) b) Cinética de Michaelis-Menten da BChE do cérebro de *M. curema* usando o substrato butirilticolina (BSCh) e c) Cinética de Michaelis-Menten da PChE do cérebro de *M. curema* usando o substrato propionilticolina (PSCh)

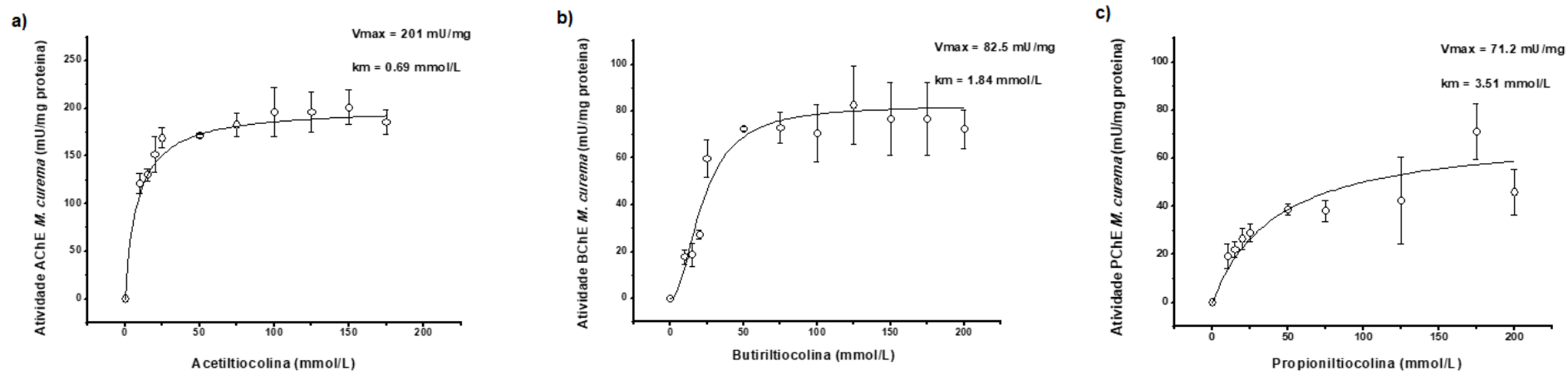
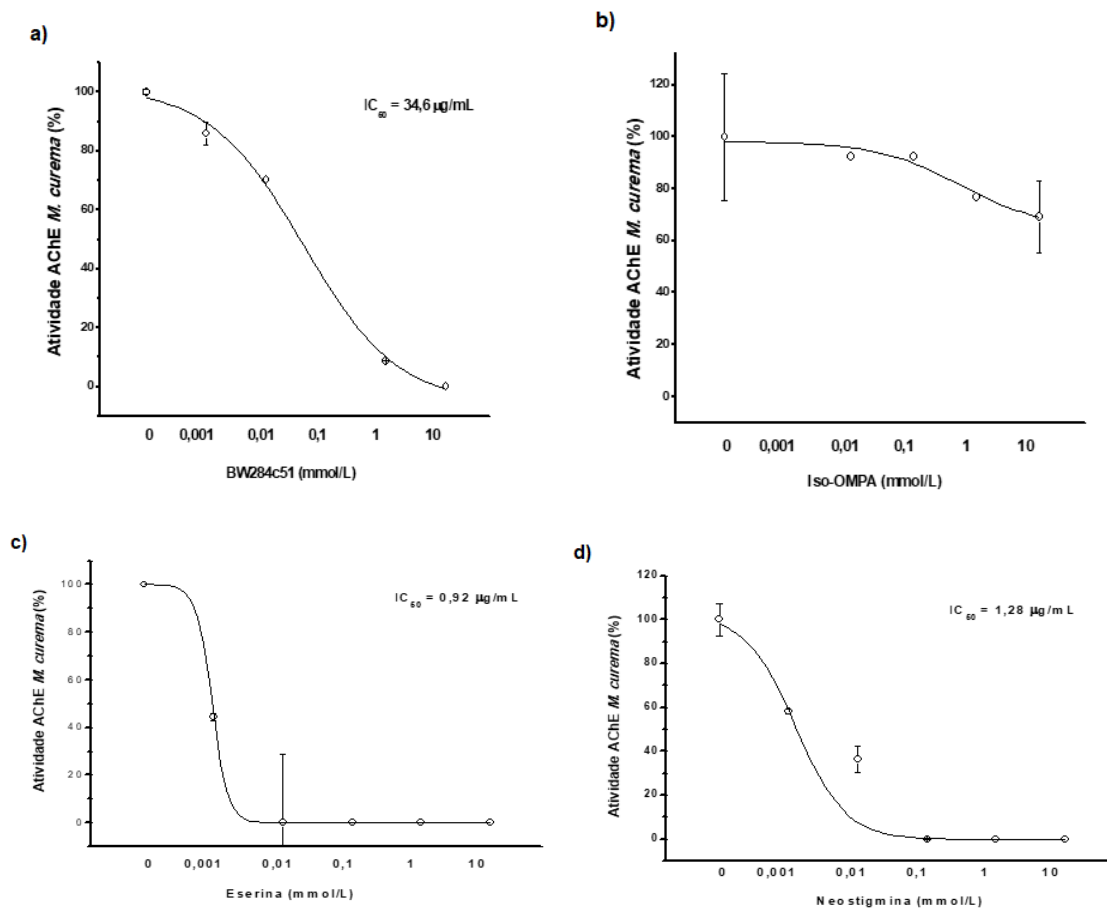
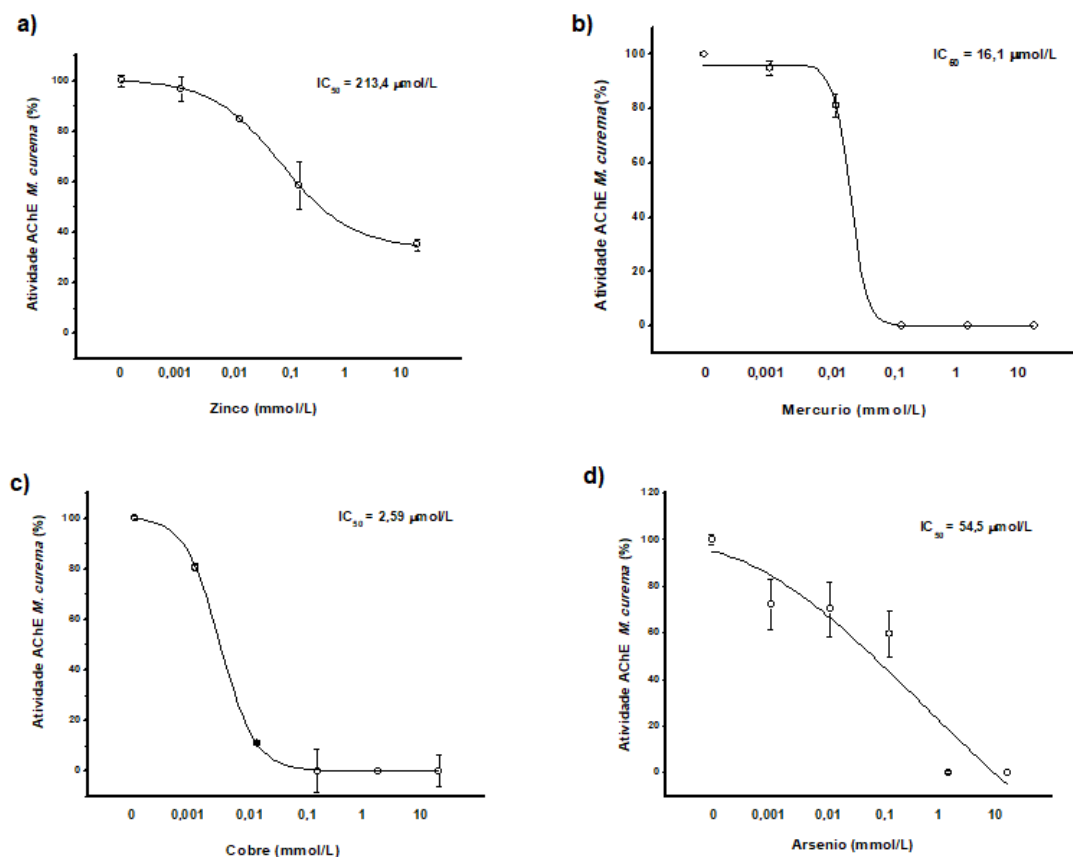


Figura 5 - Efeito dos inibidores seletivos sobre a atividade da AChE presente no tecido cerebral de *M. curema*. a) BW284c51; b) Iso – OMPA; c) Eserina e d) Neostigmina



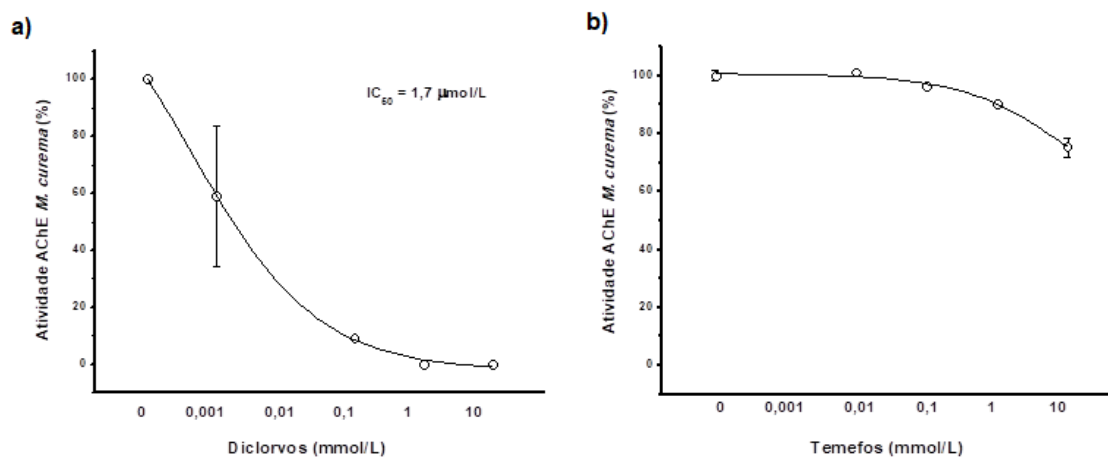
Fonte: O autor (2022)

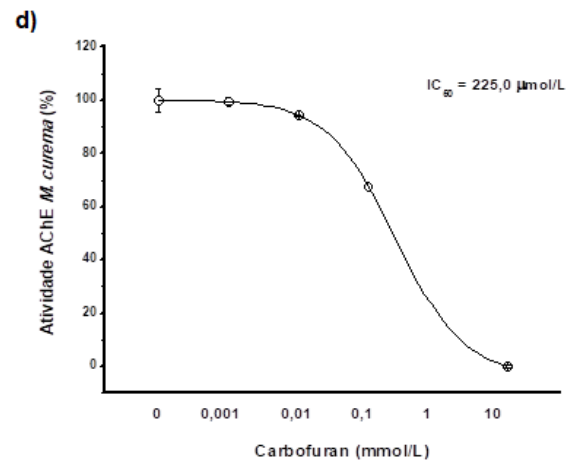
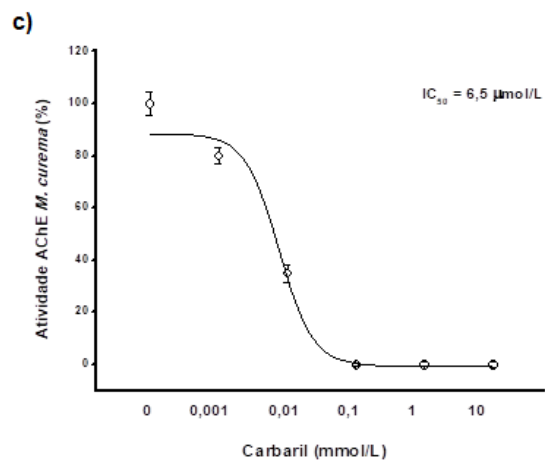
Figura 6 - Efeito dos íons metálicos sobre a atividade da AChE presente no tecido cerebral da espécie *M. curema* a) Zn^{2+} ; b) Hg^{2+} ; c) Cu^{2+} e d) As^{2+}



Fonte: O autor (2022)

Figura 7 - Efeito dos pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a atividade da AChE presente no tecido cerebral da espécie *M. curema*. a) Diclorvos, b) Temefos, c) Carbaril e d) Carbofuran





Fonte: O autor (2022)

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. A. et al. Evaluation of acetylcholinesterase source from fish, for detection of carbamate. **Journal of Environmental Biology**, v. 37, n. 4, p. 479, 2016.
- KARCZMAR, A. Invited Review Anticholinesterases: dramatic aspects of their use and misuse. **Neurochemistry International**, [S.L.], v. 32, n. 5-6, p. 401-411, maio 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0197-0186\(97\)00123-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0197-0186(97)00123-x)
- ALBENDÍN, G. et al. Characterization and in vitro sensitivity of holinesterases of gilthead seabream (*Sparus aurata*) to organophosphate pesticides. **Fish. Physiol. Biochem**, 43 (2), 455–464, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0299-y>2016.
- ARAÚJO, M. C. et al. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): from physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 177, p. 182-189, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.019>
- ARAÚJO, M. C. et al. Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 205, p. 213-226, 2018.
- ASSIS, C. R. D. et al. Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. **Fish Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 40, n. 6, p. 1659-1668, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-014-9956-1>
- ASSIS, C. R. D. et al. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [S.L.], v. 29, n. 10, p. 2243-2248, 24 jul. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.272>
- ASSIS, C. R. D. et al. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 441, p. 141-150, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.058>
- ASSIS, C.R.D. et al. Effect of ions on the activity of brain acetylcholinesterase from tropical fish. **J. Coastal Life Medicine**, 3, 505-514, 2015.
- BONACCI, S. et al. Biomonitoring Aquatic Environmental Quality in a Marine Protected Area: a biomarker approach. **Ambio: A Journal of the Human Environment**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 308-315, jun. 2007. Royal Swedish Academy of Sciences. [http://dx.doi.org/10.1579/0044-7447\(2007\)36\[308:baeqia\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1579/0044-7447(2007)36[308:baeqia]2.0.co;2)
- BRIMIJOIN, S. et al. Physiological roles for butyrylcholinesterase: a bche-ghrelin axis. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 259, p. 271-275, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.013>

COUSIN, X.; STRÄHLE, U.; CHATONNET, A. Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models. **Bioessays**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 189-200, 21 jan. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20153>

ÇOKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turk. J. Biochem**, v 28, p 54-61, 2003.

DAI, Y.J. et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 11-17, 4 dez. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2406>

DUARTE, I. A. et al. Biomarker and behavioural responses of an estuarine fish following acute exposure to fluoxetine. **Marine environmental research**, v. 147, p. 24-31, 2019.

EDWARD, J.K. et al. COVID-19 lockdown improved the health of coastal environment and enhanced the population of reef-fish. **Marine pollution bulletin**, v. 165, p. 112124, 2021.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 88-95, jul. 1961. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

GHAZALA., M. et al. Fish Cholinesterases as Biomarkers of Sublethal Effects of Organophosphorus and Carbamates in Tissues of Labeo Rohita. **Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 137-142, 19 dez. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.21545>

GNAGEY, A L; FORTE, M; ROSENBERRY, T L. Isolation and characterization of acetylcholinesterase from Drosophila. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 262, n. 27, p. 13290-13298, set. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)45200-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258(18)45200-3)

HYNE, R.V; MAHER, A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 366-374, mar. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0147-6513\(02\)00119-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0147-6513(02)00119-7)

KELLAR, K.J. Overcoming inhibitions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, 13263–13264, 2006.

KOPECKA, J.; PEMPKOWIAK, J. Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 379-391, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.05.017>

LATORRE, F.R.; SALIBIÁN, A.; FERRARI, L.. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. **Chemosphere**, [S.L.], v. 68, n. 8, p. 1582-1590, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.033>

LOPES, D.F.C. et al.. Acetilcolinesterase cerebral de três perciformes: da caracterização ao efeito in vitro de íons metálicos e pesticidas. **Ecotoxicologia e Segurança Ambiental**, v. 173, p. 494-503, 2019.

MARINS, A.T. et al. Environmentally relevant pesticides induce biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 585-598, 2021.

MENA, F. et al. Biotransformation and oxidative stress responses in fish (*Astyanax aeneus*) inhabiting a Caribbean estuary contaminated with pesticide residues from agricultural runoff. 2022.

MALLIK, A. et al. Impact of COVID-19 lockdown on aquatic environment and fishing community: Boon or bane?. **Marine Policy**, v. 141, p. 105088, 2022.

MONTEIRO, M. et al. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: application to biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 3, p. 341-347, 2005.

NORDIN, N. et al. Acetylcholinesterase (AChE) of *Diodon hystrix* brain as an alternative biomolecule in heavy metals biosensing. **Journal of Applied Science and Engineering**, v. 25, n. 3, p. 473-480, 2021.

NUNES, B. et al. Combination effects of anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. **Environ Sci Pollut Res** 21:6258–6262. 2014.

OLIVARES-RUBIO, H.F.; ESPINOSA-AGUIRRE, J.J. Acetylcholinesterase activity in fish species exposed to crude oil hydrocarbons: A review and new perspectives. **Chemosphere**, v. 264, p. 128401, 2021.

PARRINO, V. et al. Environmental assessment of the pesticides in *Parablennius sanguinolentus* along the Western Calabrian coast (Italy). **Regional Studies in Marine Science**, v. 36, p. 101297, 2020.

PEREIRA, EA.A. et al.. Sediment and tissue analysis for metals in a tropical estuary. **Regional Studies in Marine Science**, v. 38, p. 101358, 2020.

PEZZEMENTI, L.; CHATONNET, A. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 187, n. 1-3, p. 27-33, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.043>

PEZZEMENTI, L.; SANDERS, M.; JENKINS, T.; HOLLIMAN, D. In: Massoulié, J., Bacou, F., Barnard, E., Chatonnet, A., Doctor, B., Quinn, D. (Eds.), Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology. USA: **American Chemical Society**, p 24 – 31, 1991.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G.. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus). **Marine Environmental Research**, [S.L.], v. 58, n. 2-5, p. 505-509, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.037>

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; ARMSTRONG, J.; SCHLENK, D. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 69, n. 3, p. 466-471, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.06.008>

SEDMAK, J.J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 79, n. 1-2, p. 544-552, maio 1977. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90428-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(77)90428-6)

SEVERO, E.S. Ecological risk of pesticide contamination in a Brazilian river located near a rural area: a study of biomarkers using zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, p. 110071, 2020.

SILVA, K.C.C. et al. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 126, p. 191-197, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.001>

SOUZA, P.R. et al. Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: a highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 197, p. 109-121, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.008>

TALESA, V. et al. Propionylcholinesterase from *Murex brandaris*: comparison with other invertebrate cholinesterases. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, [S.L.], v. 96, n. 1, p. 39-43, jan. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(90\)90041-7](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(90)90041-7)

VIEIRA, L.R. et al. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. **Chemosphere**, v. 76, n. 10, p. 1416-1427, 2009.

VIEIRA, M.; NUNES, B. Colinesterases de peixes marinhos: caracterização e sensibilidade a substâncias químicas específicas. **Environ Sci Pollut Res**, 28, 48595–48609 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13748-2>

VOLLRATH, S.R. et al. Trophic niches and diet shifts of juvenile mullet species coexisting in marine and estuarine habitats. **Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom**, [S.L.], v. 101, n. 2, p. 431-441, mar. 2021. Cambridge University Press (CUP).

WANG, C.G. et al. Effect of tributyltin, benzo[a]pyrene, and their mixture on the hepatic monooxygenase system in *Sebastiscus marmoratus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v 75, p 1214–1219, 2005.

4.3 ARTIGO 3

Alterações histopatológicas nas brânquias e fígado da espécie *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae) como diagnóstico da saúde ambiental de sistemas estuarinos da região Nordeste do Brasil

Anderson Rodrigues Balbino de Lima^{*1,3}, Mayara dos Santos Rodrigues⁴ Mônica Lúcia Adam^{1,2}, Karla Barbosa Teixeira² Ranilson de Souza Bezerra³ Luís Fernando Fávaro⁴

1. Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
2. Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil.
3. Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
4. Centro Politécnico, Departamento de Biologia Celular – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

*Autor correspondente: Email: anderson_rodrigues.184@hotmail.com

Resumo

O uso da ferramenta histológica permite aferir os efeitos de poluentes orgânicos e inorgânicos, além de outros estressores sobre peixes. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi sugerir os níveis de saúde ambiental de sistemas estuarinos da região nordeste do Brasil, localizados em regiões metropolitanas e em Áreas de Proteção Ambiental – APAs, através dos marcadores histológicos (brânquia e fígado) da espécie *Mugil curema*. As coletas para a obtenção dos espécimes, totalizando 101 exemplares, foram realizadas nos estuários da Paraíba (Rios Paraíba e Mamanguape) Pernambuco (Rios Capibaribe e Formoso) e Alagoas (Lagoa Mundaú e Rio Tatuamunha), coletados no inverno e verão de 2019. Os tecidos das brânquias e fígado foram fixados em formol 10%, preservados em álcool 70% e, posteriormente, submetidos ao processamento histológico de rotina (desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina). A análise histopatológica dos tecidos

seguiu um protocolo adaptado ao descrito por Bernet (1999). Com relação aos valores do Índice de Bernet encontrados na brânquia de peixes coletados em cada estuário, tanto no verão quanto no inverno, houve diferença significativa com $p = 0,0004$. Entretanto, no fígado a ANOVA não indicou diferença significativa no índice entre estação e estuário ($p = 0,1824$). As análises histopatológicas das brânquias e fígado revelaram que os estuários do nordeste do Brasil encontram-se ameaçados pela contaminação dos recursos hídricos e a necessidade de criação de programas de biomonitoramento a fim de um melhor gerenciamento desses ecossistemas na região Nordeste do Brasil.

Palavras-chave: Contaminação; Estuários; Histopatológica; Peixes; Tainha.

INTRODUÇÃO

Os estuários caracterizam-se por constituírem áreas de transição entre o ambiente dulcícola e os oceanos, sendo um importante berçário para inúmeras espécies pela enorme diversidade de recursos alimentares e pela proteção natural que as regiões de manguezais conferem a esses ecossistemas (SALAS *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2022). No Brasil, boa parte das grandes cidades desenvolveram-se nas regiões litorâneas, próximas a áreas estuarinas. Esse fato deve-se as características dessas regiões que favorece o escoamento da produção agrícola e industrial, através da atividade portuária, além da facilidade de captação de água doce para consumo humano (LIMA *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2022). Na Região Nordeste oito das nove capitais situam-se nas áreas costeiras, isso revela que a maior densidade populacional encontra-se no litoral (IBGE, 2017).

As inúmeras demandas das populações humanas exercem uma forte pressão antrópica nos estuários, através da descarga de esgoto doméstico, industrial e dos resíduos de pesticidas utilizados na produção agrícola (LETSINGER *et al.*, 2019; SALDARRIAGA-HERNANDEZ *et al.*, 2020). Em especial, os resíduos industriais são responsáveis por inúmeros impactos e a descarga de metais pesados preocupa não apenas a saúde ambiental das regiões costeiras no Brasil, mas também em nível mundial (JIAO *et al.*, 2018; SAMANTA E DALAI, 2018; EL-AMIER *et al.*, 2021). Paralelamente, os pesticidas e herbicidas utilizados nas plantações de cana-de-

açúcar que constituem a principal produção agrícola das áreas costeiras do nordeste do Brasil também despertam grande preocupação devido aos danos provocados nos estuários e em toda biota associada (LIMA *et al.*, 2019; ALVES *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021). O Grande desafio que se lança a toda comunidade científica é a realização de diagnósticos periódicos e de um monitoramento constante das regiões estuarinas, a fim de garantir a sobrevivência das inúmeras espécies que residem ou transitam por essas áreas (LIMA *et al.*, 2019; FALCÃO *et al.*, 2020; MAHARDJA *et al.*, 2021).

Os peixes consistem em excelentes organismos bioindicadores da qualidade ambiental dos recursos hídricos, pois bioacumulam inúmeras categorias de contaminantes orgânicos e inorgânicos por absorção direta da água ou indiretamente pelo consumo de presas contaminadas (KROON *et al.*, 2017; LOPES, 2021; REBOA *et al.*, 2022). A escolha de uma espécie sentinela e que apresente sensibilidade, tornando possível mensurar potenciais riscos ou perigos para elas mesmas e para outras espécies é fundamental em estudos de diagnóstico e biomonitoramento (LIMA *et al.*, 2019; FALCÃO *et al.*, 2020).

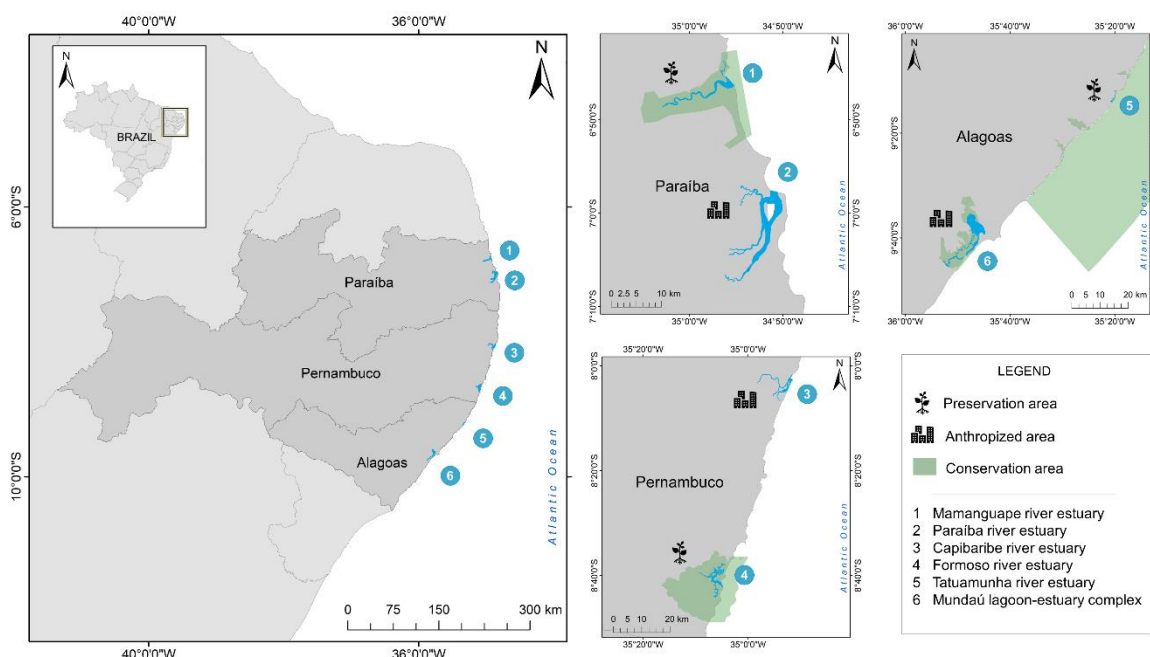
A utilização de biomarcadores histopatológicos vem crescendo substancialmente nas últimas décadas nos estudos de diagnóstico e monitoramento ambiental dos recursos hídricos e biológicos (STENTIFORD *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2018; CASTRO *et al.*, 2019). Outro fator importante é a escolha dos órgãos que serão alvos de estudo. Órgãos de contato direto com o agente toxicante, como as brânquias e os órgãos de metabolismo e excreção de xenobióticos, como o fígado, podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos de peixes (AMEUR *et al.*, 2015; BORGES *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2021). O fígado por ser um órgão detoxificador e bioacumular contaminantes é comumente utilizado em estudos histopatológicos e as brânquias são igualmente importantes por seu papel fundamental nas trocas gasosas e na regulação osmótica dos peixes (LIMA *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021). No presente estudo utilizamos a espécie *Mugil curema* conhecida popularmente como “tainha” para através do marcador histológico (Brânquias e Fígado) diagnosticar possíveis impactos em seis sistemas estuarinos da Região Nordeste do Brasil e sugerir os níveis de conservação destes e da espécie objeto do estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem

As áreas de estudo incluem seis sistemas estuarinos localizados ao longo do litoral da Paraíba (PB), Pernambuco (PE) e Alagoas (AL), nordeste do Brasil (Figura 1). Os estuários foram selecionados conforme os diferentes níveis de conservação, descritos pelos órgãos ambientais estaduais: Instituto do Meio Ambiente de Alagoas - IMA, Superintendência do Meio Ambiente da Paraíba – SUDEMA e pela Agência Estadual do Meio Ambiente de Pernambuco - CPRH que realizam monitoramentos sistemáticos da qualidade da água nas bacias hidrográficas de Alagoas, Paraíba e Pernambuco, respectivamente. Em cada um dos estados foram selecionados dois estuários, um inserido em Área de Preservação Ambiental (APA) e outro próximo a região metropolitana da capital do respectivo estado (Figura 1).

Figura 1 - Mapa do litoral brasileiro evidenciando a localização dos estuários ao longo dos estados da Paraíba (1 e 2), Pernambuco (3 e 4) e Alagoas (5 e 6). Os símbolos indicam as áreas de proteção ambiental e as regiões metropolitanas



Fonte: O autor (2022)

O total de 101 espécimes de *M. curema* foram coletados nos seis estuários distribuídos ao longo dos litorais da PB, PE e AL (Tabela 1). As coletas foram realizadas no Verão (Janeiro – Fevereiro) ou no Inverno (Junho – Julho) de 2019.

Tabela 1 - Unidades federativas, estuários e número de espécimes coletados no Verão e Inverno de 2019

Estados	Estuários	Nº de Espécimes Coletados	
		Verão/2019	Inverno/2019
PE	Rio Capibaribe	10	7
PE	Rio Formoso	8	7
AL	Lagoa Mundaú	8	8
AL	Rio Tatuamunha	8	9
PB	Rio Paraíba	10	8
PB	Rio Mamanguape	8	10

Fonte: O autor (2019)

Os Tecidos das brânquias e fígado foram os escolhidos para a realização da análise histopatológica. A brânquia por ser o órgão da superfície corporal em maior contato com a água circulante e desta maneira constituir o primeiro alvo dos poluentes de origem hídrica, sendo as alterações histológicas deste tecido uma resposta indicativa dos estressores ambientais e o fígado com órgão fundamental do metabolismo, sendo responsável pelo processo de detoxificação de substâncias tóxicas.

Os espécimes de *M. curema* tiveram amostras do segundo arco branquial direito e do fígado removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% por 24 horas. Após a fixação, o segundo arco branquial direito foi descalcificado em ácido nítrico a 10%. Subsequentemente os tecidos das brânquias e fígados seguiram para as etapas de desidratação em série alcóolica crescente (70%, 80%, 90% e 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo na espessura de 5µm e os cortes foram sobrepostos em lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).

Histopatologia

A análise histopatológica dos tecidos seguiu um protocolo adaptado ao descrito por Bernet *et al.* (1999), que se baseia no fator de importância patológica (w) e no

valor de pontuação (a) de cada lesão histopatológica, que são classificadas em padrões de reação indicados na Tabela 2.

O valor de pontuação (a) pode assumir pesos que variam de 0 a 6, que podem indicar: nenhuma ocorrência (0); pouca ocorrência (1-2); ocorrência frequente (3-4); ocorrência muito frequente (5-6). Estes valores foram atribuídos para cada indivíduo no momento de leitura das lâminas.

O fator de importância patológica (w) está relacionado com a reversibilidade do dano, e indica a relevância da lesão no funcionamento do órgão e na capacidade de sobrevivência do peixe. Para cada lesão foi atribuído um valor fixo de 1 a 3, que indica: importância patológica mínima (1); importância patológica moderada (2); importância patológica acentuada (3), conforme indicado na Tabela 2.

Por meio dos indicadores apresentados acima, foi possível calcular o Índice de órgãos (I_{org}) que representa o grau de dano em cada um dos órgãos analisados, conforme equação abaixo:

$$I_{org} = \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$$

Onde: org = órgão (constante); rp = padrão de reação; alt = alteração; a= valor da pontuação; w= fator de importância patológica.

Foram quantificadas as seguintes lesões nas brânquias: aneurisma, deslocamento epitelial, desestruturação das lamelas, hipertrofia, hiperplasia, edema e fusão lamelar. Para o tecido hepático foram quantificadas as seguintes lesões: congestão, centro de melanomacrófagos, infiltração leucocitária e necrose (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores de fator de importância (w) e respectivas lesões histopatológicas consideradas para a determinação do índice de Bernet de cada brânquia e fígado coletados.

Padrão de reação	Lesão	Relevância patológica (w)
Brânquia		
Distúrbio circulatório	Aneurisma	2
	Edema	1
Mudanças regressivas	Deslocamento de epitélio	1
	Atrofia	3
	Desestruturação	1
	Necrose	3
	Fusão	2
Mudanças progressivas	Hiperplasia	2
	Hipertrofia	1
Fígado		
Distúrbio circulatório	Congestão	1
Mudanças regressivas	Necrose	3

Inflamação	Centros de Melanomacrófagos	1
	Infiltração leucocitária	2

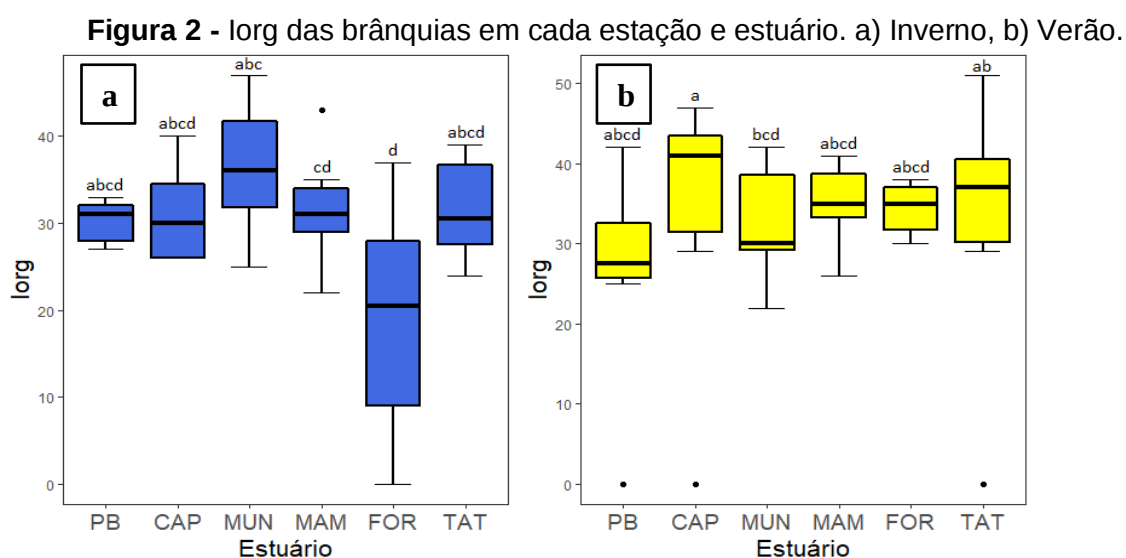
Fonte: Bernet et al., 1999

Análise estatística

A fim de verificar a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Em seguida, utilizou-se a análise de variância paramétrica bifatorial (ANOVA de duas vias), seguida pelo teste de Tukey HSD, com nível de significância de 0.05. Todos os testes estatísticos foram realizados pelo software R versão 4.1.2.

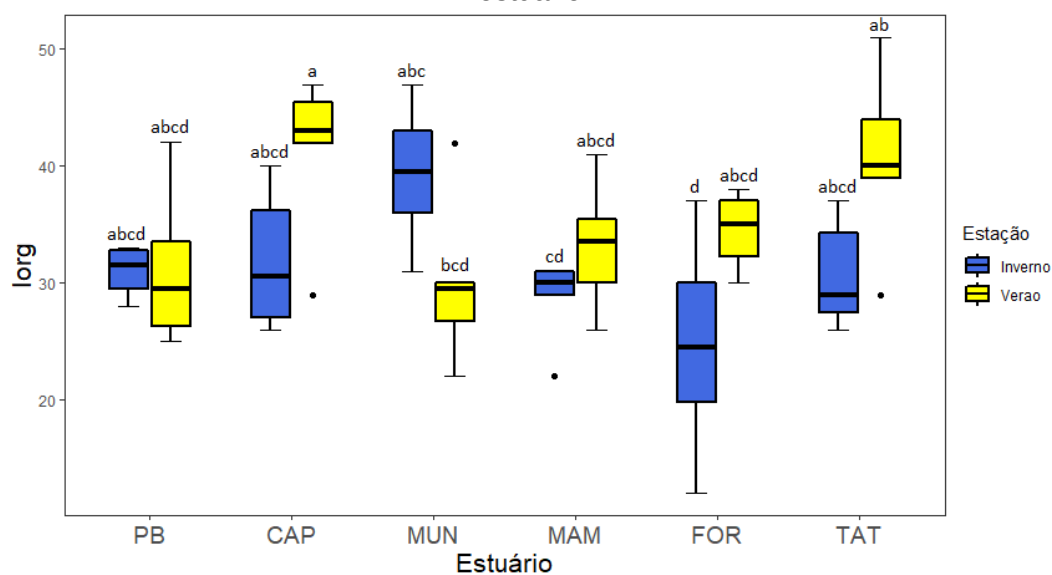
RESULTADOS

Com relação aos valores do Índice de Bernet encontrados na brânquia de peixes coletados em cada estuário, tanto no verão quanto no inverno, houve diferença significativa com $p = 0,0004$. A Figura 2 evidencia a diferença entre os estuários em cada estação, com letras diferentes indicando diferença significativa. Foi possível observar diferença entre estuários ($p = 0,0134$), com divergência entre os rios pernambucanos Formoso e Capibaribe. Ainda, a ANOVA apontou diferença entre inverno e verão ($p = 0,0043$) (Figura 3).



Fonte: O autor (2022)

Figura 3 - Resultados do log das brânquias comparando a interação entre estação e estuário.

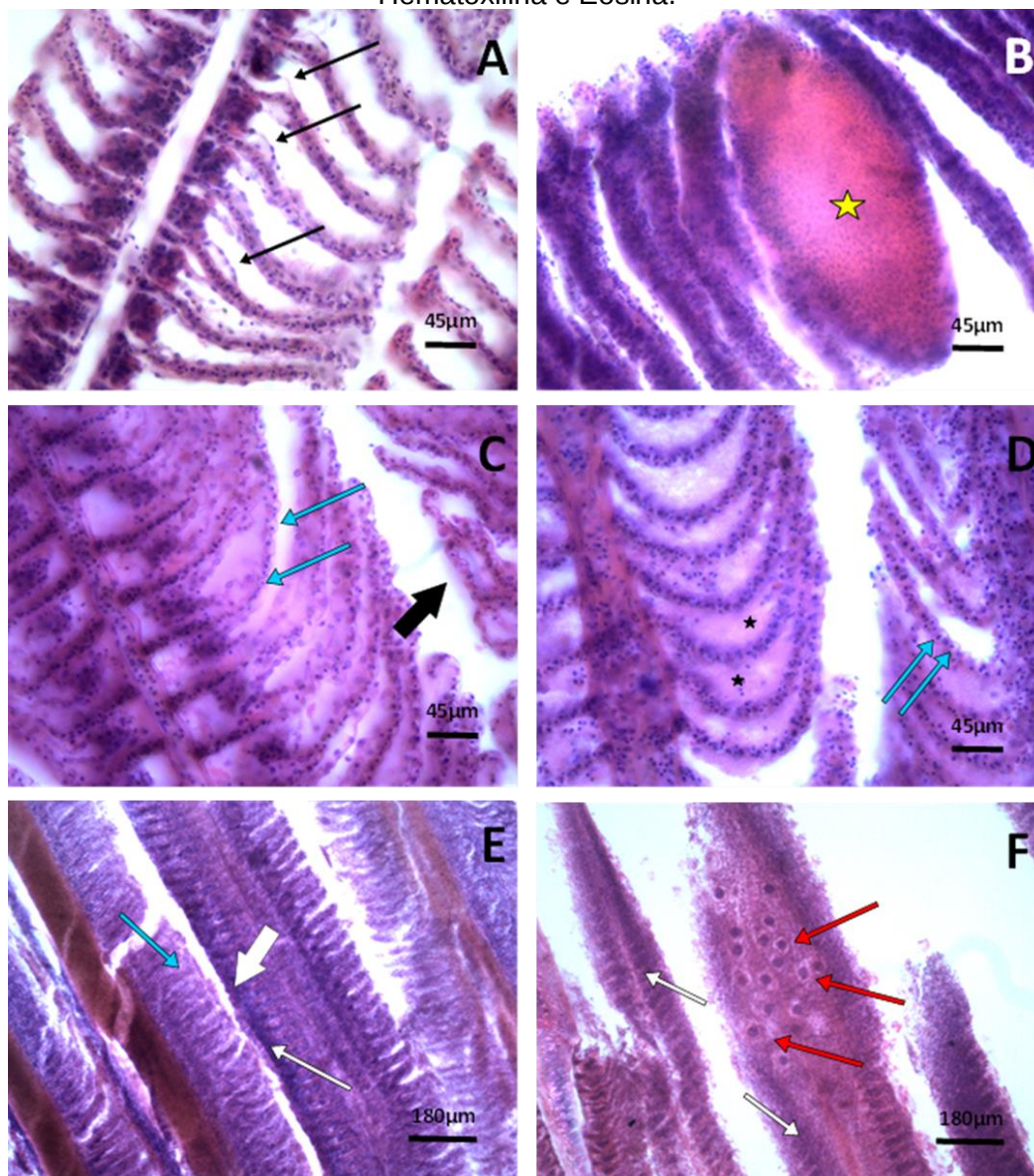


Fonte: O autor (2022)

A análise histopatológica das brânquias resultou nas lesões apresentadas na Figura 4. As lesões mais encontradas foram hiperplasia e desestruturação de lamelas (Figura 4e-f e 4c, respectivamente), e a lesão menos observada foi o aneurisma (Figura 4b) com cerca de 43% de ocorrência. Apesar de terem sido encontrados parasitos nas brânquias (Figura 4f), a presença não foi comum (34% de observações).

Figura 4 - Caracterização histopatológica das lesões branquiais de exemplares de *Mugil curema*, coletados em diferentes estuários nos estados de Pernambuco, Alagoas e Paraíba.

A – Deslocamento de epitélio (setas finas pretas); B – Aneurisma (estrela amarela); C – Hipertrofia (setas finas azuis), desestruturação das lamelas secundárias (seta preta grossa); D – Edema (estrela preta), hipertrofia (setas finas azuis); E – Hipertrofia (seta fina azul), fusão (seta grossa branca), hiperplasia (seta fina branca); F – Ovos de parasitos (setas finas vermelha), fusão (seta grossa branca), hiperplasia (seta fina branca). Coloração Hematoxilina e Eosina.

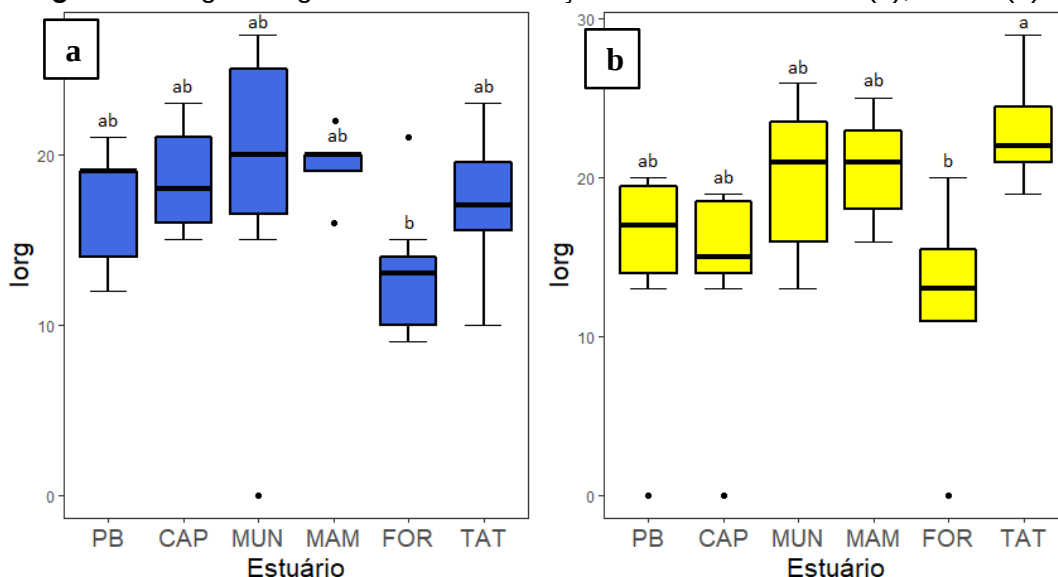


Fonte: O autor (2022)

Entretanto, no fígado a ANOVA não indicou diferença significativa no índice entre estação e estuário ($p = 0,1824$). O teste de Tukey evidenciou que o valor do índice encontrado no rio Tatuamunha no verão foi maior que o encontrado no Formoso no mesmo período com valor de $p = 0,0135$ (Figura 5b). Avaliando o índice em cada variável separadamente, houve diferença estatisticamente significativa entre estuários

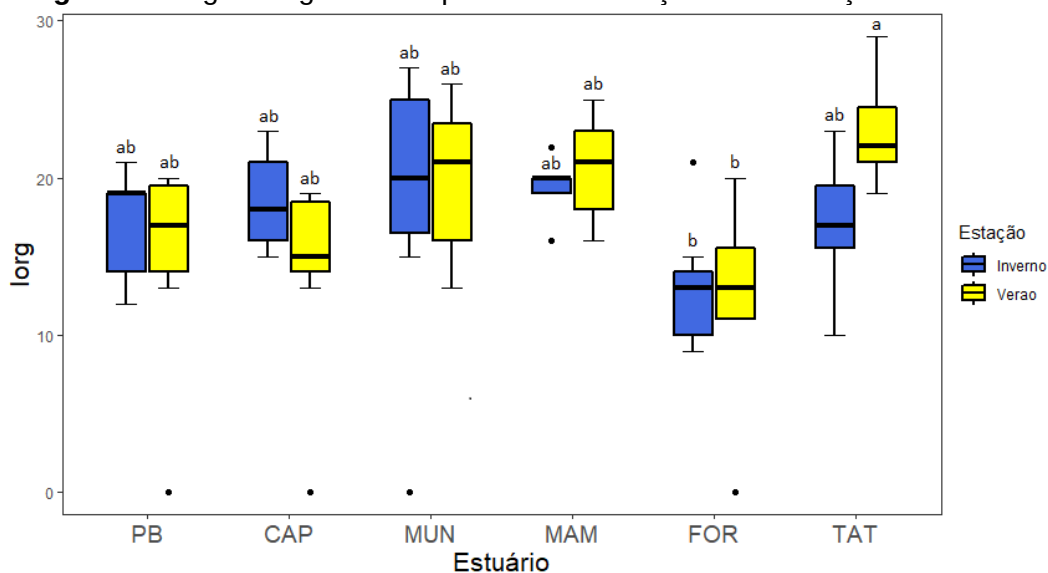
($p = 0,0014$), com diferença entre a Lagoa Mundaú e o rio Tatuamunha ($p = 0,0171$), assim como entre o Tatuamunha e Formoso ($p = 0,0045$). Contudo, não foi observada diferença do índice entre verão e inverno ($p = 0,8681$) (Figura 6).

Figura 5 - log dos fígados em cada estação e estuário. Inverno (a), Verão (b).



Fonte: O autor (2022)

Figura 6 - log dos fígados comparando a interação entre estação e estuário.



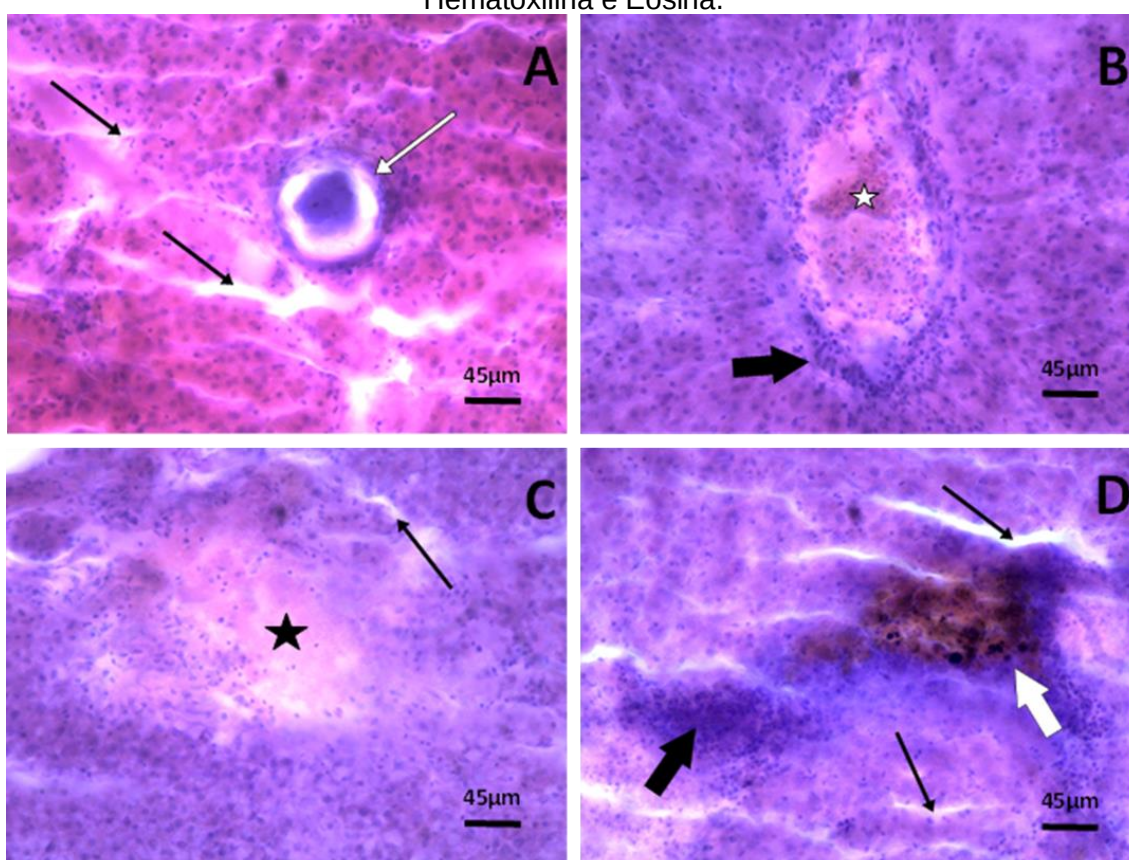
Fonte: O autor (2022)

As alterações hepáticas encontradas estão apresentadas na Figura 7. A necrose (Figura 7c) foi a lesão mais encontrada, com mais de 91% de ocorrência, seguida de infiltração leucocitária (Figura 7b e d) e congestão (Figura 7b). A presença de centros de melanomacrófagos (Figura 7d) foi a lesão menos encontrada neste estudo, aparecendo em mais de 60% de lâminas analisadas. Com relação aos

parasitos (Figura 7a), a frequência de observação nos fígados foi menor que na observada nas brânquias, com 23% de ocorrência. Apesar de não ter sido considerada como uma lesão histopatológica, foram observados alguns focos de dilatação sinusoidal, conforme apresentado nas figuras 7a e d.

Figura 7 - Caracterização histopatológica das lesões hepáticas de exemplares de *Mugil curema*, coletados em diferentes estuários nos estados de Pernambuco, Alagoas e Paraíba.

A – Parasito (seta fina branca), sinusóides (setas finas pretas); B – Congestão (estrela branca), infiltração leucocitária (seta grossa preta); C – Necrose (estrela preta), sinusóide (seta fina preta); D – Infiltração leucocitária (seta grossa preta), centro de melanomacrófagos (seta grossa branca), sinusóides (setas finas pretas). Coloração Hematoxilina e Eosina.



Fonte: O autor (2022)

DISCUSSÃO

O litoral brasileiro abriga aproximadamente 58% da população total do Brasil, atualmente estimada em mais de 210 milhões de habitantes (IBGE, 2022). As crescentes demandas pelos recursos hídricos e biológicos dessas áreas comprometem a saúde ambiental dos ecossistemas associados, em especial os estuários por abrigarem boa parte de toda biodiversidade e por constituírem via de

escape de boa parte de toda produção agrícola e industrial através das regiões portuárias estabelecidas nas proximidades dos sistemas estuarinos (TREVIZANI *et al.*, 2019; ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2019; TREVIZANI *et al.*, 2021).

Diante de tal evidência a utilização de biomarcadores em espécies sentinelas destas regiões se tornou algo urgente como alternativa de entender e diagnosticar possíveis agressões advindas das ações humanas (LIMA *et al.*, 2019; FALCÃO *et al.*, 2020). Vários trabalhos retratam as alterações histopatológicas nas brânquias e no tecido hepático como excelentes indicadores de contaminantes ambientais (GHISI *et al.*, 2016; TORRES *et al.*, 2016; RUBIO-VARGAS *et al.*, 2021).

Os dados aqui apresentados sugerem que os seis estuários avaliados sofrem algum tipo de pressão antrópica indicado pelos níveis de alterações histológicas nas brânquias e no fígado.

Quando avaliamos as alterações nas brânquias observamos uma diferença significativa quando comparados os estuários dentro da mesma estação (Inverno ou verão) e quando comparamos os resultados entre as estações e os estuários. Tais achados sugerem um efeito direto da sazonalidade nos padrões de expressão das modificações no tecido branquial. Situação similar observada em trabalho realizado por Torres *et al.* (2016) em estuário do sul do Brasil revelando que a remobilização de sedimentos devido a chuva pode ser a causa da biodisponibilidade de contaminantes. Freire *et al.* (2015) retratam que muitos compostos são capazes de cruzar a barreira da membrana, estabelecendo ligações com moléculas presentes na membrana plasmática com consequentes efeitos adversos nos epitélios ou tecidos.

As alterações mais significativas observadas nas brânquias foram: aneurisma, desestruturação das lamelas secundárias, edema, hipertrofia e hiperplasia (Figura 4). Tais resultados assemelham-se aos observados por Lopes (2021) e El-Hak *et al.* (2021) em espécies de peixes expostas a contaminação crônica por metais e pesticidas. A exposição das brânquias a diferentes contaminantes foi relatada por Rubio-Vargas *et al.* (2021) como causadora de inúmeras alterações neste tecido, como a ocorrência de fusão lamelar, hiperplasia tecidual como eventos neoplásicos, hipertrofia celular e aneurismas. Tais evidências alinham-se aos resultados do nosso estudo e apoiam aqueles descritos por outros autores (TORRES *et al.*, 2016; EL-HAK *et al.*, 2021). A hiperplasia e fusão lamelar (Figura 4e) foram alterações observadas em nosso estudo e segundo Liebel *et al.* (2013) tais lesões podem ocorrer como uma resposta do tecido a presença de poluentes diluídos em água, aumentando a distância

entre o capilar sanguíneo e a superfície das lamelas, reduzindo em teoria a absorção dos poluentes. Os aneurismas (Figura 4b) estão associados ao fluxo sanguíneo anormal no tecido devido a dilatação dos capilares sanguíneos na extremidade das lamelas secundárias e a hiperplasia (Figura 4e) é o consequente desarranjo das lamelas secundárias, dificultando as trocas gasosas (Brito *et al.*, 2012).

Foram identificados alguns parasitos (Figura 4f) nas análises dos arcos branquiais que de acordo com estudo realizado por Brito *et al.* (2012) são reflexo do comprometimento da função das brânquias.

A ausência de diferenças significativas entre as áreas de estudo dentro do mesmo ciclo climático e em ciclos climáticos distintos quanto às análises histopatológicas do fígado, revelam o grau de similaridade entre os estuários e sinaliza a presença de forte pressão antrópica naqueles inseridos nas APAs. A necrose e os processos inflamatórios, como infiltração leucocitária e a ativação de centros de melanomacrófagos foram as alterações mais importantes encontradas no fígado. Tais observações são relatadas em vários trabalhos, como os realizados por Liebel *et al.* (2013) e Bevitório *et al.* (2022) que revelam que a infiltração leucocitária geralmente está associada a ocorrência de necrose. Tais autores ainda retratam a alta ocorrência de parasitos como indicativo de falha do sistema imune do peixe e apontam que a aplicação do índice de Bernet associado com a observação das lesões em imagens é uma importante ferramenta para avaliar os efeitos morfológicos causados pela contaminação ambiental.

Foram observados sinusóides com espessura fora dos padrões normais (Figura 7 a, c, d). Apesar de não ser uma lesão considerada pelo índice de Bernet *et al.* (1999), vários autores abordam tal evidência como estando diretamente relacionada aos processos inflamatórios, como Marzano *et al.* (2015) afirmam que durante o processo inflamatório algumas substâncias são liberadas resultando na dilatação dos sinusóides e na congestão sanguínea.

Foi possível observar no tecido hepático de *M. curema* regiões necrosadas (Figura 7c) que de acordo com o índice de Bernet *et al.* (1999) é uma lesão com maior grau de relevância patológica. Brito *et al.* (2012) afirmam que a necrose é um “reflexo a falha dos mecanismos de proteção celular na vigência de estresse químico”. Os autores ainda afirmam que por estarem envolvidos em uma série de processos fisiológicos, a morte celular devido a necrose desencadeia diferentes níveis de insuficiência hepática que afeta todo o organismo, além disso a necrose geralmente

está associada a respostas inflamatórias, como a infiltração leucocitária e ativação de melanomacrófagos (Figura 7b e d). Apesar dos macrófagos serem muito comuns no fígado, onde participam de processos imunológicos e eliminação de células, o agrupamento deles em centros de melanomacrófagos indica um excesso de lesão tecidual (Brito *et al.*, 2012). A presença de parasitos no fígado (Figura 7a) apesar de não constituir lesão de acordo com o índice de Bernet *et al.* (1999) é indicativo de condição imunológica adversa como sugere o trabalho realizado por Freire *et al.* (2015).

Alguns trabalhos revelam os efeitos da poluição nos hepatócitos de peixes expostos a cargas elevadas de contaminantes, como o realizado por Ortiz *et al.* (2003) em algumas espécies de peixes, entre elas os mugilídeos, alinhando-se aos resultados observados em nosso estudo. Outros trabalhos também mostram os efeitos da contaminação nas modificações histológicas no tecido hepático de mugilídeos, como o realizado por El-Hak *et al.* (2021) em um complexo estuarino lagunar do Egito que reúne características semelhantes aos das áreas metropolitanas do Nordeste do Brasil, evidenciando alterações histopatológicas na espécie *Mugil cephalus* exposta à metais pesados.

Vários trabalhos relacionam o comprometimento das funções das brânquias e fígado de espécies de peixes estuarinos à exposição com diversos contaminantes orgânicos e inorgânicos resultantes da intensa atividade antrópica nessas regiões (BRITO *et al.*, 2012; LIEBEL *et al.*, 2013; GHISI *et al.*, 2016; EL-HAK *et al.*, 2021). Desta forma os resultados aqui apresentados consolidam *M. curema* com espécie sentinela dos ambientes estuarinos.

CONCLUSÕES

- As análises histopatológicas das brânquias e fígado em *M. curema* revelam que os estuários do nordeste do Brasil encontram-se ameaçados pela contaminação dos recursos hídricos destes ecossistemas
- As diferenças nos padrões de expressão das lesões nas brânquias e fígado nos estuários e estações (Inverno e Verão) revelam que tais marcadores respondem de formas distintas aos contaminantes ambientais
- Os resultados apresentados demonstram vários tipos de alterações histopatológicas nas brânquias e fígado
- As lesões observadas nas brânquias foram: aneurisma, edema, deslocamento de epitélio, atrofia, desestruturação, necrose, fusão, hiperplasia e hipertrofia. Sendo o aneurisma a lesão com menor incidência (43%)
- As lesões observadas no fígado foram: congestão, infiltração leucocitária, necrose e centro de melanomacrófagos. Sendo a necrose a lesão com maior incidência (91%)
- Os resultados aqui apresentados revelam a necessidade de criação de programas de biomonitoramento dos sistemas estuarinos, afim de um melhor gerenciamento dessas regiões.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. N. et al. Contamination and Toxicity of Surface Waters Along Rural and Urban Regions of the Capibaribe River in Tropical Northeastern Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 3063-3077, 2021.
- AMEUR, W. B. et al. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. **Chemosphere**, 135, 67–74, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.050>
- BERNET, D. et al. Gonadal alterations in male whitefish *Coregonus fatioides*: No evidence for genetic damage reducing viability in early life stages. **Dis Aquat Organ**, 61, 25–34, 1999.
- BEVITÓRIO, L.Z. et al. Impacts of tailings of Fundão dam (Brazil) rupture on marine fish: Metals bioaccumulation and physiological responses. **Marine Pollution Bulletin**, v. 177, p. 113511, 2022.
- BORGES, A. et al. Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers for assessing mercury pollution in piranhas (*Serrasalmus rhombeus*) from the Amazon mining region. **Chemosphere**, 202, 788–796, 2018.
- BRITO, I. A. et al. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. **Journal of environmental monitoring**, v. 14, n. 2, p. 615-625, 2012.
- DA SILVA CASTRO, J. et al. Histological changes in the kidney of *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) for environmental monitoring of a neotropical estuarine Area (São Marcos Bay, Northeastern Brazil). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 103, n. 2, p. 246-254, 2019.
- DE LIMA, L. B. D. et al. Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 611-624, 2018.
- DE LIMA CARDOSO, R. et al. Histological and genotoxic biomarkers in *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) for environmental assessment in a Protected area in the Northeast of Brazil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 101, n. 5, p. 570-579, 2018.
- DE PAULA, C. et al. Spatial zoning to conserve fish species with complex life cycles in estuaries. **Ocean & Coastal Management**, v. 221, p. 106-115, 2022.
- EL-AMIYER, Y. A. et al. Assessment of the Heavy Metals Pollution and Ecological Risk in Sediments of Mediterranean Sea Drain Estuaries in Egypt and Phytoremediation Potential of Two Emergent Plants. **Sustainability**, v. 13, n. 21, p. 122- 144, 2021.

EL-HAK, H.N.G. et al. Bioaccumulation of heavy metals and their histopathological impact on *Mugil cephalus* from the North Eastern Region of Manzala Lake, Egypt. **Regional Studies in Marine Science**, v. 45, p. 101841, 2021.

FALCÃO, C.B.R. et al. Spatial temporal genome damaging in the blue crab *Cardisoma guanhumi* as ecological indicators for monitoring tropical estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, 156, 12-32, 2020.

FREIRE, C. et al. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 17, p. 13263-13277, 2015.

GHISI, N. C. et al. Integrated biomarker response in catfish *Hypostomus ancistroides* by multivariate analysis in the Pirapó River, southern Brazil. **Chemosphere**, v. 161, p. 69-79, 2016.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2022. Estimativas de população por cidades. Available from: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>

JIAO, Z. et al. Ecological risk assessment of heavy metals in water and sediment of the Pearl River Estuary, China. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, 52 – 55, 2018.

KROON, F., STRETEN, C., HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. 2017.

LETSINGER, S. et al. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals in UK estuaries. **Science of the Total Environment**, v. 678, p. 74-84, 2019.

LIEBEL, S., TOMOTAKE, M. E. M., RIBEIRO, C. A. O. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. **Ecotoxicol Environ Contam**, 8, 9–15, 2013.

LIMA, A.R.B. et al. Genomic damage in *Mugil curema* (Actinopterygii: mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 138, 63-69, 2019.

LOPES, F. F. Fish diseases analysis used as bioindicators for water quality and its importance for environmental monitoring. **Intern. J. Zool. Invest**, v. 7, n. 1, p. 01-16, 2021.

MAHARDJA, B. et al. Leveraging Delta Smelt monitoring for detecting juvenile Chinook Salmon in the San Francisco Estuary. **San Francisco Estuary and Watershed Science**, v. 19, n. 1, 2021.

MARZANO, C. et al.. The significance of nonobstructive sinusoidal dilatation of the liver: Impaired portal perfusion or inflammatory reaction syndrome. **Hepatology**, v. 62, n. 3, p. 956-963, 2015.

ORTIZ, J. B., DE CANALES, M. L. G., SARASQUETE, C. Histopathological changes induced by lindane (?-HCH) in various organs of fishes. **Sci. Mar**, 67 (1), 53–61, 2003.

REBOA, A. et al. Mugilidae fish as bioindicator for monitoring plastic pollution: Comparison between a commercial port and a fishpond (north-western Mediterranean Sea). **Marine Pollution Bulletin**, v. 177, p. 113531, 2022.

RUBIO-VARGAS, D. A. et al. Exposure to pollutants present in Iguaçu River Southern Brazil affect the health of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758): assessment histological, genotoxic and biochemical. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 87, p. 103682, 2021.

SALAS, P. M.. et al. Heavy metal distribution and contamination status in the sedimentary environment of Cochin estuary. **Mar Pollut Bull**, 119, 191–203, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.018>

SALDARRIAGA-HERNANDEZ, S. et al. Bioremediation potential of *Sargassum* sp. biomass to tackle pollution in coastal ecosystems: Circular economy approach. **Sci Total Environ**, 715, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136978>

SAMANTA, S., DALAI, T. K. Massive production of heavy metals in the Ganga (Hooghly) River estuary, India: Global importance of solute-particle interaction and enhanced metal fluxes to the oceans. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 228, p. 243-258, 2018.

SANTOS, I. G. S. et al. Histopathological Biomarkers as Indicators of the Environmental Quality of Two Estuaries in Northeastern Brazil. 2021.

STENTIFORD, G. D. et al. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 55, n. 2, p. 137-159, 2003.

TORRES, M. C. et al. The lack of information hides the impact of human activities in estuarine fish from Southern of Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2016.

TREVIZANI, T. H. et al. Assessment of metal contamination in fish from estuaries of southern and southeastern Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 191, n. 5, p. 1-16, 2019.

TREVIZANI, T. H. et al. Metals in sediments as indicators of anthropogenic impacts in estuaries of south-southeast Brazil. **Journal of Sedimentary Environments**, v. 6, n. 3, p. 417-430, 2021.

ZANARDI-LAMARDO, E. et al. Distribution and sources of organic contaminants in surface sediments of Hooghly river estuary and Sundarban mangrove, eastern coast of India. **Marine pollution bulletin**, v. 146, p. 39-49, 2019.

5 CONCLUSÕES

Genotoxicidade

- Todos os seis estuários avaliados apresentaram níveis alarmantes de impacto ambiental, seja por macro, micro ou ambos níveis de dano genômico em relação ao estuário controle, permitindo sua ordenação por contaminação, conforme segue: Capibaribe > Mundaú > Paraíba > Formoso > Tatuamunha > Mamanguape.
- Os estuários associados aos rios em Áreas de Preservação Ambiental (Mamanguape, Formoso e Tatuamunha) apresentaram resultados similares aos do grupo controle, quando foram avaliadas as macrolesões (MN), independentemente da estação climática (verão e inverno).
- O estuário do Capibaribe apresentou uma menor média de genotoxicidade (MN) no período chuvoso, indicando que o maior aporte de água no estuário reduziu a expressão das macrolesões no genoma da espécie.
- *Mugil curema* apresenta micro e macrolesões nos seis estuários estudados, causadas pelo elevado grau de perturbação, em especial nos manguezais metropolitanos, devido a maior contaminação na qualidade das águas, requerendo medidas mitigadoras para restaurar o equilíbrio e qualidade dos sistemas estuarinos.
- A qualidade ambiental dos sistemas estuarinos encontra-se em perigo, bem como *M. curema*, que tem apresentado depleção gênica, com prejuízos à pesca artesanal, a qualidade do pescado e saúde daqueles que se alimentam destes animais.
- O diagnóstico de degradação dos sistemas estuarinos avaliados contribui para um melhor direcionamento das medidas reparadoras pelos órgãos ambientais, em especial naqueles de regiões metropolitanas, onde a degradação ambiental, em média, foi 70 % superior à de estuários dentro de unidades de conservação.

Enzima (AChE) - Atividade e caracterização

- A cinética de hidrólise dos substratos e os inibidores específicos comprovaram a maior prevalência da AChE entre as ChEs presentes no cérebro de *M. curema*;
- A temperatura de melhor atividade da enzima foi 40°C, reduzindo a atividade em 50% (IC₅₀) ao atingir os 60°C e tendo 100% das suas atividades inibidas apenas quando a temperatura chegou próxima aos 80°C. Revelando a excelente amplitude térmica de atividade da enzima, característica fundamental para utilizá-la como biomarcadora de contaminantes ambientais;
- O pH ótimo foi de 7,5 e assemelhasse ao de outras espécies de peixes estuarinos;
- Entre os pesticidas o organofosforado Diclorvos apresentou a maior afinidade e poder inibitório contra a atividade da AChE de *M. curema*;
- A enzima AChE tem forte potencial para atuar como biomarcadora deste OP nas águas estuarinas impactadas pelas atividades agrícolas;
- A AChE de *M. curema* também mostrou ser uma excelente biomarcadora para alguns íons;
- Dos quatro íons cujos efeitos sobre a AChE de *M. curema* foram investigados, três tiveram efeito inibitório em ordem decrescente: $\text{Cu}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{As}^{2+}$
- Os dados de atividade específica da AChE em *M. curema* sugerem que os estuários de Pernambuco encontram-se mais impactados quando comparados aos de Alagoas e Paraíba;
- O estuário com as melhores taxas de atividade enzimática foi o do Rio Tinto/Mamanguape no inverno de 2019 e no Rio Paraíba (CAB) no verão de 2020;
- Os dados de atividade da AChE observados nos estuários inseridos nas APAs comparados aos estuários das regiões metropolitanas não são capazes de

justificar a grande importância que as APAs possuem para preservação da enorme biodiversidade que tais regiões estuarinas abrigam.

- Os resultados aqui apresentados reforçam a necessidade de um melhor gerenciamento das APAs ao longo do litoral brasileiro.

Alterações histológicas

- As análises histopatológicas das brânquias e fígado em *M. curema* revelam que os estuários do nordeste do Brasil encontram-se ameaçados pela contaminação dos recursos hídricos destes ecossistemas
- As diferenças nos padrões de expressão das lesões nas brânquias e fígado nos estuários e estações (Inverno e Verão) revelam que tais marcadores respondem de formas distintas aos contaminantes ambientais
- Os resultados apresentados demonstram vários tipos de alterações histopatológicas nas brânquias e fígado
- As lesões observadas nas brânquias foram: aneurisma, edema, deslocamento de epitélio, atrofia, desestruturação, necrose, fusão, hiperplasia e hipertrofia. Sendo o aneurisma a lesão com menor incidência (43%)
- As lesões observadas no fígado foram: congestão, infiltração leucocitária, necrose e centro de melanomacrófagos. Sendo a necrose a lesão com maior incidência (91%)
- Os resultados aqui apresentados revelam a necessidade de criação de programas de biomonitoramento dos sistemas estuarinos, afim de um melhor gerenciamento dessas regiões.

6 SÚMULA CURRICULAR

ATIVIDADES ACADÊMICAS E CIENTÍFICAS REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO

Artigos publicados

- Genomic damage in *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern Brazil.

MARINE POLLUTION BULLETIN

Link: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.07.037>

- Virulence factors of human pathogens: an always-needed approach. BRAZILIAN JOURNAL OF HEALTH REVIEW

Link: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/44124/pdf>

- DNA damage as indicator of the environmental vulnerability of bats in Brazil's Caatinga drylands.

ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT

Link: [10.1007/s10661-022-09906-9](https://doi.org/10.1007/s10661-022-09906-9)

Resumos publicados em anais de congressos

- Correlação da pluviometria, temperatura da água e genotoxicidade em *Abudefduf saxatilis* (Linnaeus, 1758) nas biopiscinas de Porto de Galinhas (Ipojuca-PE).

XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA

- Alta frequência de danos genômicos em células sanguíneas de *Abudefduf saxatilis* oriundos de piscinas naturais coralinas - Porto de Galinhas (PE) - região turística do Nordeste do Brasil.

XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA

- Danos genômicos em morcegos como indicadores de vulnerabilidade ambiental da Caatinga (Pernambuco - Brasil).

XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA

- Vulnerabilidade ambiental de regiões costeiras do litoral pernambucano revelada por avaliação genotóxica em alpheidæ.

X CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE CRUSTÁCEOS

- Genotoxicidade e Carcinogênese como alerta de impacto ambiental: um relato de caso.

VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA

- Análise histopatológica do fígado do peixe Sargentinho (*Abudefduf saxatilis*) proveniente das piscinas naturais de Porto de Galinhas, Ipojuca – PE.

VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA

Participação em bancas

- Avaliação de danos genômicos em eritrócitos de *Aspitor Lunicutis* após acidente ambiental no estuário do rio Goiana (PE).

Trabalho de Conclusão de Curso – TCC

Discente: Demetrios Lucas da Silva

- Observação na variação da genotoxicidade em *Abudefduf saxatilis* no coral de Porto de Galinhas - Ipojuca(PE) entre os períodos de Verão e Inverno.

Trabalho de Conclusão de Curso – TCC

Discente: José Rodolfo de Lima e Silva

- Proposta de um livro paradidático ilustrado como recurso didático para educação ambiental no ensino médio.

Trabalho de Conclusão de Curso – TCC

Discente: Bruna Maria do Nascimento

Cursos de curta duração

- Conflitos em unidades de conservação: estratégias de enfrentamento e mediação. (25h)

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE

- Educação ambiental e comunicação nas unidades de conservação. (70h)
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
- Fundamentos e práticas de educação ambiental para espaços educadores. (60h)
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
- Estilos de vida sustentável (30h)
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE