



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

KELMA SIRLEIDE DE SOUZA

Efeitos bioquímicos e genotóxicos de poluentes na ostra *Crassostrea sp.*, na região norte do complexo estuarino Canal de Santa Cruz, litoral norte de Pernambuco

Recife
2016

KELMA SIRLEIDE DE SOUZA

Efeitos bioquímicos e genotóxicos de poluentes na ostra *Crassostrea sp.*, na região norte do complexo estuarino Canal de Santa Cruz, litoral norte de Pernambuco

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do grau de doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co- Orientador: Dr. Caio Rodrigo Dias de Assis

**Recife
2016**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Souza, Kelma Sirleide de

**Efeitos bioquímicos e genotóxicos de poluentes na ostra
Crassostrea sp. na região norte do complexo estuarino Canal de Santa
Cruz, litoral norte de Pernambuco / Kelma Sirleide de Souza - Recife: O
Autor, 2016.**

91 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientador: Caio Rodrigo Silva de Assis

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.**

Inclui referências

**1. Ostras 2. Estuários 3. Santa Cruz, Canal de (PE) I. Bezerra, Ranilson
de Souza (orient.) II. Assis, Caio Rodrigo Silva de (coorient.) III. Título**

594.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 406

KELMA SIRLEIDE DE SOUZA

Efeitos bioquímicos e genotóxicos de poluentes na ostra *Crassostrea sp.*, na região norte do complexo estuarino Canal de Santa Cruz, litoral norte de Pernambuco

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do grau de doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em 30/06/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra / UFPE

Prof. Dra. Juliett de Fátima Xavier / UFAL

Prof. Dra. Mônica Lúcia Adam / UFPE

Dra. Marina Marcuschi / UFPE

Dra. Renata Cristina da Penha França / UFPE

“A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado. A imaginação envolve o mundo.”

Albert Einstein

*Ao meu filho Álvaro Nascimento pelo amor
que me impulsiona e direciona meu olhar
para o futuro.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois tudo pude porque ele me fortaleceu.

À minha família pelo amor incondicional, apoio e incentivo durante toda minha vida. Especialmente a meus pais Helena Costa e Severino Souza.

Às minhas irmãs Katia Souza e Katiane Souza, por serem verdadeiros anjos na minha vida e na do meu filho. Muito obrigada pelo amor maternal com que cuidaram do “nosso bambino” durante as longas horas de pesquisa.

À minha sogra Lourdes Carvalho pela amizade, cuidado intensivo com minha alimentação, dedicação e amor doado ao meu filho.

À minha cunhada Kátia Nascimento pela amizade, dedicação e amor nos cuidados com o meu filho durante a finalização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa científica, pela confiança, orientação e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu Coorientador amigo (Caillou) Dr. Caio Dias pela coorientação, amizade, prestatividade e conhecimento compartilhado durante minha passagem pelo labenz e principalmente na realização deste projeto de pesquisa. Meu muito obrigada!

À professora Dra. Mônica Adam, pelos ensinamentos de Genotoxicidade, parceria, simplicidade e por ter sido uma amiga durante todos momentos de orientação.

À minha amiga Paula Rayane, companheira de altas horas de pesquisa, pela dedicação, disciplina, independência, parceria valiosa durante o desenvolvimento desse doutorado. Sem você minha amiga, tudo seria mais difícil. Obrigada por tudo flor!

À minha amiga dona Luciene Trindade, por estar sempre disponível para realizar as coletas das ostras tão necessárias para o começo, desenvolvimento e fim desse doutorado. Espero retribuir cientificamente todo o esforço que você dedicou a mim e ao meu projeto de pesquisa.

Ao meu amigo anjo Anderson Balbino por ser essa pessoa maravilhosa, prestativa, e divina que és, pelos ensinamentos de genotox e pelas longas horas contando células ao meu lado, o que fortaleceu ainda mais nossa amizade. Muito obrigada.

Às minhas amigas Kaline Katiely e Marlyete Araújo, pela amizade, ajuda constante nos experimentos, pela simplicidade em aprendermos uma com as outras nesse caminho longo que se chama pesquisa. Amigas vocês foram anjos que surgiram durante o doutorado e que ficarão para sempre na minha vida.

À minha eterna amiga Julieta Xavier pelo apoio incondicional durante minha vida acadêmica, pela acolhida em sua casa durante os experimentos com as ostras controle, pelo conhecimento compartilhado e momentos felizes e tristes vividos e superados juntas.

À minha amiga Cibelly Marques pela amizade, alegria, gargalhada escandalosa e contagiante, e ajuda sempre que necessária.

À minha amiga Werlinha Mendes, pela gargalhada maravilhosa, que faz uma falta danada no meu cotidiano, pela prestatividade, bondade e por me ajudar em muitos momentos na vida acadêmica.

À Major Maria Laura pela compreensão, amizade e apoio referente as atividades docentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade e transmissão de conhecimento.

A todos que integram o LABENZ: Ana Cláudia, Andreia Cybelle, Amália Medeiros, Augusto Freitas, Caio Assis, Cleópatra Silva, Cyndy Mary, Daniela Campeche, Daniele Matias, Dário Teixeira, Diego Buarque, Fábio Marcel, Flávia Thuanne, Guilherme Firmino, Helane Costa, Ian Porto, Janilson Felix, Jéssica Vasconcelos, Juliana Interaminense, Juliana Santos, Julieta Xavier, Kaline Catiely, Karina Ribeiro, Karollina Lopes, Kelma Souza, Lidiane Cristina, Liliane Moreira, Luiz Swintiskas, Marina Marchuschi, Marlyete Chagas, Milena Márcia, Natália Albuquerque, Paula Rayane, Rafael David, Raquel Pereira, Renata Cristina, Renata Nascimento, Robson Coelho, Ruy Tenório, Thiago Cahú, Vagne Melo, Werlayne Mendes, pelo convívio e troca de experiências.

Ao professor Rodrigo Torres do LAGEA, por tornar possível o desenvolvimento do capítulo referente à genotoxicidade.

Aos funcionários do PPGCB e do departamento de bioquímica Adenilda Eugênia, Miron Oliveira, Albérico Espírito Santo, Sr. João Virgínio e D. Helena pela gentileza, atenção e prestatividade.

Aos colegas e amigos da turma do Doutorado em Ciências Biológicas pela convivência, permuta de conhecimentos e pelos momentos de descontração.

Aos amigos que com um simples gesto ou sorriso tornaram mais fácil de superar os desencontros da vida. Em especial a Marcela Filgueiras, Daniel Moreira, Ane Emanuelle, Gertrudes Melo, Lúcia Lira e Walquíria Nicácio pela amizade, apoio e torcida constante durante todos esses anos que nos conhecemos.

Aos professores da banca avaliadora desta tese pelas sugestões e enriquecimento do trabalho (Dra. Marina Marchuschi, Dra. Mônica Adam, Dra. Julieta Xavier e Dra. Renata França).

A todos aqueles que porventura não foram citados, mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e CAPES pelo financiamento do projeto.

RESUMO

O uso de biomarcadores enzimáticos e de genotoxicidade é uma importante ferramenta na avaliação da contaminação ambiental. Esta poluição, que em grande parte tem origem nas atividades humanas, é liberada no ambiente tendo como destino final, preferencialmente, os corpos d'água. No estuário Canal de Santa de Cruz a expansão das atividades industriais e turísticas, além do elevado crescimento populacional humano e sobrepesca, colocam em risco o delicado sistema ecológico deste local. Neste contexto, o uso do molusco bivalve *Crassostrea sp.* como bioindicador torna-se uma ferramenta útil e eficaz para diagnosticar os efeitos dos impactos antropogênicos nesse ambiente. Portanto, a presente tese avaliou a atividade de biomarcadores enzimáticos (AChE, BChE, CAT, SOD, amilase, pepsina, tripsina, quimotripsina) e não enzimáticos, GSSG, GSH, Malonaldeído em brânquias, vísceras e músculo adutor da ostra do mangue *Crassostrea sp.*, e o ensaio de Genotoxicidade e mutagenicidade (ensaio cometa e MN) em hemócitos de ostras capturadas durante o período seco e chuvoso em três locais do Canal de Santa de Cruz (vila velha Itamaracá – PE); e em uma região referência (Depuradora/controle) em Penedo, AL. O impacto genotóxico foi confirmado pela detecção de microlesões no DNA por meio do ensaio cometa, e pela alta frequência de macrolesões (MN) nos hemócitos em relação as ostras controle. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre ostras coletadas sazonalmente no estuário, e entre estas ostras e ostras controle, foram observadas nas frequências de MN nas coletas do período seco e chuvoso; no Índice de dano no período seco e na frequência de danos no período chuvoso para um ponto de coleta. No presente trabalho, a AChE presente em vísceras e brânquias de *Crassostrea sp.* foi caracterizada físico-química e cineticamente e foi exposta a pesticidas organofosforados, carbamatos e a íons. Todos os pesticidas usados mostraram efeito inibitório na atividade da AChE apresentando decréscimo significativo. Foi verificada a influência de alguns íons sobre a atividade da AChE nos dois tecidos estudados. A atividade da AChE e BChE de brânquias, vísceras e músculo adutor de ostra coletadas no estuário no período seco e chuvoso, foi significativamente ($p < 0,05$) menor que as ostras depuradas. No presente estudo foram observadas diferenças sazonais significativas ($p < 0,05$) e respostas sinérgicas para AChE e BChE, e nos demais biomarcadores (enzimático, não enzimático e genético) avaliados nos três tecidos da ostra. Analisados em conjunto, os dados obtidos apontam para respostas de biomarcadores em ostras, indicando que esses organismos apresentaram indícios de neurotoxicidade ou de danos causados por estresse oxidativo a macromoléculas. Eles também apontam para a importância de considerar a sazonalidade, os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e como esses fatores influenciam nas respostas de biomarcadores em programas de monitoramento de contaminação ambiental. Considerando que a influência dos fatores ambientais, dos fatores endógenos e da biodisponibilidade de metais traço sobre os mecanismos bioquímicos que modulam a atividade desses biomarcadores é ainda pouco conhecida, a necessidade de estudos sobre estes parâmetros é enfatizada. Desta forma, as oscilações na atividade das enzimas analisadas ao longo do experimento nos três pontos do Canal de Santa Cruz poderiam ser interpretadas dentro de um contexto molecular integrado, visando não só compreender a inter-relação destes parâmetros e as necessidades de osmoconformação dos animais, como também otimizar o uso de biomarcadores nesta espécie de molusco.

Palavras-chave: Biomarcadores; *Crassostrea sp.*; Canal de Santa Cruz; Contaminação ambiental.

ABSTRACT

The use of enzymatic biomarkers and genotoxicity is an important tool in the evaluation of environmental contamination. This pollution, which largely originates in human activities, is released into the environment with the final destination, preferably, bodies of water. In the estuary Canal de Santa Cruz, the expansion of industrial and tourist activities, besides the high human population growth and overfishing, put at risk the delicate ecological system of this place. In this context, the use of the bivalve mollusk *Crassostrea sp.* as a bioindicator becomes a useful and effective tool to diagnose the effects of anthropogenic impacts in this environment. Therefore, this thesis evaluated the activity of enzyme biomarkers (AChE, BChE, CAT, SOD, amylase, pepsin, trypsin, chymotrypsin) and non-enzymatic, GSSG, GSH, malondialdehyde in gills, adductor muscle and viscera of the mangrove oyster *Crassostrea sp.*. Test of genotoxicity and mutagenicity (comet assay and MN) in hemocytes of oysters taken during the dry and rainy season in three locations in the Canal Santa Cruz (Vila Velha Itamaracá - PE); and a reference region (purifying / control) in Penedo, AL. The genotoxic impact was confirmed by microinjuries detection in DNA through the comet assay, and high frequency macrolesões (MN) in hemocytes in relation oysters control. Significant differences ($p < 0.05$) and seasonal oysters from the estuary and oysters control, were observed in the frequency of MN in the collections of the dry and rainy season; the damage index in the dry period and frequency of damage in the rainy season to a collection point. In this study, the AChE present guts and gills of *Crassostrea sp.* was characterized physico-chemical and kinetically and was exposed to organophosphorus pesticides, carbamates and ions. All pesticides used showed inhibitory effect on AChE activity presenting significant decrease. It was verified the influence of some ions on the activity of AChE in both tissues studied. The activity of AChE and BChE gills, guts and muscle adductor oyster collected in the estuary in the dry and rainy season was significantly ($p < 0.05$) lower than the refined oysters. In the present study, we observed significant seasonal differences ($p < 0.05$) and synergistic responses to AChE and BChE, and other biomarkers (enzymatic, non-enzymatic and genetic) evaluated the three oyster tissues. Taken together, the data point to biomarker responses in oysters, indicating that these bodies showed evidence of neurotoxicity or damage caused by oxidative stress to macromolecules. They also point to the importance of considering the seasonality, the physico-chemical parameters, microbiological and how these factors influence the responses of biomarkers in environmental pollution monitoring programs. Whereas the influence of environmental factors, endogenous factors and bioavailability of trace metals on the biochemical mechanisms that modulate the activity of these biomarkers is still unknown, the need for studies on these parameters is emphasized. Thus, fluctuations in the activity of the enzymes analyzed during the experiment in the Santa Cruz Channel could be interpreted within an integrated molecular context, aiming not only to understand the inter-relationship between these parameters and osmoconformação needs of animals, as well as optimize biomarkers this mollusc species.

Keywords: Biomarkers; *Crassostrea sp.*; Santa Cruz Channel; environmental contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica do Complexo estuarino Canal de Santa Cruz, PE- Brasil..	25
Figura 2. Principais rotas dos pesticidas em ecossistemas aquáticos.....	32
Figura 3. Estrutura geral dos compostos OP.	34
Figura 4. Inibição da AChE por organofosforado.	35
Figura 5. Estrutura geral dos carbamatos.	36
Figura 6. Inibição da AChE por carbamato.....	36
Figura 7. Ostra do mangue <i>Crassostrea sp.</i>	39
Figura 8. Esquema mostrando o processo simplificado de biotransformação, conjugação de xenobióticos e mecanismos de defesa antioxidante enzimático.....	43
Figura 9. Estrutura tridimensional da HsAChE obtida do PDB (Código: 3LII)	46
Figura 10. Sítio ativo da AChE.	47
Figura 11. Estrutura tridimensional da Catalase (EC 1.11.1.6).....	48
Figura 12. Estrutura tridimensional da Superoxido dismutase (EC 1.15.1.1).....	49
Figura 13. Sítio de hidrólise específico para tripsina.	50
Figura 14. Hidrólise enzimática de uma proteína hipotética.....	51
Figura 15. Sítio de hidrólise específico para quimotripsina.	52
Figura 16. Estrutura tridimensional da pepsina do bacalhau-do-Atlântico (<i>Gadus morhua</i>)..	53
Figura 17. A - Fórmula estrutural da GSH, B - GSSG respectivamente.....	54

Capítulo 1: Parâmetros de danificação genômica da ostra *Crassostrea sp.* como ferramentas de diagnóstico de impacto ambiental estuarino

Figura 1. Localização geográfica dos locais de coleta P-I (lado esquerdo), P-II (lado direito norte) e PIII (lado direito sul), do complexo estuarino Canal de Santa Cruz, analisados no presente estudo.	67
Figura 2. Hemócitos de ostra <i>Crassostrea sp.</i>	78
Figura 3. Frequências de células Micronucleadas (MN%) na estação depuradora e nos pontos de coletas (P1, P2 e P3) do estuário nas estações seca (A) e chuvosa (B), observados em lâminas de hemolinfa de ostra <i>Crassostrea sp.</i> (10/área) analisada no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil. *Diferenças significativas $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.....	79

Figura 4. Comparação das Frequências de células Micronucleadas (MN%) entre os pontos do estuário na estação seca (A, B e C) e entre o estuário em sua totalidade (pool dos 3 pontos) nas estações seca e chuvosa (D), observados em lâminas de hemolinfa de ostra <i>Crassostrea sp.</i> (10/área) analisada no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil. *Diferenças significativas $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.	80
Figura 5. Índice de danificação no DNA (IDua) nas estações seca A) e chuvosa (B) e Frequência de dano genômico nas estações seca (C) e chuvosa (D), observados em lâminas de hemolinfa de ostra <i>Crassostrea sp.</i> (10/área) analisada no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil. *Diferenças significativas $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.	81
Figura 6. Índice de danificação no DNA (IDua) nas estações seca e chuvosa para os pontos de coleta P1 (A), P2 (C), P3 (E) e na Frequência de dano genômico no ponto 1 (B), P2 (D) e P3 (F), observados em lâminas de hemolinfa de ostra <i>Crassostrea sp.</i> (10/área) analisada no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil. *Diferenças significativas $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.	82
Figura 7. Ensaio cometa em hemolinfa de ostra do mangue <i>Crassostrea sp.</i> oriundas do Estuário Canal de Santa Cruz, PE -Brasil. Os núcleos dos hemócitos foram classificados de acordo com o sistema de níveis de dano (DNA cometa) de 0 - 4. Nível 0 representa células sem danos no DNA e nível 4 representa células com o máximo de dano no seu DNA.	83

Capítulo 2: Caracterização da acetilcolinesterase do tecido de ostra *Crassostrea sp.* e o efeito de pesticidas e íons em sua atividade

Figura 1. Efeito de pH (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de <i>Crassostrea sp.</i>	108
Figura 2. Temperatura ótima (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de <i>Crassostrea sp.</i>	108
Figura 3. Estabilidade térmica (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de <i>Crassostrea sp.</i>	109
Figura 4. Atividade da AChE em <i>Crassostrea sp.</i> em presença de concentrações crescentes (0-10 mM) dos inibidores seletivos: Iso-OMPA (A-Brânquias; B- Vísceras); BW284c51 (C- Brânquias; D- Vísceras); neostigmine (E- Brânquias; F- Vísceras); eserine (G- Brânquias; H- Vísceras).	110

Capítulo 3: Resposta de Biomarcadores bioquímicos a variações sazonais em três tecidos de ostra do mangue *Crassostrea sp.* extraída do Complexo estuarino canal de Santa Cruz, litoral norte de Pernambuco - Brasil

Figura 1. Localização geográfica do Complexo estuarino Canal de Santa (Pernambuco, Brasil).	127
Figura 2. Atividade de Acetilcolinesterase em brânquias (a), vísceras (b) e músculo adutor posterior (c) de espécimes ostra <i>Crassostrea sp.</i> depuradas (Coruripe/AL) e espécimes no Complexo estuarino canal de Santa Cruz, PE nas estações seca e chuvosa.	134
Figura 3. Atividade de Butirilcolinesterase em brânquias (a), vísceras (b) e músculo adutor posterior (c) de ostra <i>Crassostrea sp.</i> depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletadas no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca e chuvosa.	135
Figura 4. Atividade de catalase (Cat) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra <i>Crassostrea sp.</i> depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca e chuvosa.	136
Figura 5. Atividade de Superóxido dismutase (SOD) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra <i>Crassostrea sp.</i> depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca e chuvosa. ...	137
Figura 6. Atividade de Glutathione oxidada (GSSG) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra <i>Crassostrea sp.</i> depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca e chuvosa. ...	138
Figura 7. Atividade de Glutathione reduzida (GSH) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra <i>Crassostrea sp.</i> depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca e chuvosa. ...	139
Figura 8. Razão (GSSG/GSH) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra <i>Crassostrea sp.</i> depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca e chuvosa.	140
Figura 9. Lipoperoxidação (LPO - Tbars) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra <i>Crassostrea sp.</i> depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca e chuvosa.	141
Figura 10. Atividade da enzima digestiva Amilase (a) e Pepsina (b) no tecido visceral espécimes de ostra <i>Crassostrea sp.</i> depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca e chuvosa.	142

Figura 11. Atividade em presença dos substratos A - Bapna (específico para tripsina), B e C - Sapna e Sucphepnan (específico para quimotripsina), D - Leupnan (específico para leucino aminopeptidase) no tecido visceral espécimes de ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca e chuvosa. 143

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Parâmetros de danificação genômica da ostra *Crassostrea sp.* como ferramentas de diagnóstico de impacto ambiental estuarino

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas na Depuradora e no Estuário Canal de Santa Cruz na estação seca e chuvosa de 2015. O estuário está situado Vila Velha - Itamaracá, PE, Brasil.	72
Tabela 2. Análise microbiológica da água da Depuradora e dos pontos de coletas = P1, P2, P3 no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil nas estações seca e chuvosa.	72
Tabela 3. Análise microbiológica em <i>Crassostrea sp.</i> depurada e dos respectivos pontos de coletas = P1, P2 e P3 no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil nas estações seca e chuvosa.	73
Tabela 4. Análise de íons na água da Depuradora e do Estuário Canal de Santa Cruz.	74
Tabela 5. Análise de metais pesados no tecido visceral de <i>Crassostrea sp.</i> depuradas e do estuário Canal de Santa Cruz	75
Tabela 6. Número de células normais (N) e micronucleadas (MN), com a sua frequência (%) em espécimes de <i>Crassostrea sp.</i> coletadas na estação seca nos três pontos (P1, P2 e P3) do estuário Canal de Santa Cruz e Depuradora em Coruripe, no estado de Pernambuco e Alagoas, Brasil.....	76
Tabela 7. Número de células normais (N) e micronucleadas (MN), com a sua frequência (%) em espécimes de <i>Crassostrea sp.</i> coletadas na estação chuvosa nos três pontos (P1, P2 e P3) do estuário Canal de Santa Cruz e Depuradora em Coruripe, no estado de Pernambuco e Alagoas, Brasil.	77
Tabela 8. Médias das Frequências de micronúcleos (MN%), dos índices de danos (IDua) e frequências de danos no DNA em hemócitos de espécimes de <i>Crassostrea sp.</i> ($n = 10$ ostras/ponto) analisada no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil.	80
Tabela 9. Frequência de micronúcleos (MN) em moluscos bivalves.	88

Capítulo 2: Caracterização da acetilcolinesterase do tecido de ostra *Crassostrea sp.* e o efeito de pesticidas e íons em sua atividade

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de AChE em diferentes tecidos e espécies	107
---	-----

Tabela 2. Valores de IC 20 e IC 50 estimados para <i>Crassostrea sp.</i> na presença de inibidores seletivos.	111
Tabela 3. Valores de IC ₂₀ , IC ₅₀ e Ki estimados para AChE de <i>Crassostrea sp.</i> na presença de alguns íons metálicos.	111
Tabela 4. Valores de IC ₂₀ , IC ₅₀ e Ki estimados para <i>Crassostrea sp.</i> na presença de pesticidas organofosforado e carbamatos.	113

Capítulo 3: Resposta de Biomarcadores bioquímicos a variações sazonais em três tecidos de ostra do mangue *Crassostrea sp.* extraída do Complexo estuarino canal de Santa Cruz, litoral norte de Pernambuco - Brasil

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas na Depuradora e no Estuário Canal de Santa Cruz nas estações seca e chuvosa de 2015. O estuário está situado Vila Velha - Itamaracá, PE, Brasil.	131
Tabela 2. Análise de íons na água da Depuradora e do Estuário Canal de Santa Cruz.	132
Tabela 3. Análise de metais pesados no tecido visceral de <i>Crassostrea sp.</i> depuradas e do estuário Canal de Santa Cruz.	132
Tabela 4. Análise microbiológica da água da Depuradora e do estuário Canal de Santa Cruz, no estado de PE, Brasil nas estações seca se chuvosa.	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AChE - Acetilcolinesterase

ACh – Acetilcolina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância sanitária

BapNA - N- α -benzoil-L-arginina-p-nitroanilida

BChE – Butirilcolinesterase

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAT – Catalase

CBs – Carbamatos

ChEs - Colinesterases

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico

DNA - Ácido desoxiribonucléico

DMSO - Dimetilsulfóxido

DTNB - Ácido 5,5' Ditiobis (2-nitrobenzóico)

EC - Comitê enzimático

EC - Ensaio Cometa

EDTA - Etileno-diamina-tetra-acético

ES- Complexo Enzima-Substrato

FAO - Organização das nações Unidas para Alimentação e Agricultura

IC₅₀ – Concentração que inibi 50% da atividade enzimática

IC₂₀ - Concentração que inibi 20% da atividade enzimática

Iso-OMPA - Tetraisopropil pirofosforamida

IUBMB - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

k - Constante de velocidade

kDa- Quilo Daltons

K_i - Constante de inibição

K_m- Constante de Michaelis-Menten

MN – Micronúcleo

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura

MS – Ministério da Saúde

µg- Micrograma

μL – Microlitro

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPs – Organofosforados

POPs - Poluentes orgânicos persistentes

PGs- Pepsinogênios

ROS – Reactive Oxygen Species

SAPNA- Succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida

SOD – Superóxido dismutase

Tris - Tris-hidróximetil-aminometano

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

U/mg - Unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína

U/mL- Unidades por mililitro

USEPA - National Primary Drinking Water Standards

V_{max} - Velocidade máxima de catálise atingida por uma enzima

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1. Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz	22
2.1.1 Parâmetros físico-químicos	25
2.2 Poluição costeira no Brasil	27
2.2.1 Metais Pesados	29
2.2.2 Pesticidas	32
2.2.2.1 Organofosforados (OP)	33
2.2.2.2 Carbamatos (CB)	35
2.3 <i>Crassostrea</i> sp.	37
2.4 Biomonitoramento	40
2.5 Biomarcadores de contaminação aquática	41
2.5.1 Biomarcadores enzimáticos	44
2.5.1.2 Colinesterase (ChEs)	45
2.5.1.3 Acetilcolinesterase	46
2.5.2 Catalase (Cat)	47
2.5.3 Superóxido desmutase (SOD)	48
2.5.4 Tripsina	49
2.5.5 Quimotripsina	51
2.5.6 Pepsina	52
2.6 Glutationas - Biomarcador não enzimático	53
2.6.1 Glutathiona reduzida (GSH)	54
2.7 Biomarcadores de genotoxicidade	56
2.7.1 Teste de Micronúcleo (MN)	56
2.7.2 Ensaio Cometa (EC)	57
3. OBJETIVOS	59
3.1 Geral	59
3.2 Específicos	59
CAPÍTULO 1	61
Parâmetros de danificação genômica da ostra <i>Crassostrea</i> sp. como ferramentas de diagnóstico de impacto ambiental estuarino	62
CAPÍTULO 2	100
Caracterização da acetilcolinesterase do tecido de ostra <i>Crassostrea</i> sp. e o efeito de pesticidas e íons em sua atividade	101
CAPÍTULO 3	122
Resposta de Biomarcadores bioquímicos a variações sazonais em três tecidos de ostra do mangue <i>Crassostrea</i> sp. extraída do Complexo estuarino canal de Santa Cruz, litoral norte de Pernambuco - Brasil.	123
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	160
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
ANEXOS	172

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são considerados receptores finais de contaminantes liberados no ambiente, estando susceptíveis a ação de contaminantes aéreos, que chegam aos corpos d'água por deposição atmosférica e contaminantes terrestres que atingem os ambientes aquáticos através do escoamento destes pelas chuvas. Os ambientes costeiros têm sido durante muito tempo as áreas preferidas para a ocupação humana, devido as belezas naturais, os climas agradáveis, e os recursos variados (alimento, turismo, extrativismo vegetal etc.). Dentre os ambientes costeiros mais importantes destacam-se os estuários, que são de grande importância para a preservação, conservação e manutenção de várias espécies marinhas, fluviais e terrestres. Porém, nos últimos anos sofrendo grandes transformações, devido ao desenvolvimento econômico, causando degradação ambiental e queda na qualidade de vida para as populações que habitam seu entorno.

O estuário Canal de Santa Cruz, segundo a CONDEPE e CPRH (1982), é um dos mais importantes estuários do Estado de Pernambuco, que representa um recurso natural de alto valor para as comunidades carentes ribeirinhas, pois apresenta características favoráveis para o desenvolvimento da biota. Porém, o próprio CONDEPE e CPRH (1982) reconhecem que essa área apresenta sinais de desequilíbrio ecológico, devido a grandes cargas poluidoras lançadas ao longo do percurso dos rios que nele desembocam, principalmente o rio Botafogo. Esse processo é agravado pelo adensamento urbano, pois para a fixação de população nesse tipo de região é necessário que haja desmatamento, aterramento e construção de casas, que muitas vezes não tem saneamento básico e despeja seus dejetos diretamente no Canal, sem controle algum, provocando desequilíbrio da fauna e da flora, afetando a cadeia trófica, o que reduz ou extingue algumas espécies.

Os estuários são ambientes aquáticos de transição entre dulcícolas e marinhos. São regiões parcialmente fechadas nas quais a água do mar é bastante diluída pelo aporte de água doce do continente (THURMAN E TRUJILLO, 1999). As regiões estuarinas são extremamente importantes do ponto de vista biológico, pois apresentam alta riqueza de espécies e podem ser consideradas como “berçário” para diversas espécies marinhas, tanto pela proteção quanto pela grande disponibilidade de nutrientes (THURMAN E TRUJILLO, 1999). Situados em regiões costeiras, os estuários frequentemente encontram-se localizados em áreas de grande atividade antropogênica, sendo, portanto susceptíveis aos impactos decorrentes destas atividades. As principais fontes de impacto ambiental em estuários seriam o escoamento de esgoto proveniente de áreas urbanas, a liberação de diversos produtos

químicos (orgânicos e inorgânicos) pela atividade industrial, a agricultura e o fluxo de embarcações, atividade a partir da qual podem ocorrer vazamentos acidentais de petróleo e derivados, combustíveis e outros produtos transportados por via marítima (KENNISH, 1991). Através das diversas fontes acima citadas, os poluentes mais comumente encontrados em estuários são: metais pesados; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs); pesticidas bifenilas policloradas (PCBs), organoclorados (OC) e organofosforados (OP); dioxinas e furanos; detergentes e outros componentes do esgoto urbano e da ocupação humana.

Os pesticidas são largamente utilizados nos países em desenvolvimento de economia predominantemente agrícola para o controle de pragas e em campanhas de combate a vetores de doenças. O mecanismo principal de ação desses compostos se dá através da ligação com o sítio esterásico das colinesterases com fosforilação para organofosforados e carbamilação no caso dos carbamatos, produzindo a inibição das enzimas AChE e BChE (QUINN, 1987). As enzimas colinesterases tem sido testada como bioindicador, *in vitro*, da presença de organofosforados e carbamatos em água (GOLD-BOUCHOT, 2000). Os efeitos primários destes pesticidas são ampliados para outras esterases que podem ser inibidas, dentre elas algumas enzimas digestivas como a tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase (CASIDA e QUISTAD, 2004 e 2005).

Efeitos secundários como, indução de formação de radicais livres causadores de estresse oxidativos, devido a exposição aos pesticidas em questão também são observados. Resistência ao estresse oxidativo, causado por pesticidas, é influenciada pelo complexo antioxidante do qual fazem parte as enzimas catalase e superóxido-dismutase (BASHA e RANI, 2003). As alterações das atividades dessas enzimas apontam para outra via de monitoramento do estresse oxidativo ao qual está exposto o organismo bioindicador, validando também os resultados obtidos com as colinesterases. Portanto, é possível detectar e quantificar níveis de poluentes presentes em um meio através dos efeitos primários e secundários causados por esses praguicidas, tanto nas enzimas inibidas como nas detoxificadoras.

Esses pesticidas e outros poluentes industriais como metais pesados também podem induzir alterações genotóxicas, clastogênicas direta ou indiretamente (através do estresse oxidativo) formando adutos de DNA, danificando o genoma de um organismo exposto.

A expansão das atividades industriais e turísticas no canal de Santa Cruz, além do elevado crescimento populacional humano e sobrepesca, colocam em risco o delicado sistema ecológico deste local. Os moluscos bivalves, por exemplo podem sofrer diretamente as consequências negativas da poluição, pois se alimentam por filtração de forma a bioacumular elementos como metais pesados e pesticidas, contaminantes que podem causar danos à saúde

do próprio organismo bivalve. Moluscos apresentam várias características que o tornam excelentes bioindicadores. Estes organismos vêm sendo amplamente utilizados em estudos de toxicologia e monitoramento ambiental, na avaliação da saúde dos ecossistemas aquáticos tanto com relação à presença quanto aos efeitos de poluentes (BINELLI et al., 2006; NIGRO et al., 2006; TELES et al., 2006). Como vários outros moluscos bivalves, *Crassostrea sp.* tem características importantes de uma espécie sentinela, cujas são úteis no biomonitoramento da poluição (WALLNER-KERSANACH et al, 2000; REBELO et al, 2003; SILVA et al, 2003). As vantagens mais evidentes destes organismos são a sua ampla distribuição, hábito sésil e capacidade de concentração de produtos químicos com relação à água (SUNILA, 1987). Esta espécie representa uma importante fonte de alimento em áreas costeiras do Brasil (SILVA et al, 2006), onde também foi previamente utilizado como um modelo biológico para estudos toxicológicos ambientais (FERREIRA et al., 2004; ZANETTE et al, 2006). Esses estudos são baseados na análise de biomarcadores de alterações no ecossistema onde o organismo está inserido.

Alguns biomarcadores (por exemplo, citologia, genética, bioquímica ou molecular) têm sido empregados com sucesso para detectar efeitos subletal e deletérios sobre as populações de animais, quantificando o estresse ambiental e os efeitos causados pelos poluentes (MONSERRAT et al 2007; ADAM et al 2010).

Nesse contexto, visando a questão do impacto ambiental a biodiversidade e qualidade da água estuarina usada pela biota e população humana para diversos fins, o presente estudo teve como principal finalidade avaliar, de forma preliminar, os parâmetros físico-químicos em três pontos do Canal de Santa Cruz e colocar figura (P1= lado esquerdo 2013 (7°48'41.1"S – 34°51'26.3"W); P2= lado direito Norte (7°48'37.4"S – 34°51'37.4"W); P3= lado direito sul (7°48'34.2"S – 34°51'46.1"W)

Canal de Santa Cruz pela determinação de metais pesados e análise microbiológica na coluna d'água e nos tecidos moles da ostra *Crassostrea sp.* Ainda, considerando que a análise química apenas não é suficiente para avaliação dos efeitos adversos das misturas complexas nos ecossistemas aquáticos, essa espécie nativa de ostra foi escolhida como bioindicador para avaliar e comparar com uma região referência, diferentes áreas do estuário Canal de Santa Cruz impactadas por atividades antropogênicas, através da utilização de diferentes classes de biomarcadores, bem como padronizar metodologias que possam ser efetivamente aplicadas em estudos de biomonitoramento em regiões costeiras do Brasil.

A espécie escolhida nesse estudo foi o bivalve *Crassostrea sp.*, a ostra-do-mangue, típica do litoral Norte-Nordeste, devido a sua grande importância sócio-econômica, tendo em vista seu consumo, este por sua vez demonstra o risco potencial para a espécie estudada bem

como para as populações humanas que a utilizam como fonte de alimentação. Por tratar-se de uma espécie abundante, de hábito bentônico filtrador, capaz de acumular microrganismos e resíduos de poluentes, possibilita maior abrangência e confiabilidade aos resultados.

No Brasil, existem poucos trabalhos realizados na área, voltados especificamente para o biomonitoramento *in vivo*, utilizando moluscos bivalves. Espera-se com isso dar contribuição mínima a estudos posteriores para a busca de métodos de controle ambiental adequados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz

A palavra estuário deriva do latim *aestuarium*, que significa área baixa com influência dos mares. Existem várias definições para estuários, que depende do segmento de estudo. Miranda et al. (2002) dizem que a definição mais satisfatória é a adaptada de PRICHARD (1955), porque define-se estuário como: “um corpo de água costeiro semifechado com ligação livre com o oceano aberto, estendendo-se rio acima até o limite da influência da maré, sendo que em seu interior a água do mar é mensuravelmente diluída pela água doce oriunda da drenagem continental”. Ecologicamente, Perillo (1995), acrescenta ainda que o estuário pode “sustentar espécies biológicas eurihalinas durante uma parte ou por todo o seu ciclo de vida”.

Os estuarinos são encontrados ao redor de todo o globo, em qualquer tipo de clima. As melhores condições para seu desenvolvimento são encontradas nas planícies costeiras das médias latitudes. Nas regiões tropicais, o clima, favorece o desenvolvimento de um tipo especial de ecossistema, os chamados manguezais (RUSSELL, 1967). A água doce do rio transporta grande quantidade de nutrientes e matéria orgânica para os estuários e, juntamente com tempo de residência (ou retenção) da água, propicia condições para o desenvolvimento dos produtos primários e de uma cadeia alimentar ativa. Por isso, esses ambientes constituem um dos principais fornecedores de alimentos para organismos bentônicos, epi-bentônicos e pelágicos, sendo de grande importância na cadeia alimentar marinha. Qualquer perturbação nesse ecossistema provoca uma reação em cadeia que percutirá em outros sistemas ligados a ele direta ou indiretamente (SILVA, 2004).

Econômica e socialmente, esse ecossistema é utilizado como fonte de produtos alimentícios (peixes, moluscos, crustáceos, etc.) para o homem, que nele tira seu sustento.

Além disso, dependendo da sua profundidade, serve como canal de navegação para pequenas embarcações que transportam contingentes humanos e produtos. Assim como, serve também de área de recreação das populações que habitam seu entorno e muitas vezes são utilizadas como atração turística.

Compreendido entre as coordenadas: 7°41'36''S / 7°48'54''S e 34°49'20''W / 34°53'18''W, a área em estudo está situada no litoral Norte do Estado de Pernambuco, cerca de 55 km da cidade do Recife. O canal de Santa Cruz faz a separação entre a Ilha de Itamaracá e o continente e é considerado um complexo estuarino de aproximadamente 22 km de extensão. O canal é em forma de “U” alongado que está conectado com o Oceano Atlântico em ambas as extremidades do “U” e recebe água doce de seis pequenos rios (MEDEIROS; KJERFVE, 2005). Ocupa uma área de aproximadamente 37 km² com 1,5 km de largura média e profundidade variando entre quatro a cinco metros, sendo as maiores profundidades na parte Norte (SILVA et al, 2011). A penetração da água oceânica se dá na porção Norte do canal através da Barra de Catuama, situada no município de Goiana. (CONDEPE/CPRH, 1982).

O processo de impacto ambiental no Canal de Santa Cruz vem se agravando, devido as ações humanas desenvolvidas ao longo do curso de seus rios depositários, refletindo as agressões sofridas por eles, principalmente o avanço urbano em suas margens. A expansão imobiliária é considerada o maior fator de desequilíbrio ecológico do Canal, pois é através dela que muitas características do meio ambiente são afetadas. Entre elas pode-se citar o desmatamento, que promove uma deposição diferenciada de sedimentos, e ainda modifica toda configuração e dinâmica do Canal. Além do desmatamento, essa expansão aumenta a descarga de dejetos orgânicos e lixo em geral.

O complexo estuarino do Canal de Santa Cruz é composto pelas bacias hidrográficas dos rios Carrapicho, Igarassu e Botafogo, onde ao longo destes instalaram-se inúmeras residências e indústrias que ao longo dos anos vem despejando, sem tratamento, seus dejetos diretamente nesses locais tornando o impacto ambiental visíveis nessas áreas. Segundo Lima (2008), os impactos mais marcantes ocorreram ao longo do rio Botafogo, dentre eles citamos: lançamento resíduo diretamente no rio, pela Indústria Agroquímica do Brasil (AQB/SA), que por esse motivo foi fechada em 1991; despejos históricos de efluentes como mercúrio pela fábrica de soda-cloro, CAII, desde sua implantação em 1963; e, despejos da fábrica de pesticidas, Milenia Agro Ciência que certamente contribuiu como vetor de poluição do rio Botafogo.

No Canal de Santa Cruz desembocam um conjunto de rios e riachos (Figura 1). Os principais são: Itapessoca, Carrapicho, Itapirema, Arataca, Riacho Jardim, Palmeira,

Botafogo, Cumbe, Catua, Itapicuru, Tabatinga, Congo, Bonança, Catuama, Utinga e Igarassu. Dentre esses afluentes, se destacam os rios Botafogo (norte) e o Igarassu (sul), que sofrem ao longo de seus cursos muita interferência antrópica, levando para o Canal todo o aporte de poluição.

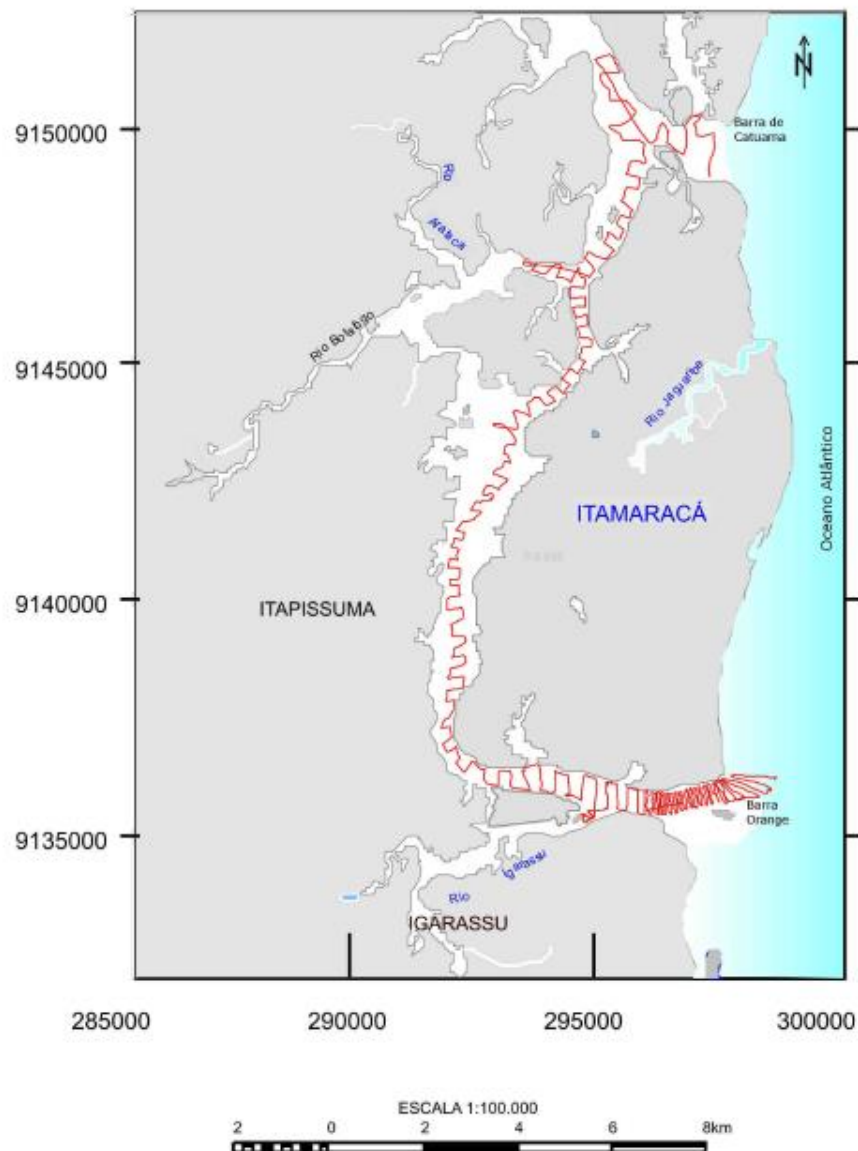
A descarga de água doce vem dos rios, riachos e da precipitação pluviométrica, segundo Medeiros e Kejerfeve (1993), é de $1 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ para o período seco, e de $56 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, no período chuvoso. Segundo estes mesmos autores, as marés são semi-diurnas com amplitude de até 2,2 m na preamar e de 1,1 m na baixa mar. A sua propagação dentro do estuário se dá pelas aberturas do Norte (Barra de Catuama) e do Sul (Barra Orange) do Canal e atingem velocidade de 8,9 m/s e 6,3 m/s, respectivamente.

Nas atividades agrícolas desenvolvidas nas áreas adjacentes ao Canal e aos rios distributários, é comum a utilização de pesticidas organoclorados, que segundo Lira (1975) chegavam diluídos no Canal e não representavam perigo para o ecossistema local. Porém vale salientar que já se passaram mais de trinta anos, desde o trabalho de Lira (1975), e nesse período as áreas cultivadas e habitadas aumentaram consideravelmente. Dentre as atividades agrícolas, o cultivo da cana-de-açúcar, tem um maior impacto, pois ocupa grandes áreas sendo necessários um desmatamento efetivo, que muitas vezes atingem as áreas de mangues que se encontram nos terrenos mais elevados.

A atividade pesqueira foi durante muito tempo a principal atividade econômica no local. Com o aumento da população, do lançamento de esgotos e da pesca predatória, vem sofrendo continuamente um decréscimo na sua produtividade, levando os pescadores a exercerem outras atividades. Entretanto, os que ainda praticam essa atividade, não estão equipados para exploração em alto mar, limitando-se ao uso do canal, onde a maior parte da produção é destinada ao consumo próprio.

O Canal de Santa Cruz recebe contribuição da água oceânica e fluvial. A penetração de água oceânica se dá ao norte pela Barra de Catuama e ao sul pela Barra Sul, onde se encontra a Coroa do Avião. A resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA 357/2005, regulamenta a qualidade da água segundo os parâmetros indicadores específicos (coliformes fecais, odor, turbidez, pH, óleos e graxas, etc.) de modo a assegurar seu controle de poluição e seu uso sustentável, sobre as águas destinadas à: a) preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; b) recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho) e/ou secundário; c) proteção das comunidades aquáticas; d) aquicultura e a atividade de pesca; e) navegação; e f) harmonia paisagística.

Figura 1. Localização geográfica do Complexo estuarino Canal de Santa Cruz, PE- Brasil.



Fonte: Silva, 2008.

2.1.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos (salinidade, temperatura, transparência, oxigênio dissolvido, pH e sais nutrientes) das águas estuarinas são de grande importância para a sobrevivência de várias espécies que se desenvolvem em ambientes desse tipo, qualquer alteração em seus valores pode levar ao desaparecimento de várias espécies. Variações desses elementos também são utilizados para determinar a balneabilidade.

A salinidade é a medida da quantidade de sais existentes em massas de água naturais (um oceano, um lago, um estuário ou um aquífero). A salinidade média dos oceanos é de 35. As águas salobras de 0,5 a 30 e a água doce entre 0 a 0,5 (CONAMA, 2005). De acordo com Vasconcelos-Filho et al. (1998) a salinidade do Canal de Santa Cruz apresenta grande dependência do ciclo de maré, do aporte fluvial e do índice pluviométrico. Devido à baixa profundidade e a alta taxa de evaporação, a salinidade concentra-se em torno de 30, mantendo-se dentro de padrões costeiros. Marinho et al. (2002), registraram que a salinidade do Canal é usualmente menor na região interiorana, e que nas desembocaduras norte e sul os valores são bem próximos das zonas costeiras.

O Canal de Santa Cruz não apresenta uma estratificação térmica. Sua temperatura varia de acordo com os períodos chuvoso e seco, e com a maré. Segundo Flores-Montes (1996), durante o período seco (janeiro a março) a média anual é aproximadamente de 30,5°C na preamar e 28,3°C na baixa mar, no período chuvoso (junho e julho), a média é de 28,4°C na preamar e 27,5°C na baixa mar.

Carmouze (1994) diz que o oxigênio dissolvido é importante para detectar impactos ambientais como a eutrofização e poluição orgânica. Em geral, o oxigênio diminui quando a água recebe grandes quantidades de substâncias orgânicas (resíduos domésticos, etc) que são de compostos por microrganismos que consomem o oxigênio. Segundo o CONAMA (2005), seus valores não podem ser inferiores que 5 mg/L O₂, para águas salobras e 6 mg/L O₂, para águas salgadas. De acordo com Cavalcanti (1976) o oxigênio e o dióxido de carbono são considerados os gases mais importantes dissolvidos na água do mar. Os gases dissolvidos são controlados pela temperatura, salinidade, atividades biológicas, correntes e os processos de mistura, e também pelo teor de material em suspensão nos estuários. O mesmo autor diz que, devido à pouca profundidade e as correntes de mares no Canal de Santa Cruz, os teores de oxigênio dissolvido mostram pequenas variações entre as camadas superficial e profunda, assim como entre as preamares e as baixa-mares não ocorrem diferenças acentuadas. Sazonalmente, as maiores concentrações aparecem nos meses de julho e agosto (máxima de 5,42 mg/L). Marinho et al. (2002) constataram que os valores de oxigênio dissolvido são mais elevados na camada superficial e durante as preamares, atingindo concentrações acima do percentual de saturação. Os valores estão entre 5,51 mL.L⁻¹ (114,3% de saturação) e de 2,02 mL.L⁻¹ (44,79% de saturação). Figueiredo et al. (2006) encontrou valores entre 6,95 mL.L⁻¹ a 2,38 mL.L⁻¹ na Barra Orange, e 5,91 mL.L⁻¹ a 3,05 mL.L⁻¹ na Barra de Catuama.

Para Carmouze (1994) o pH (potencial hidrogeniônico) expressa o grau de acidez ou basicidade de uma solução. Sua escala varia de 0-14. Valores abaixo de 7 indicam acidez, e

valores acima desse valor indicam aumento da alcalinidade. Na água do mar os valores de pH variam de 7,5 a 8,4 e nas águas salobras de 6,5 a 8,5. (CONAMA, 2005). Altos valores são encontrados na superfície ou próximos a ela. O pH decresce consideravelmente em regiões onde há um grande consumo de oxigênio por processos biológicos e, como consequência, o teor de dióxido de carbono também é alto. Isso se aplica em regiões estuarinas onde o volume do material em suspensão contribui para a fertilização da água, causando um decréscimo no teor de oxigênio dissolvido (CAVALCANTI, 1976).

A distribuição do pH entre a superfície e o fundo do Canal de Santa Cruz é homogênea e pequenas diferenças são encontradas entre a preamar e a baixa-mar. Sua extensão apresenta uma certa uniformidade, com valores um pouco mais elevados na Barra de Catuama, e um pouco mais baixos na desembocadura do rio Congo. Os valores máximos estão próximo de 8,1 nas áreas de maior influência marinha e de 7,3 nas desembocaduras dos rios.

2.2 Poluição costeira no Brasil

Historicamente, as regiões costeiras são caracterizadas pelo grande número de ocupações humanas que vivem da exploração dos recursos naturais. O Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil (BRASIL, 1996) constatou que cerca de metade da população brasileira reside a não mais que 200 km da costa, totalizando mais de 70 milhões de habitantes. As atividades humanas têm provocado, ao longo dos anos, grandes impactos ambientais. O crescente desenvolvimento industrial, urbano e agrícola tem levado a um aumento considerável na produção de resíduos que, quando lançados no ambiente, podem causar sérios comprometimentos à qualidade ambiental e à saúde da biota.

Os poluentes inseridos no ambiente, bem como os subprodutos de sua degradação, podem se associar e formar misturas complexas de constituição e ação desconhecidas e causar efeitos deletérios aos organismos expostos (WHITE; RASMUSSEN, 1998). A ação destes compostos pode induzir efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e genéticos (CLAXTON et al., 1998), que interferem nos aspectos reprodutivos, de sobrevivência e, conseqüentemente, na estrutura das populações (FRACÁCIO et al., 2000). As substâncias provenientes de efluentes domésticos e industriais (MATSUMOTO et al., 2005; HOSHINA et al., 2008), os agrotóxicos (BIANCHI et al., 2011; MARAN et al., 2010; FARINA et al., 2011), as drogas farmacêuticas, os corantes (ZHANG et al., 2009a; VENTURA-CAMARGO et al., 2011), os metais pesados (LU et al., 2011), os hidrocarbonetos derivados do petróleo e

outros compostos orgânicos (MAZZEO et al., 2010; HANZALOVA et al., 2010) podem induzir alterações à biota, tanto pela exposição direta como indireta.

Pela grande exposição dos seres vivos a diferentes agentes químicos, torna-se cada vez mais necessário conhecer os processos biológicos que possam ser alterados pela ação dos contaminantes, bem como identificar as substâncias capazes de interagir com as diferentes organelas e/ou biomoléculas celulares, e, assim, melhor combater os efeitos biológicos da poluição, para minimizar os seus riscos (SILVA; FONSECA, 2003).

Segundo Krishnamurthi et al. (2007), poucos são os estudos que avaliam os riscos ocasionados por amostras ambientais, o que leva a uma falta de informações sobre a sua toxicidade, pois em muitos casos falta compreender o comportamento das substâncias genotóxicas presentes em misturas complexas, bem com as suas interações sinérgicas e antagonistas. Para entender melhor os efeitos gerados por essas interações, são aplicados ensaios biológicos que possibilitem caracterizar os efeitos de exposição crônica e/ou aguda sobre os organismos, mesmo sem a quantificação e identificação prévia dos compostos químicos presentes na amostra (OHE et al., 2004).

O potencial genotóxico de poluentes ambientais pode estar relacionado com processos carcinogênicos, teratogênicos e a uma série de outros distúrbios. Em decorrência disto, há cada vez mais a necessidade de desenvolvimento de ensaios com organismos vivos sensíveis, que sejam capazes de responder às potencialidades tóxicas dos químicos ambientais (KLOBUCAR et al., 2003) e de avaliar a ação destes químicos sobre o material genético dos organismos, mesmo quando estes estiverem presentes em baixas concentrações (FRENZILLI et al., 2009). Também, é de extrema importância para a saúde ambiental a realização de testes de toxicidade e genotoxicidade, combinados com análises físico-químicas, a fim de avaliar a qualidade dos ambientes (EGITO et al., 2007).

As análises físico-químicas permitem detectar a presença de agentes químicos que podem oferecer um perigo para o ambiente aquático e para os seres humanos (VAN DER OOST et al., 2003). No entanto, segundo Oberholster et al. (2008), a realização apenas de análises químicas e físicas da água não fornece uma avaliação detalhada da saúde de um ecossistema. Os autores acrescentam que o monitoramento químico não leva em conta a variedade de perturbações induzidas pelo homem, que incluem as alterações decorrentes de degradação e destruições de *habitats*, capazes de prejudicar a saúde biológica. Portanto, o biomonitoramento oferece algumas vantagens adicionais importantes, que as análises químicas convencionais, sozinhas, são incapazes de oferecer (ZHOU et al., 2008).

2.2.1 Metais Pesados

A poluição ambiental causada por resíduos de metais tóxicos é muito relevante pelo seu amplo uso em processos antrópicos, sendo que muitos efluentes chegam ao meio ambiente sem qualquer tratamento (SCHERER et al., 2003). Dentre os diferentes ecossistemas que sofrem com este tipo de contaminação, as áreas de manguezais têm sido frequentemente atingidas. Devido à baixa dinâmica de ondas inerentes a esse ambiente, o processo de recomposição destas áreas é demorado podendo levar vários anos (KENNISH, 1997).

Os metais ocorrem naturalmente no meio ambiente, mas desde a revolução industrial esta ocorrência aumentou muito com a atividade agrícola e industrial (FOUNTAIN; HOPKIN, 2004). Os metais pesados possuem diversos mecanismos de ação, exercendo seus efeitos tóxicos ao combinar-se com um ou mais grupos reativos essenciais para funções fisiológicas normais. O principal efeito tóxico desse grupo de elementos é a sua ação sobre a estrutura das proteínas, muitas delas com atividade enzimática. Ao alterarem as atividades enzimáticas, os metais pesados afetam o metabolismo, membranas celulares e organelas. A influência destas substâncias se dá por mecanismos complexos, tais como: interação com metais essenciais por similaridade eletrônica, formação de complexos metal-proteína, inibição enzimática de proteínas com grupos sulfidrilas ($-SH$) e comprometimento na função de organelas celulares como mitocôndrias, lisossomas e microtúbulos (FERRER, 2003).

Devido ao amplo efeito exercido pelos metais tóxicos, não são conhecidos todos os mecanismos de ação destes compostos (MYERS et al., 2000). Além disso, muitos fatores afetam os efeitos patofisiológicos dos metais pesados, tais como a sua forma química, via de entrada no organismo, duração da exposição, concentração, idade e espécie do animal (MOLLER-MADSEN, 1990). Van Straalen et al. (1987) sugeriram que a principal diferença da ação tóxica dos metais ocorre devido à sua essencialidade versus sua não essencialidade nos organismos, sendo que níveis de metais essenciais são regulados e metais não essenciais são acumulados e estes se tornam tóxicos em determinadas concentrações.

Amoozadeh et al. (2014) constataram que as cracas bioacumulam uma maior quantidade de metais quando comparadas a 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 à 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.

Pinheiro et al. (2013) observaram que as altas concentrações de metais pesados como o cobre (Cu), cádmio (Cd), cromo (Cr), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg), quantificadas em amostras de água e sedimento coletados em região de manguezal fortemente impactado, estão diretamente relacionadas ao mecanismo de indução de danos genômicos em caranguejos da espécie *Ucidescordatus*, revelando o potencial mutagênico destes compostos em crustáceos. Adam et al. (2010) em trabalho realizado com exemplares da espécie de peixe *Poeciliavivipara* 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, detectados pela formação de micronúcleos nos eritrócitos avaliados. Estudos recentes têm indicado o potencial genotóxico destes contaminantes em diversos grupos taxonômicos de animais aquáticos, como observado em mexilhões (ROCHA et al., 2014), peixes (BARSIENTE et al., 2013) e gastrópodes (SARKAR et al., 2015).

Os metais pesados são compostos quimicamente reativos que são introduzidos nos ecossistemas aquáticos naturalmente através dos processos químicos e do intemperismo. Enquanto a contribuição atribuída à atividade humana é um reflexo do lançamento direto de grandes quantidades de efluentes industriais e urbanos sem tratamento adequado (COIMBRA et al., 2013). Uma vez lançados no ambiente esses compostos tendem a se distribuir nos diferentes compartimentos: água, sedimento e biota. Essas substâncias não são biodegradáveis e desta forma, tendem a se acumular, nesses compartimentos, onde manifestam sua toxicidade (NUNES et al., 2014). Por este motivo, os metais pesados são alvos de preocupação por parte dos programas de monitoramento e legislação ambiental (MANSOURI et al., 2012).

No Brasil, a resolução 357/2005 do CONAMA no Ministério do Meio Ambiente e a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde estabelecem limites máximos desses metais tóxicos em água superficial e água de consumo humano respectivamente. Entretanto, ainda não se exige a determinação das espécies químicas, relevante à biodisponibilidade produzida nas diferentes matrizes, nem sobre os efeitos subletais, avaliados pelos biomarcadores, destes metais nos organismos aquáticos. Por outro lado, a Resolução Conama 421/2010 relacionada ao material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras dispõe sobre as análises de metais em material oriundo do sedimento (sedimentos totais, ou suas frações - elutriato, água intersticial, interface água-sedimento) e

recomenda a realização de ensaios ecotoxicológicos como complementar as análises físico-químicas.

Embora alguns metais pesados tal como Fe, Cu, Zn e Co sejam essenciais para a manutenção da vida, todos os metais são tóxicos em concentrações elevadas, pois causam estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), tais como o íon superóxido (O^{2-}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e oxigênio livre (O^1) (KHAYATZADEH, 2010). Os radicais livres produzidos pela presença de compostos tóxicos no organismo reagem com lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos e resultam em diversas injúrias bioquímicas ou genéticas (COGO et al., 2009). Diversos estudos têm informado sobre efeitos inibitórios e algumas vezes também efeitos ativadores de metais sobre atividades enzimáticas. A ligação dos metais a enzima ocorre através de ligações com grupamentos tióis proteicos, alterando o estado de hidratação do sítio ativo (MARQUES et al., 2011).

Metais pesados e diversos tipos de pesticidas, são compostos potencialmente citotóxicos e/ ou carcinogênicos aos diversos organismos vivos (LEMAIRE, LIVINGSTONE, 1993). Eles e outros poluentes industriais podem induzir a alterações genotóxicas, clastogênicas direta ou indiretamente (através do estresse oxidativo) formando adutos de DNA, modificando o perfil proteômico de um organismo exposto (DAILIANIS et al., 2003; CASIDA e QUISTAD, 2004). Os metais, por não serem biodegradáveis, podem causar risco, principalmente por serem facilmente incorporados à cadeia alimentar e tonarem-se tóxicos aos organismos vivos quando ultrapassam determinadas concentrações (BARROS, 2012).

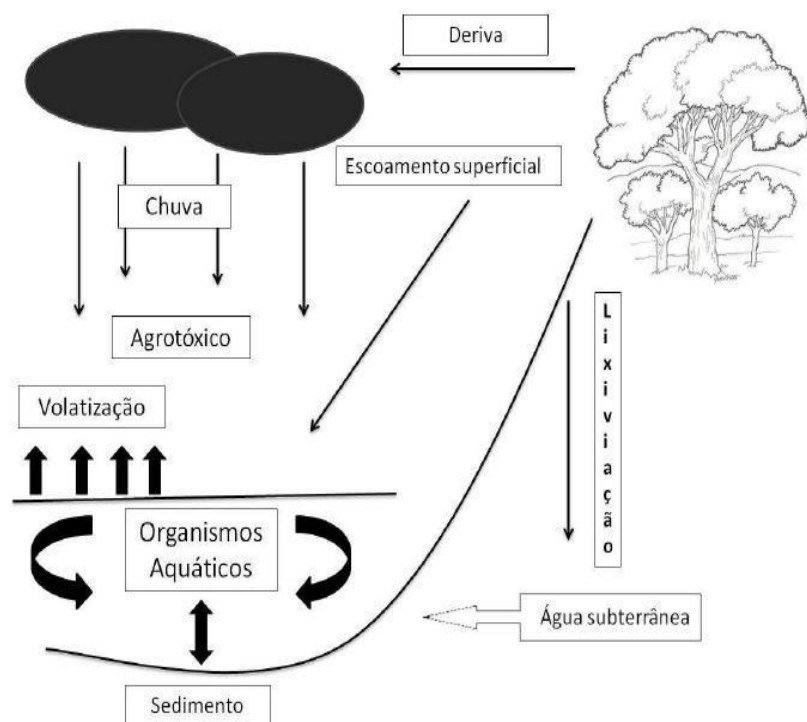
A contaminação da água por metais tornou-se iminente e, conseqüentemente efeitos adversos são inevitáveis em humanos, plantas e animais, onde um dos táxons mais atingidos são os moluscos bivalves (MACHADO et al. 2002).

Nesse contexto, moluscos bivalves têm sido amplamente utilizados em programas de monitoramento para indicar flutuações da disponibilidade dos metais traço em água e sedimentos, porque estes organismos são capazes de acumular metais em altas concentrações (WALLNER-KERSANACH et al; 2000). O uso de ostras como bioindicadores de metais traço tem sido bem documentada (PHILLIPS e ARCO-ÍRIS, 1993). Devido a sua capacidade para acumular concentrações elevadas de metais traços, a ostra *Crassostrea rhizophorae* é apontada como um importante bioindicador de metais traços em áreas tropicais (WALLNER-KERSANACH et al, 2000).

2.2.2 Pesticidas

Os pesticidas são poluentes amplamente utilizados, dos quais apenas 0,1% destes pesticidas aplicados na agricultura atingem as pragas-alvo, de forma que o restante desse material contendo o princípio ativo se espalha pelas imediações, contaminando o ar e o solo (HART e PIMENTEL, 2002). Os organofosforados (OPs) e carbamatos (CBs) podem atingir os ecossistemas aquáticos e lençóis freáticos (Figura 2), carregados pelo escoamento superficial e lixiviação das águas da chuva, irrigação e drenagem, bem como através de pulverizações (TOMITA e BEYRUTH, 2002). Uma vez presente no ambiente aquático, eles podem se associar ao material em suspensão, aos sedimentos no leito do corpo d'água ou ser absorvidos pelos organismos onde sofrerão bioacumulação ou detoxificação (NIMMO, 1985).

Figura 2. Principais rotas dos pesticidas em ecossistemas aquáticos



Fonte: (Tomita e Beyruth, 2002).

Os pesticidas OPs e CBs são os inibidores mais comuns das colinesterases (ChEs), eles apresentam um variado grau de toxicidade em humanos (CASARETT et al., 1996). Atualmente mais de 200 OPs diferentes, e mais de 25 CB são produzidos mundialmente (OBREGON, 2006; SINGH et al., 1995).

De acordo com a Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89 são considerados pesticidas os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, bem como em ambientes urbanos, cuja finalidade seja a preservação da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Esses compostos são classificados, de acordo com o organismo que desejasse eliminar, como inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscicidas, entre outros. Em relação a toxicidade oral e dérmica são classificados em extremamente tóxicos (classe I a), altamente tóxicos (classe I b), moderadamente tóxicos (classe II) e discretamente tóxicos (classe III). Conforme as classes químicas os pesticidas são agrupados em piretróides, organoclorados, organofosforados, carbamatos, entre outros (WHO/UNEP/ILO/IPCS, 2006).

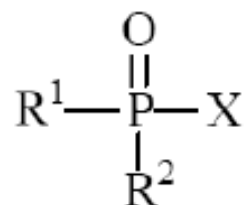
Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos receberam de forma alarmante grandes quantidades desses compostos, liberados pelas comunidades urbanas, propriedades rurais e indústrias. No início da década de 1960 a sociedade começou a se preocupar com os efeitos adversos dessas substâncias e o risco potencial que representam para a saúde humana e o meio ambiente, e, em vários países, a produção, comercialização e utilização de muitos desses compostos, em especial aqueles considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs), tais como os organoclorados, foram proibidos (FRANÇA et al., 2010). Com a proibição da maioria dos compostos organoclorados (compostos menos tóxicos, porém com maior bioacumulação no meio ambiente), após a II guerra mundial, os pesticidas carbamatos e organofosforados tiveram seu uso intensificado. Atualmente estes são os pesticidas mais utilizados em todo mundo e juntos respondem por mais de 50% do que é comercializado (SILVA et al., 2013). São largamente utilizados nos países em desenvolvimento, de economia predominantemente agrícola.

2.2.2.1 Organofosforados (OP)

Pouco antes da II Segunda Guerra Mundial surgiram os neurotóxicos ou compostos organofosforados (FRANÇA et al., 2010; GONÇALVES, 2009), que são inibidores irreversíveis da AChE e muito tóxicos, e dependendo da dose podem levar à morte (PATOČKA et al., 2005). A estrutura geral dos OP está representada na (Figura 3), sendo que R1 e R2 são grupos aril ou alquil ligados diretamente ao átomo de fósforo, e X pode ser

representado por diversos grupos: halogênio, alifático, aromático ou heterociclo e está diretamente ligado ao fósforo.

Figura 3. Estrutura geral dos compostos OP.

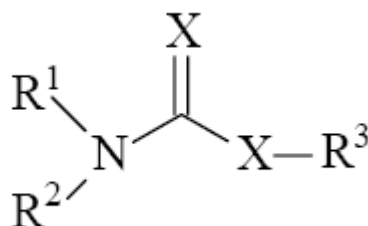


Fonte: Matos, 2012.

Os pesticidas organofosforados (OPs) compreendem um elevado número de substâncias classificadas quimicamente como ésteres, amidas ou derivados de ácidos fosfóricos pentavalentes. Os carbamatos (CBs) são ésteres ou derivados N-substituídos do ácido carbâmico (monoamida do ácido carbâmico). Ambos apresentam baixa solubilidade em água e são, em geral, facilmente hidrolisáveis em ambientes alcalinos (GHAZALA et al., 2014). Em geral, os OPs necessitam de biotransformação para se tornarem toxicologicamente ativos, ao contrário dos CBs que já são bioativos. Esses pesticidas são inibidores típicos das enzimas colinesterases (WANG et al., 2015).

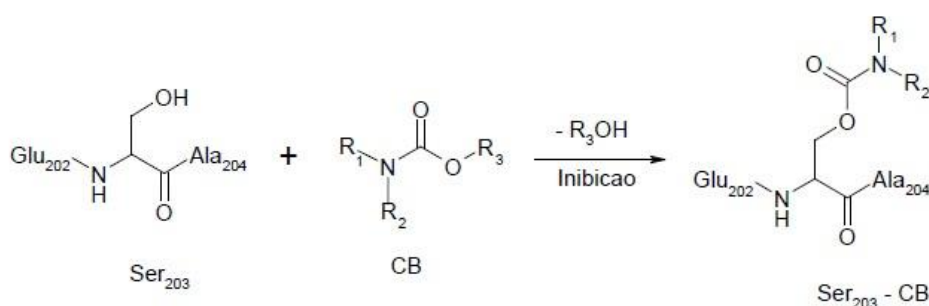
A interação entre a acetilcolinesterase e seu inibidor organofosforado envolve principalmente o sítio esterásico, formando um complexo bastante estável (ATSDR, 2007). A interação com o sítio esterásico da AChE difere apenas no tipo de ligação – fosforilação para organofosforado e carbamilação para carbamatos (ASSIS et al., 2011). A estabilidade do complexo formado está relacionada fundamentalmente com a estrutura química do composto organofosforado. A ação anticolinesterásica dos compostos OP não está restrita à AChE do tecido nervoso central e periférico, ocorrendo de forma paralela a inibição da Butirilcolinesterase (BChE) plasmática, da AChE eritrocitária em vertebrados (MUTCH, BLAIN e WILLIAMS, 1992). Os OPs se ligam covalentemente ao resíduo catalítico Ser203, impedindo a ligação do substrato (Figura 4).

A inibição por carbamatos é reversível e a enzima pode rapidamente ser regenerada numa fração de minutos ou horas. Já a inibição por organofosforado tende a irreversibilidade, uma vez que a enzima é progressivamente fosforilada por uma ligação covalente, processo que normalmente leva 24 a 48hs, impedindo a enzima de ser regenerada

Figura 5. Estrutura geral dos carbamatos.

Fonte: Matos, 2012.

Semelhante aos OPs, os CBs também se ligam ao sítio ativo da enzima (Figura 6), entretanto, o grupo hidroxil do resíduo de serina promove um ataque nucleofílico ao grupo carbonil do CB (ROSMAN, 2009).

Figura 6. Inibição da AChE por carbamato.

Fonte: Matos, 2012.

OPs e CBs podem atingir os ecossistemas aquáticos, e uma vez presentes neste ambiente tendem a ser absorvidos pelos organismos, que por sua vez tendem a sofrer bioacumulação. Essas substâncias são transportadas para esse meio carregadas por escoamento superficial e lixiviação das águas da chuva, irrigação e drenagem ou através de pulverizações (Figura 2), e podem penetrar nos organismos aquáticos através de diversas vias: por via oral – através da ingestão de alimento contaminado, respiratória – por meio das brânquias e dérmica – através da superfície do corpo. A exposição a esses compostos pode provocar inúmeras alterações fisiológicas, por influência direta sobre determinadas estruturas celulares, como na membrana lisossomal, a qual pode ser degradada e provocar reações adversas no organismo, gerando grave desequilíbrio ecológico (COGO et al., 2009).

Pesticidas, metais pesados e compostos organoestânicos presentes no ambiente aquático também podem inibir essas enzimas mediante danos irreversíveis nas células secretoras dos tecidos digestivos (CASIDA e QUISTAD, 2005; SILVA et al., 2011).

Segundo CASIDA e QUISTAD, (2005), os efeitos primários dos pesticidas não se restringem as colinesterases: cerca de 50 esterases podem ser inibidas, entre elas algumas enzimas digestivas. Como a tripsina (EC 3.4.21.4), quimotripsina (EC 3.4.21.1) e carboxipeptidase (EC 3.4.17.15). Os efeitos de tais poluentes sobre outras enzimas digestivas como a pepsinas (EC 3.4.23.x) e a amilase (EC 3.2.1.1), ainda não são conhecidos, necessitando ser elucidado para fins de monitoramento de outros contaminantes que não pesticidas e cianotoxina.

No prosseguimento da cadeia alimentar, os pesticidas chegam até os alimentos e demais produtos de origem agroindustrial utilizados pelos homens, tornando-se clara a necessidade de se monitorar tanto o meio ambiente quanto a qualidade dos alimentos. Particularmente pela alta toxicidade desses pesticidas em relação aos organismos aquáticos, os recursos hídricos devem ser continuamente monitorados (BEAUVAIS et al., 2002).

2.3 *Crassostrea sp.*

A ostra-do-mangue, *Crassostrea sp.* (Figura 7), também conhecida como ostra nativa, pertence à família Ostreidae, classe Bivalvia. Habita regiões costeiras e pode ser encontrada fixa às raízes aéreas das vegetações de mangue, ocorrendo também na faixa entre marés dos costões rochosos ou em bancos submersos (QUEIROZ; JÚNIOR, 1990). É uma espécie eurihalina e osmoconformadora, distribuindo-se do Caribe a Santa Catarina, no sul do Brasil. São animais dióicos e ovíparos, mas não apresentam dimorfismo sexual. São filtradores, com capacidade de filtração em torno de 90 a 100 litros de água do mar por dia (CASASBELLAS, 1991).

Muitos autores sugerem a utilização de moluscos bivalves para estudos de monitoramento da contaminação aquática (BAINY et al., 2000; NIYOGI et al., 2001a). Estes organismos vêm sendo amplamente utilizados em estudos de toxicologia e monitoramento ambiental, na avaliação da saúde dos ecossistemas aquáticos tanto com relação à presença quanto aos efeitos de poluentes (SILVA et al., 2001; NASCI et al., 2002; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005; Amado et al., 2006; BINELLI et al., 2006; NIGRO et al., 2006; ZANETTE et al., 2006). Estes animais destacam-se por serem organismos sésseis, intertidais, cosmopolitas, abundantes, resistentes às variações ambientais, geralmente eurihalinos com

ampla distribuição ao longo da costa e estuários em diferentes latitudes. Como são organismos filtradores, podem acumular em seus tecidos uma grande variedade de compostos químicos (*p.ex.* Pesticidas, metais pesados, hidrocarbonetos) presentes na água do mar (VIARENGO et al, 1991; NOAA, 1995).

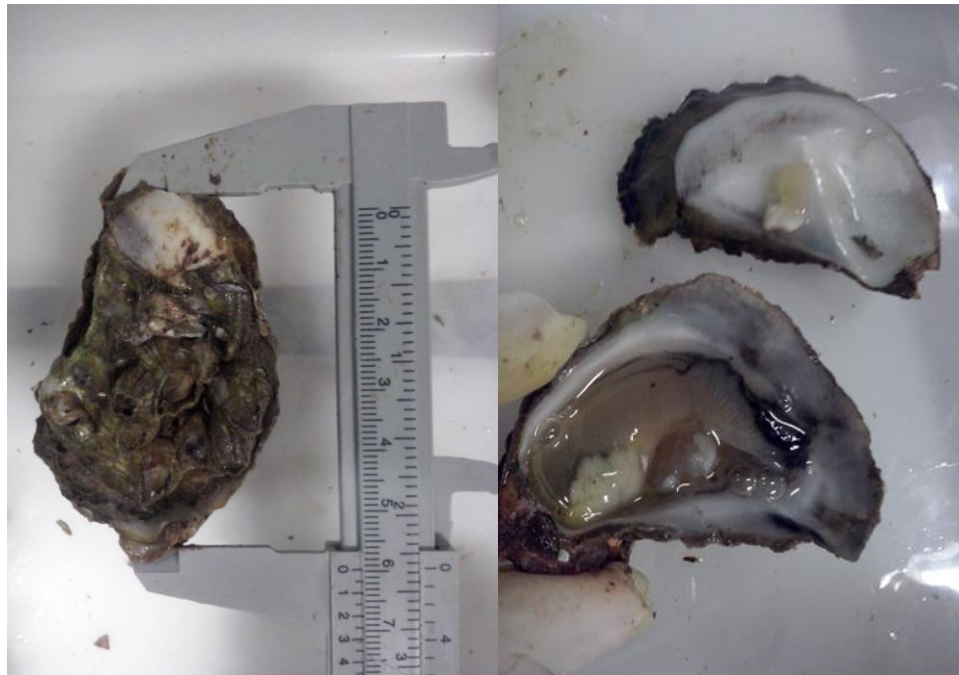
No caso da contaminação em regiões estuarinas e manguezais no Brasil, alguns autores têm utilizado a ostra-do-mangue como organismo sentinela (REBELO; AMARAL; PFEIFFER, 2003; SILVA et al., 2001; WALLNER-KERSANACH et al., 2000), pois ele dá respostas bioquímicas que podem ser utilizadas em vários programas de monitoramento para caracterizar poluição antropogênica (BURGEOT et al, 1996).

As espécies sentinelas produzem substâncias conhecidas como biomarcadores que conseguem unir as abordagens química e biológica no monitoramento ambiental. Eles também permitem caracterizar quimicamente os poluentes e determinar suas concentrações no meio, podendo estimar o impacto causado pelos poluentes ao seu metabolismo (WATSON e MUTTI, 2003).

Desta forma a análise dos efeitos biológicos dos poluentes que contaminam o ambiente estuarino pode ser realizada a partir do estudo de biomarcadores bioquímicos, como as enzimas, que apresentam um alto grau de especificidade e rapidez na resposta as alterações da substância alvo (VIEIRA et al., 2004). O Conselho Internacional para a Exploração do Mar (ICES) tem recomendado que os programas de biomonitoramento marinho utilizem biomarcadores como metodologia complementar que possa expressar os efeitos tóxicos causados pelos poluentes nos organismos (BURGEOT et al.,1996).

Moluscos são excelentes modelos experimentais em estudos toxicológicos. Estes organismos são especialmente indicados para estudos de genotoxicidade por duas razões. Em primeiro lugar, as suas células componentes são muito sensíveis a agentes genotóxicos, mesmo em baixas concentrações; em segundo lugar, eles são uma fonte importante de proteína e outros nutrientes na dieta humana. É por meio dessa dieta que as substâncias tóxicas atingem os seres humanos, sendo moluscos reconhecidos como um importante veículo de contaminação (AL-SABTI,1995).

Figura 7. Ostra do mangue *Crassostrea* sp.



Fonte: Kelma Souza.

Organismos sentinelas também conhecido como Bioindicadores são espécies de organismos vivos cujas características favorecem sua utilização na avaliação da saúde de um determinado ecossistema. Alguns fatores devem ser considerados na escolha de espécies bioindicadoras em estudos de biomonitoramento: (1) a espécie deve ser representativa da área de estudo; (2) deve possuir hábito preferencialmente sedentário ou de baixa mobilidade, constituindo assim populações fixas a fim de que sua exposição aos contaminantes possa refletir as condições da região em estudo (RADTKE, 1979); (3) os organismos bioindicadores devem ser de fácil identificação e coleta em todas as estações do ano; (4) o tamanho do animal é um fator importante, pois deve possibilitar a obtenção de material biológico suficiente para garantir a realização das análises propostas no estudo (STEWART E MALLEY, 1997); e (5) o nível trófico da espécie a ser utilizada também deve ser avaliado, pois espécies que ocupam níveis tróficos superiores geralmente são mais representativas, uma vez que podem fornecer informações relacionadas aos fenômenos de bioacumulação e biomagnificação (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2000).

A utilização de espécies de invertebrados no estudo de biomonitoramento ambiental gera resultados que possibilitam uma análise das condições de impacto do ambiente. Desta forma o uso de um número variado de biomarcadores como avaliações moleculares, bioquímicas, genéticas, imunológicas e morfológicas torna o estudo mais representativo. No

entanto, dependendo do biomarcador selecionado, os protocolos para estes parâmetros diferem, podendo ser específicos para grandes grupos taxonômicos ou mesmo para famílias, gêneros e espécies, fazendo-se necessária uma padronização prévia dos protocolos antes do início das amostragens definitivas.

2.4 Biomonitoramento

Nos últimos anos, o nível de contaminantes aumentou de forma alarmante nos ecossistemas aquáticos como resultado das atividades antropogênicas e desta forma a biota aquática se tornou uma ferramenta importante para a detecção do grau de impacto, uma vez que este meio está constantemente exposto a um grande número de substâncias tóxicas oriundas de diversas fontes de emissão (GRUPTA et al., 2014). Estes organismos são fontes de biomoléculas biologicamente ativas que são úteis na determinação desses contaminantes.

O biomonitoramento ambiental é uma das ações que vêm sendo realizada na tentativa de medir mudanças nos sistemas aquáticos, provocadas pela ação antropogênica, e pode ser efetuado de forma contínua e variável em um determinado período de tempo por meio da utilização de organismos biológicos vivos (SILVA et al., 2003). Consequentemente, essa ação também pode fornecer informações valiosas para recuperação ambiental.

O monitoramento ambiental, quando utilizado apenas para determinar os níveis de contaminação da água, é considerado insuficiente para classificar a qualidade do ecossistema aquático. Sendo assim, para se estudar o destino dos elementos químicos tóxicos (biodisponibilidade, bioacumulação e biotransformação) no ambiente aquático, é importante fazer o biomonitoramento por meio de medições de doses internas na biota (VAN DER OOST et al., 1996). Com esta finalidade, diferentes estratégias científicas têm sido desenvolvidas para se detectar e prevenir o impacto dos poluentes nos ecossistemas aquáticos (SILVA et al., 2003).

Programas de biomonitoramento vêm sendo utilizados em diversos países como uma estratégia para prevenir e avaliar impactos causados pelo lançamento de contaminantes no ambiente. Estes estudos têm sido realizados através da utilização de organismos sentinelas coletados no próprio local de análise, ou mesmo, através de animais transplantados de locais referência (controle) para ambientes contaminados. O programa *Mussel Watch* realizado nos Estados Unidos e o Programa para Avaliação e Controle da Poluição na Região do Mediterrâneo (MED-POL), propõem a utilização de moluscos bivalves como organismos sentinelas (BURGEOT et al., 1996; CAJARAVILLE, et al., 2000).

Uma das formas de avaliar o impacto de contaminantes sobre um ambiente é através da análise da resposta bioquímica (biomarcadores) que os organismos residentes manifestam decorrentes da exposição aos xenobióticos (NARBONNE *et al.*, 1999). O Conselho Internacional para a Exploração do Mar (ICES, 2003) tem recomendado que programas de biomonitoramento incorporem a realização de análises de biomarcadores bioquímicos e incentivado o estudo sobre novos biomarcadores.

2.5 Biomarcadores de contaminação aquática

Para que o monitoramento biológico seja efetivo são necessários estudos com marcadores biológicos (ou biomarcadores) relevantes. O biomarcador pode ser definido como sistemas indicadores que geralmente incluem subsistemas de um organismo completo, usados para identificar um alvo específico (SILVA *et al.*, 2003). Pode também ser definido como uma alteração biológica (variando desde respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas, até respostas no nível molecular) a qual pode estar relacionada à exposição ou ao efeito tóxico de produtos químicos xenobióticos presentes no ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Entre os biomarcadores, os bioquímicos ou moleculares, detectam a primeira alteração biológica frente à presença de um xenobiótico (WALKER, 1998). Essas alterações moleculares podem nos fornecer informações antecipadas dos efeitos destas substâncias sobre os organismos.

As substâncias conhecidas como biomarcadoras conseguem unir as abordagens química e biológica do monitoramento ambiental, pois são compostos de origem animal ou vegetal que, além de permitirem caracterizar quimicamente os poluentes e determinar suas concentrações, também podem estimar o impacto causado por esses poluentes aos organismos que fornecem as substâncias em questão (WATSON e MUTTI, 2003). Dentre essas substâncias, as enzimas representam papel importante, pelo alto grau de especificidade e rapidez na resposta às alterações pertinentes as substâncias-alvo.

Os biomarcadores podem ser usados para diagnosticar os efeitos dos agentes tóxicos sobre os organismos e para obter respostas iniciais de advertência a riscos ambientais (SCHLENK *et al.*, 2008b). As respostas dos organismos a perturbações ambientais variam com o tempo e a intensidade da exposição ao contaminante (VAN DER OOST *et al.*, 2003) e com o estágio de desenvolvimento ontogenético do animal (WALKER *et al.*, 1992).

Entre os biomarcadores mais utilizados e recomendados estão as enzimas de defesa antioxidante e de conjugação de xenobióticos, pois estas fornecem informações importantes a

respeito da capacidade de defesa dos organismos, bem como da capacidade de biotransformação dos compostos tóxicos (BURGEOT et al., 1996).

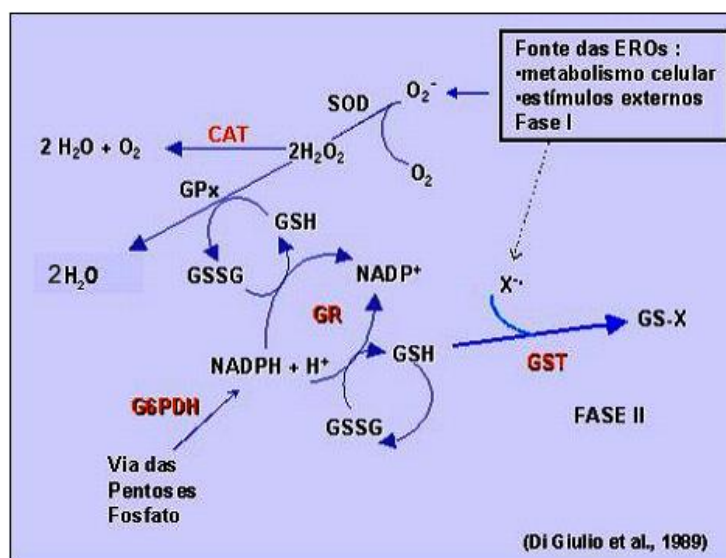
Defesas antioxidantes incluem tanto enzimática (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) e as não-enzimáticas (por exemplo, glutathione reduzida, ácido ascórbico, ácido úrico, a vitamina E e caroteno β) (STOREY, 1996). Deste modo, a medição de um único antioxidante não é suficiente para definir uma defesa antioxidante completa, sob condições experimentais ou naturais.

As EROs podem ser inativadas pelos sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos celulares, representados pela superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (SIES, 1993). Caso estas enzimas estejam com baixa atividade, pode ser estabelecido um desequilíbrio próoxidante celular, denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo está associado a vários processos mutagênicos e carcinogênicos e pode comprometer o metabolismo dos organismos aquáticos (SIES *et al.*, 1992), podendo ainda provocar uma diminuição no seu crescimento ou mesmo a sua morte.

Segundo Valavanidis et al. (2006), o interesse de se fazer uma avaliação sobre estresse oxidativo em estudos ecotoxicológicos deve-se ao fato de que vários poluentes ambientais induzem um desbalanço entre as ERO (espécies reativas de oxigênio) endógenas e exógenas, por meio de diferentes mecanismos bioquímicos (*pex.* reações redox), levando a uma diminuição das defesas antioxidantes de um organismo. Segundo Klaunig et al. (1997), os agentes tóxicos podem causar estresse oxidativo celular, por meio de metabolização direta de radicais intermediários primários ou pela ativação de fontes endógenas das ERO, que levam a danos tissulares, inflamações, doenças degenerativas e envelhecimento.

Os produtos formados na biotransformação de xenobióticos podem ser convertidos a dihidrodíóis e/ou conjugados através de reações de conjugação catalisadas por diferentes tipos de enzimas, com a finalidade de promover um aumento na hidrossolubilidade destes compostos, facilitando sua excreção (LIVINGSTONE, 1985). Entre as enzimas de conjugação, destaca-se a glutathione S-transferase (GST), que catalisa a conjugação do tripeptídeo glutathione reduzida (GSH) com os metabólitos da Fase I. Portanto, para que não haja um comprometimento deste mecanismo de detoxificação, é necessária a manutenção de níveis normais de GSH intracelular. Algumas enzimas participam da síntese de glutathione, enquanto outras auxiliam na reciclagem de glutathione oxidada, produzida fisiologicamente durante o metabolismo (TIMBRELL, 1991) (Figura 8).

Figura 8. Esquema mostrando o processo simplificado de biotransformação, conjugação de xenobióticos e mecanismos de defesa antioxidante enzimático.



Durante o processo de biotransformação pode ocorrer um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil (·OH) como sub-produto do ciclo catalítico do sistema citocromo P450. Estas EROs podem reagir com as biomoléculas desencadeando processos como a lipoperoxidação, oxidação de bases de DNA, inativação de enzimas e degradação de proteínas, podendo levar a morte celular (TIMBRELL, 1991). A extensão do dano causado por estes compostos depende da eficiência dos sistemas de defesa antioxidante e de conjugação dos xenobióticos (WINSTON; LIVINGSTONE; LIPS, 1990).

Quando a poluição provoca um desequilíbrio do estado redox da célula, danos em biomoléculas, tais como DNA, lípidos e proteínas, e processos mutagênicos e carcinogênicos podem ocorrer (SIES; STAHL, 1992). Aumento de peróxido lipídico (LPO) é um dos principais contribuintes para a perda da função de células em situações de stress oxidativo (HERMES-LIMA et al., 1995). Deste modo, a determinação LPO tem sido utilizado para denotar uma situação de stress oxidativo em invertebrados (MONTSERRAT et al., 2003).

O sistema de defesa antioxidante enzimático pode prevenir a formação das EROs, através da sua degradação. A superóxido dismutase (SOD) dismuta o O₂⁻ em H₂O₂, que pode ser decomposto em água e oxigênio pela catalase (CAT) ou pela glutathione peroxidase (GPx) (SIES, 1993). Nos últimos anos, vários métodos para medir toda a capacidade antioxidante de um organismo têm sido desenvolvidos.

Caso estas enzimas estejam com baixa atividade, pode ser estabelecido um desequilíbrio pró-oxidante celular denominado estresse oxidativo. Estas alterações podem ser quantificadas estimando-se valores de parâmetros bioquímicos, como a atividade enzimática, sendo que suas alterações podem ser utilizadas para avaliar o estado fisiológico dos animais (VIARENGO; CANESI, 1991).

Diversos trabalhos têm demonstrado uma relação entre a exposição de contaminantes e a atividade de enzimas biomarcadoras. Estudo realizado por Gowland et al. (2002) mostraram que a atividade da GST na glândula digestiva de mexilhões está relacionada à presença de hidrocarbonetos aromáticos de elevado peso molecular. Pandey et al. (2003) observaram um aumento na atividade das enzimas GR, GPx, SOD, G6PDH, GSH e peroxidação lipídica em peixes da espécie *Wallago attu*, provenientes de um local com elevada atividade industrial e lançamento de pesticidas. Cancio et al. (1997) demonstraram que óleos lubrificantes ativaram a atividade da CAT em *Mytilus galloprovincialis*.

Outro biomarcador muito utilizado em vertebrados, assim como em invertebrados, é a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina que é liberado nas sinapses nervosas ou na junção neuromuscular. Sua inibição pode resultar em uma transmissão contínua e desordenada de impulsos nervosos (STEGEMAN et al., 1992).

Sabe-se que esta enzima pode ser inibida na presença de pesticidas organofosforados e carbamatos, mas também já foi descrita a sua inibição na presença de hidrocarbonetos aromáticos (PAYNE et al., 1996). Estudo comparativo entre o mexilhão *Perna perna* e a ostra *Crassostrea sp.* demonstrou uma maior sensibilidade em relação à inibição da AChE da ostra quando exposta ao carbamato Furadan (ALVES et al., 2002).

Biomarcadores genotóxicos são empregados para avaliar os efeitos de contaminantes sobre os organismos expostos, sobretudo aqueles potencialmente indutores de danos celulares (FRENZILLI et al., 2009).

2.5.1 Biomarcadores enzimáticos

Estudos recentes demonstram grande interesse por biomarcadores enzimáticos como alternativa de uso no monitoramento de ambientes impactados (NIGAN et al., 2012; SILVA et al., 2013; GHAZALA et al., 2014, WANG et al., 2015). A utilização da atividade enzimática como biomarcador deve-se ao fato dos compostos tóxicos, que apresentam uma meia-vida relativamente longa, possuírem alta afinidade por pares de

elétrons encontrados nos aminoácidos que formam as enzimas, como o grupamento sulfidril - SH (IVANINA et al. 2008).

O uso de enzimas como biomarcadores baseia-se na interferência negativa (inibitória) ou indutora, causada pelas substâncias química, em sua atividade catalítica (ASSIS et al., 2011). Dentre as principais enzimas utilizadas extensivamente para esta finalidade destacam-se as enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, tais como as enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante, catalase, glutathione redutase e superóxido dismutase, e as enzimas moduladoras tais como as colinesterases (COGO et al., 2009 ; EL-BASSYOUNI, et al., 2012; ASSIS et al. 2014).

Um bom exemplo da utilização de atividade enzimática como método de monitoramento pode ser observado no trabalho realizado por Benitez- Trinidad et al (2014), o qual utilizou enzimas colinesterases como biomarcadores de efeitos subletais do pesticida organofosforados em tecido branquial da espécie de ostra *C. cortiziensis*. Neste estudo foi testado o efeito de duas concentrações subletais de clorpirifós sobre a atividade da AChE das brânquias dessa espécie de molusco bivalve.

Decréscimo estatisticamente significativo nas atividades das enzimas digestivas (amilase, tripsina e pepsina) do peixe Tilápia do Nilo coletado em um riacho contaminado por efluentes doméstico e de laboratórios foi observado por Assis et al. (2014). Os autores sugerem, que essas enzimas podem apontar para o monitoramento de outras substancias poluidoras que não pesticidas e cianotoxinas.

2.5.1.2 Colinesterase (ChEs)

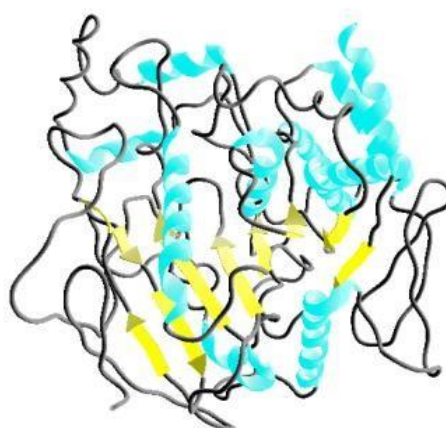
As colinesterases (ChEs; EC 3.1.1.x) são enzimas do grupo da superfamília das α/β hidrolases (NARDINI; DIJKSTRA, 1999). As α/β hidrolases têm uma habilidade de fornecer um arcabouço estável de sítios ativos de uma ampla variedade de enzimas, sendo que a tríade catalítica, altamente conservada, é formada por um nucleófilo composto por resíduos de serina, cisteína ou ácido aspártico, um resíduo ácido e um resíduo de histidina (NARDINI; DIJKSTRA, 1999). São aceitos, na literatura, dois tipos de ChEs: 1) a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), que tem como principal e clássica função, a modulação da transmissão dos impulsos nervosos responsáveis pela comunicação neuronal, mediante a desativação do neurotransmissor acetilcolina, e a 2) butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8), de função não totalmente elucidada, apontada principalmente como uma enzima detoxificadora e

eventual substituta da AChE (ASSIS et al., 2014). Ambas são inibidas por pesticidas das classes dos organofosforados e carbamatos e alguns metais pesados.

2.5.1.3 Acetilcolinesterase

A AChE ou acetil-hidrolase (Figura 9), é uma enzima regulatória responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos. Está presente nos sistemas nervosos central e periférico, promovendo a hidrólise da ACh nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas. É a enzima mais eficiente em hidrolisar ésteres de colina e sua eficiência catalítica bem como sua alta reatividade com vários inibidores covalentes e não covalentes são determinadas pela arquitetura funcional única do seu sítio ativo (MATOS, 2012).

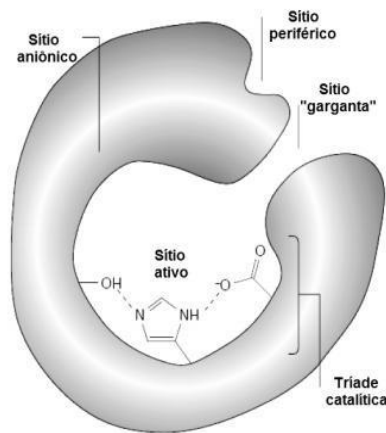
Figura 9. Estrutura tridimensional da HsAChE obtida do PDB (Código: 3LII)



Fonte: PDB (Código: 3LII)

Cada monômero da AChE contém um centro catalítico composto por dois compartimentos: o subsítio catalítico contendo a tríade catalítica e o subsítio aniônico que acomoda o compartimento quaternário positivo de ACh (GONÇALVES, 2009). Nessas regiões há quatro domínios (Figura 10): no primeiro encontram-se os resíduos de histidina e serina da tríade catalítica (Ser203, His447, e Glu334), a qual é encontrada no fundo da “garganta” do sítio ativo; o segundo é o próprio subsítio aniônico, carregado negativamente, onde o grupo amônio quaternário da ACh interage, eletrostaticamente; o terceiro domínio é constituído por uma região hidrofóbica importante para a ligação com substratos cíclicos; e o quarto domínio, denominado sítio aniônico periférico no qual interagem ligantes catiônicos e alguns outros ligantes neutros (GONÇALVES, 2009).

Figura 10. Sítio ativo da AChE.



Fonte: OBREGON, 2001.

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, tais como íons metálicos e pesticidas.

2.5.2 Catalase (Cat)

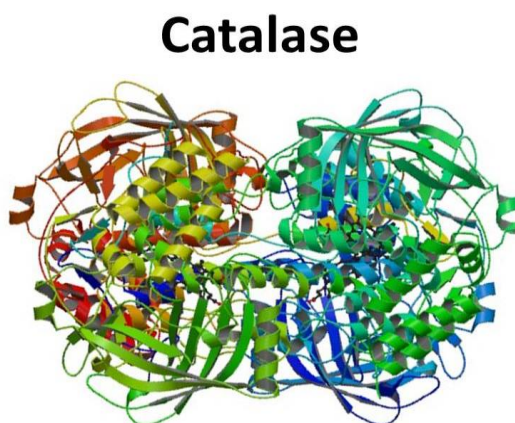
A CAT, formalmente denominada de hidropoxidase, é encontrada nos peroxissomas, nos glioxissomas de plantas e no citoplasma de procariontes (Figura 11). Esta enzima tem como função decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular (VALKO et al., 2006).

As catalases compõem uma família de hemoproteínas (GAO et al., 2003), enzimas tetraméricas intracelulares, com quatro grupos heme, onde o átomo de ferro está no estado férrico (KIRKMAN; GAETANI, 1984). Esta enzima é envolvida na dismutação do peróxido de hidrogênio e na detoxificação de alguns substratos, como fenol, alcoóis, ácido fórmico e formaldeído. Um dos papéis antioxidantes das CAT é reduzir o risco de formação da radical hidroxila ($HO^\bullet$), capaz de causar danos importantes aos sistemas biológicos (BETTERIDGE, 2000), a partir do H_2O_2 , ou por reação com ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Esta redução é importante, tendo em vista que as membranas biológicas são extremamente permeáveis à espécie reativa H_2O_2 (PAMPLONA, 2009).

Entre as enzimas degradantes de H_2O_2 , a CAT tem sido considerada a mais eficiente, em termos energéticos, pois degrada os peróxidos de hidrogênio que são gerados rapidamente e, ainda, promovem um ganho de energia celular. A concentração da CAT, em mamíferos, pode variar de acordo com o tipo celular e a concentração de peróxido de hidrogênio (SCANDALIOS et al., 2005).

Muitos estudos têm utilizado a enzima CAT como um biomarcador de estresse oxidativo induzido por contaminantes ambientais, para avaliar os possíveis danos oxidativos causados por inseticidas organofosforados (ALMEIDA et al., 2010; SHAD; IQBAL, 2010) e herbicidas (NWANI et al., 2010), e também para avaliar amostras de água impactadas por efluentes urbanos e industriais (TABREZ; AHMAD, 2011; TSANGARIS et al., 2011). Quando ocorre a diminuição da CAT, conseqüentemente, há uma redução da capacidade de proteção celular contra os radicais livres (McFARLAND et al., 1999).

Figura 11. Estrutura tridimensional da Catalase (EC 1.11.1.6)



©Protein Data Bank Japan

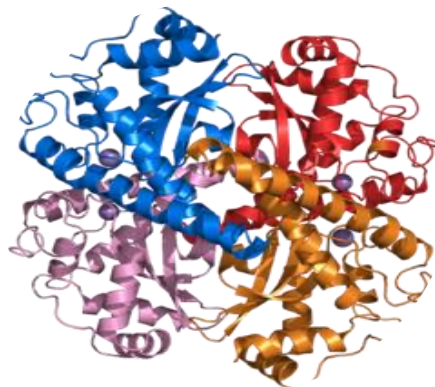
Fonte: © Protein Data Bank Japan

2.5.3 Superóxido desmutase (SOD)

A SOD (superóxido dismutase) é uma das enzimas antioxidantes intracelulares mais eficientes (Figura 12), pois catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ para O_2 e H_2O_2 (MCCORD; FRIDOVICH, 1969), protegendo o Citocromo C, ao reduzir o radical superóxido e diminuir a presença dos radicais livres. A SOD é caracterizada por apresentar um metal na sua estrutura, e é encontrada nos compartimentos subcelulares que são alvos do estresse oxidativo mediado por ERO, em todos os organismos aeróbicos (GILL; TUJETA, 2010).

Existem várias isoformas de SOD que apresentam características distintas, de acordo com o centro ativo metálico, a constituição de aminoácidos, o número de subunidades e co-fatores (VALKO et al., 2006). Todas as formas de SOD são codificadas no núcleo e específicas para seus respectivos compartimentos subcelulares (GILL; TUTTEJA, 2010). Segundo ALSCHER et al. (2002), a classificação das SODs pode ser determinada pelo seu co-fator metálico, onde os mais conhecidos são: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e o ferro (Fe-SOD). Outra SOD que tem sido descrita na literatura é a que apresenta o níquel como centro ativo (NiSOD) (SCANDALIOS, 2005).

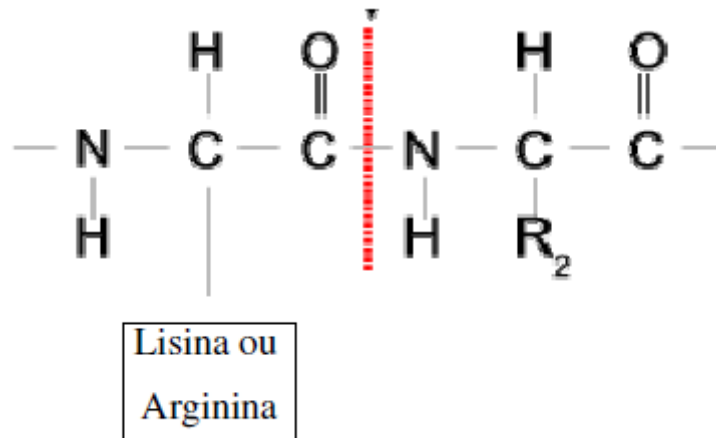
Figura 12. Estrutura tridimensional da Superoxido dismutase (EC 1.15.1.1)



2.5.4 Tripsina

As proteases são enzimas que catalisam, *in vivo*, a hidrólise das ligações peptídicas entre os aminoácidos que constituem uma proteína. De acordo com a IUBMB, as proteases estão inseridas no subgrupo 4 do grupo 3 (Hidrolases), pois clivam a proteína adicionando uma molécula de água à ligação peptídica (BERG et al., 2004).

Figura 13. Sítio de hidrólise específico para tripsina.

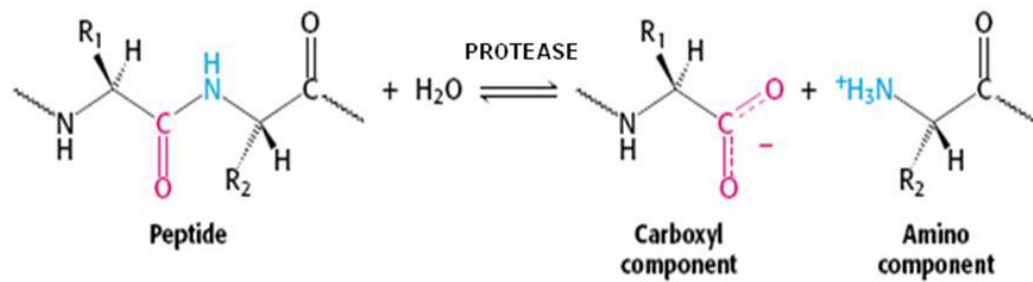


A tripsina é um membro da família das serino proteases, as quais são caracterizadas por um mecanismo catalítico comum, envolvendo a presença de uma tríade catalítica composta de resíduos específicos: serina, histidina e ácido aspártico (KLEIN *et al.*, 1996). Esta enzima cliva as ligações peptídicas no lado carboxila de resíduos de aminoácidos carregados positivamente como arginina e lisina (Figura 13) (KOMKLAO *et al.*, 2007), sendo importantes em muitos processos biológicos como: digestão protéica propriamente dita, ativação de zimogênios e mediação entre a ingestão do alimento e a assimilação dos nutrientes (SAINZ *et al.*, 2004). Vale também destacar a ampla aplicabilidade industrial de tripsinas (KLEIN *et al.*, 1996). Tais fatos têm feito destas enzimas as mais estudadas em organismos aquáticos.

Alguns autores estimam que sua contribuição para a digestão protéica está em torno de 60% (SÁNCHEZ-PAZ *et al.*, 2003).

Dentre os substratos sintéticos hidrolisados pela tripsina e usados em pesquisas científicas destacam-se: N- α -benzoil-L-arginina-p-nitoanilida (BAPNA) e tosil-arginina-metil-éster (TAME) (SIMPSON, 2000). As enzimas proteolíticas são essenciais para a sobrevivência dos seres vivos, atuando na ativação de zimogênios, digestão de proteínas provenientes da dieta e do próprio organismo, coagulação sanguínea, etc. As proteases são subdivididas em dois grandes grupos, as exoproteases que clivam ligações peptídicas próximas às extremidades amino e carboxiterminais do substrato e as endoproteases que clivam as ligações peptídicas internas das cadeias polipeptídicas do substrato (Figura 14) (RAO *et al.*, 1998).

Figura 14. Hidrólise enzimática de uma proteína hipotética



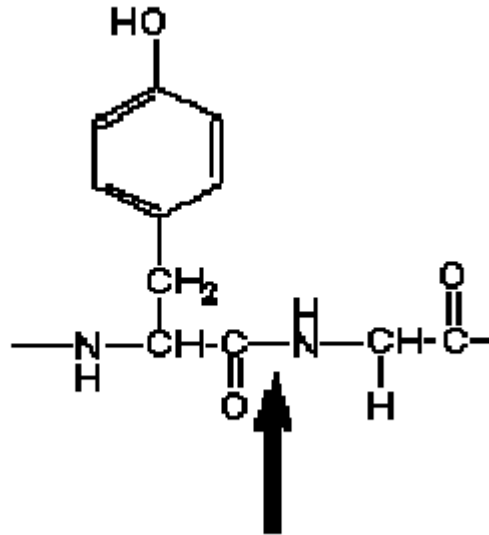
Fonte: BERG et al., 2004.

As enzimas proteolíticas são essenciais para a sobrevivência dos seres vivos, atuando na ativação de zimogênios, digestão de proteínas provenientes da dieta e do próprio organismo, coagulação sanguínea, etc. As proteases são subdivididas em dois grandes grupos, as exoproteases que clivam ligações peptídicas próximas às extremidades amino e carboxiterminais do substrato e as endoproteases que clivam as ligações peptídicas internas das cadeias polipeptídicas do substrato (RAO et al, 1998).

2.5.5 Quimotripsina

A quimotripsina é considerada a segunda enzima mais abundante no sistema digestório de organismos aquáticos (KOMKLAO et al., 2007). Esta enzima catalisa a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas na porção carboxila de aminoácidos aromáticos como: fenilalanina, tirosina e triptofano e também substratos sintéticos, tais como Succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-*p*-nitroanilida - SAPNA (Figura 15) (CASTILLO-YAÑEZ et al., 2006).

Figura 15. Sítio de hidrólise específico para quimotripsina.

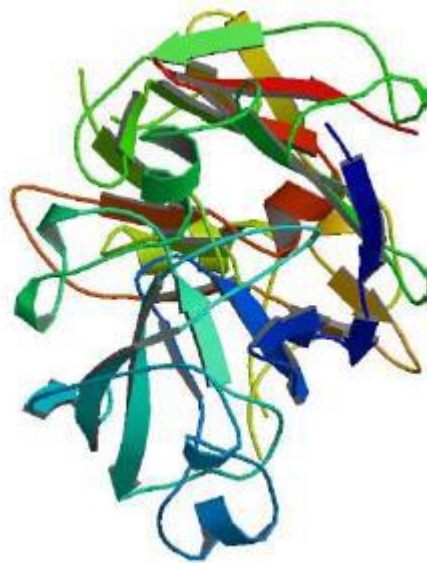


2.5.6 Pepsina

A pepsina (EC, 3.4.23.1), incluída na categoria das endopeptidases, é a principal enzima digestiva estomacal de organismos aquáticos (Figura 16). Pertencente à família das aspartatoproteases, possui especificidade preferencial por aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, tirosina e triptofano. Esta enzima apresenta peso molecular em torno de 35 kDa, sendo de grande importância para a hidrólise das ligações peptídicas decorrente da degradação de proteínas sob condições ácidas (SIMPSON, 2000).

Pepsinas podem ser encontradas principalmente no suco gástrico do lúmen estomacal e podem ser isoladas a partir de uma variedade de espécies animais. Há vários tipos de pepsinas estomacais ou isoformas, com estrutura proteica e propriedades enzimáticas distintas (SHAHIDI, 2001). Zimogênios de aspartatoproteases como pepsinogênios, também são secretados pelas glândulas da mucosa gástrica de vertebrados e invertebrados. Trata-se de uma forma antecedente inativa da enzima, a qual se torna funcional através da ação de cinases apropriadas ou outros ativadores (EFFRONT, 2007).

Figura 16. Estrutura tridimensional da pepsina do bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*)



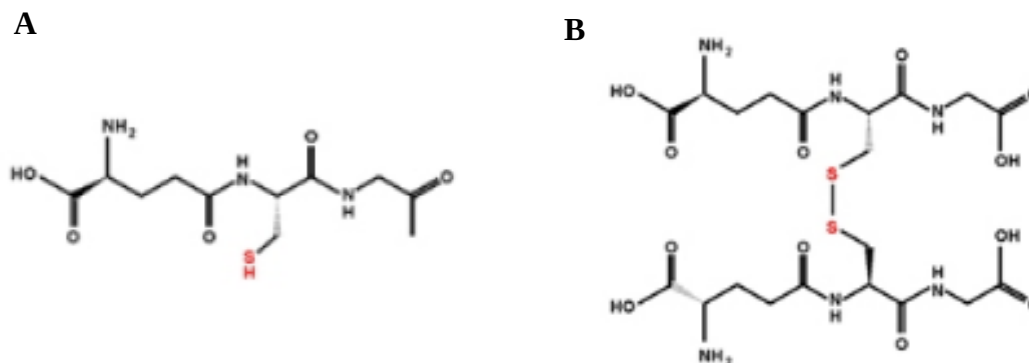
Fonte: (KARLSEN, 1998).

2.6 Glutationas - Biomarcador não enzimático

A Glutationa é um composto tripeptídeo, encontrado tanto em organismos eucariotos como em procariotos (GHANTA; CHATTOPADHYAY, 2011). Segundo COGO et al. (2009), a estrutura da glutathione é formada por um radical sulfidril e pode apresentar duas formas: reduzida de tiol (Glutathione - GSH) e oxidada (Glutathione dissulfeto - GSSG) (Figura 17). A glutathione atua em diversas funções vitais, como na redução do estresse oxidativo, na desintoxicação do peróxido de hidrogênio, do hidroperóxido lipídico e de compostos eletrofílicos, na eliminação de radicais livres, na atuação como co-fator enzimático (GPx, GST, entre outros) e como redutores de hidroperóxido orgânicos e inorgânicos, modulação de funções celulares críticas (síntese de DNA, processos associados aos microtúbulos e funções imunológicas), e fornecimento de um reservatório para cisteína (MASELLA et al., 2005).

Nos tecidos saudáveis cerca de 90% da glutathione existente encontra-se na forma reduzida (HENRY OKIGAMI, 2009).

Figura 17. A - Fórmula estrutural da GSH, B - GSSG respectivamente.



Adaptado de Kronos Science Laboratory – Glutathione. Disponível em <http://www.kronoslaboratory.com>.

2.6.1 Glutathiona reduzida (GSH)

A GSH é um composto tiol, que possui uma ligação de três aminoácidos (cisteína, ácido glutâmico e glicina), que desempenha a função de proteger as células e os tecidos contra os efeitos oxidativos. A estrutura da GSH é caracterizada pela presença de uma ligação α -glutamil e um grupo sulfidril - SH (IWASAKI et al., 2009) (Figura 17). A glutathiona na forma reduzida é o tiol não proteico mais prevalente nas células animais. A síntese de GSH associada com a redução de GSSG, promove a manutenção do estado redox intracelular, funcionando este tripeptídeo como co-factor para enzimas citoplasmáticas e indutor de certas modificações translacionais em diversas proteínas (TAPIERO, 2003). É uma molécula a que se pode chamar de “natural”, estando presente em células animais, vegetais, em cianobactérias e protobactérias (AYER, 2010).

Em condições fisiológicas, a GSH é encontrada no núcleo, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (MASELLA et al., 2005). Em eucariontes, a GSH está envolvida na desintoxicação de ERO e de contaminantes químicos, no qual desempenha um papel importante na proliferação e morte celular e, também, em diversos processos que envolvem o DNA e proteínas (GHANTA; CHATTOPADHYAY, 2011).

Segundo Grosicka-Maciag et al. (2010), a GSH é capaz de reduzir, de maneira direta, a quantidade de ERO dentro da célula, por reações não-enzimáticas, ou por meio de vias indiretas, pelas reações enzimáticas. Porém, se ocorrer um distúrbio na quantidade de GSH e um aumento nos níveis de oxidante, há o surgimento de estresse oxidativo, que leva a toxicidade e morte celular.

Outra funcionalidade de extrema relevância da glutathiona é o fato de participar como agente crucial na detoxificação do organismo face a tóxicos orgânicos e inorgânicos (ANDERSON, 1998). Atua na desintoxicação de uma multiplicidade de xenobióticos que vão se associar ao tripeptídeo e serem excretados. Assim, muitos produtos resultantes da presença de metais pesados, metabolitos e xenobióticos, são eliminados por esta via (ALMEIDA, 2001).

Diversos estudos ambientais vêm sendo desenvolvidos pela quantificação da GSH total, após a exposição de contaminantes como HPA (LIN; YANG, 2007), metais (GARCÍA-FERNANDEZ et al., 2002), fármacos (GROSICKA-MARCING et al., 2010), contaminantes industriais (FARMEN et al., 2010; ZANG et al., 2009), agrotóxicos (MARAN et al., 2010; MUNIZ et al., 2008) e nanopartículas (SAQUIB et al., 2011).

A glutathiona nas células está presente maioritariamente na sua forma reduzida, que é a sua forma biologicamente activa. Em condições de stress oxidativo, a GSH converte-se em GSSG, o que leva a uma diminuição da razão GSH/GSSG. O par redox GSH/GSSG poderá ser um importante indicador do estado redox celular (BALLATORI, 2009) e, alterações neste par redox demonstram estar relacionadas com a proliferação celular, diferenciação e/ou apoptose (Park, 2010). Como tal, a glutathiona desempenha assim um papel crucial na manutenção de um equilíbrio normal entre espécies oxidantes e antioxidantes, regulando muitas das funções vitais da célula, tais como síntese e reparação de DNA, síntese de proteínas e ativação e regulação de enzimas (TAPIERO, 2003).

Neste contexto, é importante a manutenção de um equilíbrio intracelular do estado redox. A GSH sendo o tiol não proteico dominante no organismo, surge como fator essencial na manutenção do potencial redox celular através das suas ações como antioxidante e modulador do equilíbrio sulfidrilo-dissulfureto proteico, tal como representado na seguinte reação (LU, 2009):



Como esta reação é reversível, o equilíbrio é determinado pelo estado redox celular, o que vai sempre depender das concentrações existentes de GSH e GSSG (BALLATORI, 2008). Sendo assim, estabelecendo-se um equilíbrio redox na célula, esta apresentará maior resistência a danos oxidativos.

2.7 Biomarcadores de genotoxicidade

Muitos biomarcadores de genotoxicidade foram aplicados em bivalves (DIXON et al, 2002). Entre os testes de genotoxicidade disponíveis, Ensaio Cometa (CA) e teste de micronúcleos (MN) são reconhecidos devido à sua robustez, sensibilidade e poder estatístico para avaliar quebras de DNA, o que pode ser considerado marcas de mutagenicidade (V. HEUSE et al, 2008). Além disso, atualmente estudos apontam que a associação dos dois ensaios é a melhor opção de testes para avaliar o potencial mutagênico, pois ambos os ensaios são muito sensíveis, simples e permitem detectar quebras em níveis cromáticas e cromossômicas, respectivamente (OECD, 2014).

2.7.1 Teste de Micronúcleo (MN)

O teste de MN, como um marcador de dano genético acumulado durante a vida da célula, é um dos biomarcadores de genotoxicidade mais vulgarmente aplicados em animais aquáticos (BOLOGNESI e FENECH, 2012). Entre estes marcadores, o ensaio de micronúcleo quantifica a frequência de células micronucleadas principais (MNs) e tem sido utilizado como um biomarcador para a detecção de alterações genéticas subletal (BURGEOT et al 1995; ADAM et al 2010; POLARD et al 2011.) de exposição a substâncias genotóxicas, aneugênica, e / ou clastogênicos mutagênico (Countryman e Heddle 1976). Esse ensaio é também um potente biomarcador de danos genéticos em animais e é amplamente utilizada em invertebrados (SCARPATO et al 1990; WRISBERG et al., 1992).

Micronúcleos (MN) são pequenas massas de cromatina intracitoplasmáticas com aparência de um pequeno núcleo, resultante de quebras cromossômicas ou da condensação de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que atrasaram a sua migração para os pólos na anáfase. Portanto, são porções cromossômicas ou cromossomos inteiros que não foram incorporadas ao núcleo principal da célula-filha, durante a divisão celular (BOLOGNESI e FENECH, 2012), devido à ausência de centrômero, danos no aparelho mitótico ou por defeito na citocinese (BOLOGNESI et al., 2006; ERGENE et al., 2007), como consequência de dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos. São considerados MN clássicos as estruturas circulares de mesma refração que o núcleo, não ligadas a este e com um tamanho correspondente de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Um aumento na frequência de micronúcleos é o resultado de

danos genômicos e cromossômico causado por substância e que interagem com o fuso mitótico ou clastogênicas (BOLOGNESI e FENECH, 2012).

O teste de MN tem sido aplicado em diferentes espécies de bivalves, tanto em condições de campo e laboratório: hemócitos e células de brânquias são os alvos mais frequentemente considerados (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Aplicação do ensaio MN no campo revelou os efeitos da exposição a diferentes classes de poluentes (por exemplo, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, metais pesados, compostos organoclorados e organofosforados), mostrando bom poder de discriminação e permitindo a identificação de eventos de genotoxicidade ao longo de um gradiente de poluição (BOLOGNESI & HAYASHI, 2011; BENITEZ-TRINIDAD et al., 2014; DEBENEST et al., 2013) e facilitando efeitos da recuperação depois de um evento poluição acidental (BOLOGNESI et al, 2006; VIRARENGO et al, 2007; BARSIENTE et al, 2007).

Além dos MN, Carrasco et al. (1990) classificaram outras anormalidades nucleares, como núcleo lobado, núcleo vacuolado, núcleo segmentado e núcleo em forma de rim. Entretanto, os mecanismos de formação das anormalidades nucleares não são completamente conhecidos (AYLLÓN ; GARCIA-VAZQUEZ, 2001).

Micronúcleos e anormalidades nucleares têm sido utilizados com sucesso como biomarcadores e ou indicadores genotóxicos de contaminação em peixes e ostras expostos a substâncias químicas que possuem capacidade genotóxica como os PAHs (GRAVATO E SANTOS, 2002; 2003), metais pesados (BOLOGNESI et al, 1999) e poluentes orgânicos (SCARPATO et al, 1990; VENIER ET AL., 1997). Ainda, como os micronúcleos não podem ser reparados muitos autores consideram a presença de micronúcleos como sinal de mutagenicidade.

2.7.2 Ensaio Cometa (EC)

O ensaio do cometa, também conhecido como ensaio de eletroforese em gel de célula única, é uma técnica rápida e quantitativa que possibilita a visualização de danos no DNA em células eucarióticas (LIAO et al., 2009). Esse ensaio é baseado na quantificação de fragmentos de DNA que migram para fora do nucleóide da célula durante a eletroforese e permite avaliar danos que podem ser reparados (FRENZILLI et al., 2009; LIAO et al., 2009). Assim, esse método tem sido muito empregado para detectar danos no DNA na área de ecotoxicologia (FRENZILLI et al., 2009).

O ensaio cometa permite a detecção de lesões potencialmente pré-mutagénicas, tal como rupturas da cadeia de DNA, sítios alcalilabeis, aductos de DNA, alterações de bases, ligações cruzadas de DNA-DNA e DNA-proteína e reparação incompleta do DNA (SINGH ET AL, 1988; TICE, 1995. Esta técnica, que pode ser usada em qualquer tecido, tem sido aplicada com sucesso em hemócitos e eritrócitos de várias espécies de moluscos e peixes (DAVID et al, 2008; VENTURA et al, 2008; CHRISTOFOLETTI et al, 2009).

O Dano do DNA é avaliado através de um método de classificação visual em células individuais. As células danificadas, chamadas cometas, presente a um determinado padrão de migração de DNA em eletroforese, apresentando uma "cauda". A gravidade do dano ao DNA pode ser mensurada através do comprimento da cauda, que é composta de fragmentos de DNA, e classificados nas seguintes categorias: 0, 1, 2 3 e 4; zero, que representa a menor quantidade de dano

O ensaio do cometa (SCGE) é uma técnica simples, sensível e rápida para detecção de quebras primárias na fita de DNA em células individuais (SINGH et al., 1988) e tem sido proposto para estudos de toxicogenética devido às vantagens e peculiaridades do método em relação a outros testes de genotoxicidade e de reparo do DNA (SILVA et al., 2003). As vantagens do ensaio do Cometa para avaliar danos no DNA incluem: (1) mensuração de danos em células individuais; (2) o baixo número de células necessário para a realização do teste; (3) possibilidade de ser realizado em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada; (4) sensibilidade do método para detectar danos no DNA (SINGH et al., 1988; SILVA et al., 2003; Maluf & Erdtmann, 2003). O grau de dano no DNA pode ser descrito de várias maneiras, como a quantidade de DNA na cauda, o comprimento da cauda e a porcentagem de células com diferentes classes de danos (integridade do DNA) (TICE, 1995).

Rank e Jensen (2003) aplicaram o ensaio do cometa em células da hemolinfa e das branquias de *Mytilus edulis* expostos ao MMS, a peróxido de hidrogênio e a radiação UV e concluíram que os dois tecidos são igualmente sensíveis a estes agentes, porém devido a facilidade de obtenção das células da hemolinfa, este tipo celular seria mais indicado em estudos de genotoxicidade.

Siu et al (2004) afirmaram que a utilização de células da hemolinfa para ensaios de genotoxicidade é mais interessante devido, entre outros fatores, ao seu importante papel na defesa imune, na fagocitose e no transporte, excreção e detoxificação de xenobióticos. Além disso, foi sugerido que seu papel multifuncional lhes confere maior sensibilidade perante fatores externos como xenobióticos genotóxicos.

Muitas substâncias tóxicas promovem, direta ou indiretamente, quebras no DNA. O teste alcalino do cometa é capaz de estimar o aumento do nível de quebras no DNA resultantes da exposição a tais compostos tóxicos. Esse método já foi aplicado em estudos como peróxido de hidrogênio (PÉREZ-GARCÍA ET AL., 2015), com PAHs (MARIA et al., 2005; BÜCKER ET AL., 2006; AHMAD ET AL., 2008) e com fração solúvel de óleo diesel (VANZELLA ET AL., 2007).

Compostos genotóxicos alteram a estrutura química do DNA, podendo, morte celular e alterar a frequência de genes (MICHELMORE; CHIPMAN, 1998). Portanto, esses compostos podem produzir relevantes impactos ecológicos pelo insucesso reprodutivo das populações (WIRGIN ; WALDMAN, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar os efeitos de poluentes em biomarcadores bioquímicos e genotóxicos da ostra *Crassostrea sp.*, em três pontos do Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz-PE.

3.2 Específicos

- Determinar a atividade das enzimas acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, catalase , superóxido dismutase, tripsina, quimotripsina, pepsina e amilase nos tecidos branquial, visceral e músculo adutor da ostra *Crassostrea sp.* coletadas semestralmente no complexo estuarino canal de Santa Cruz;
- Determinar os níveis de peroxidação lipídica, de glutatona oxidadas, reduzidas e razão entre ambas nos tecidos branquial, visceral e músculo adutor de *Crassostrea sp.* coletadas semestralmente no complexo estuarino canal de Santa Cruz;
- Avaliar o dano genômico por macrolesões em células da hemolinfa de *Crassostrea sp.* pelo Ensaio Micronúcleo ;

- Avaliar o dano genômico por microlesões em células da hemolinfa de *Crassostrea sp.* pelo Ensaio Cometa ;
- Comparar os resultados bioquímicos e genotóxicos obtidos de *Crassostrea sp.* no estuário canal de Santa Cruz com os de população controle (espécimes depuradas) ;
- Caracterizar físico-química e cineticamente a acetilcolinesterase da espécie *Crassostrea sp.* e investigar o efeito de pesticidas e íons metálicos sobre sua atividade.
- Identificar e quantificar a microbiota bacteriana presente nas amostras das populações de *Crassostrea sp.* e na água do complexo estuarino Canal de Santa Cruz;
- Quantificar os íons metálicos Cu^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Hg^{2+} na ostra *Crassostrea sp.* e na água do complexo estuarino Canal de Santa Cruz.

CAPÍTULO 1

Parâmetros de danificação genômica da ostra *Crassostrea sp.* como ferramentas de diagnóstico de impacto ambiental estuarino



**A ser submetido ao periódico
Environmental Research
(ISSN: 0023-6438)**

Parâmetros de danificação genômica da ostra *Crassostrea sp.* como ferramentas de diagnóstico de impacto ambiental estuarino

Kelma Sirleide de Souza¹; Anderson Rodrigues Balbino de Lima²; Caio Rodrigo Dias de Assis¹, Marlyete Chagas de Araújo¹; Kaline Catiely Campos Silva¹; Julliet de Fátima Xavier³; Andreia Cybelly Marques Ferreira¹; Ranilson de Souza Bezerra¹; Monica Lúcia Adam².

¹Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

²Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (UFPE).

³Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Campus/Penedo

Corresponding author:

Monica Lúcia Adam

Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória de Santo A, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão.

Rua do Alto do Reservatório, S/N

Boa Vista - Vitória de Santo Antão, PE - Brasil

CEP: 55608680

Telefone: (81) 35233351

email: mogabrod@gmail.com

Resumo

A ostra do mangue *Crassostrea sp.* foi escolhida como possível organismo biomonitor de genotoxicidade para avaliar a contaminação ambiental no estuário Canal de Santa Cruz, devido a intensa pressão antrópica que coloca em risco a biodiversidade e conservação do sistema ecológico local. Neste estudo, foram utilizadas as metodologias do ensaio cometa e teste de micronúcleos para hemócitos de *Crassostrea sp.* A sensibilidade das ostras aos efeitos de poluentes com ação clastrogênica/ aneugênica e mutagênica foi avaliada e confirmada pela detecção de microlesões no DNA pelo ensaio cometa, e pela alta frequência de macrolesões visualizadas como micronúcleos (MN) em células da hemolinfa. Este estudo avaliou as concentrações de sete metais (Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}) e análise microbiológica na água do estuário Canal de Santa Cruz e nos tecidos moles de *Crassostrea sp.* O impacto genotóxico foi quantificado com base no número de células micronucleadas por 1.000 analisadas, usando lâminas da hemolinfa corados com Giemsa. Concentração dos metais Cd, Pb estavam acima do limite permitido pela legislação ambiental vigente na água estuarina na coleta do inverno. Concentrações maiores de metais foram identificados nos tecidos moles das ostras coletadas no verão. Coliformes termotolerantes foram encontrados na água estuarina em todos pontos de coleta nas duas estações. Diferença significativa ($p < 0,05$) foi encontrada nas frequências de MN, no Índice de dano e na frequência de danos entre o estuário e a estação depuradora. O índice de dano foi significativamente diferente entre as estações seca e chuvosa para um ponto de coleta, sendo o maior índice de dano no verão para este ponto. A frequência de MN foi significativamente ($p < 0,05$) maior no inverno para dois pontos de coleta. Portanto, o molusco bivalve *Crassostrea sp.* demonstrou ser um excelente bioindicador de poluição do mangue, mostrando-se sensível a possíveis agentes genotóxicos presentes no seu habitat.

Palavras – chaves: Genotoxicidade, micronúcleo, ostra, contaminação, metais pesados.

1. INTRODUÇÃO

A expansão das atividades industriais e turísticas na região da costa brasileira, além do elevado crescimento populacional humano e sobrepesca, tem colocado em risco o delicado sistema ecológico complexo estuarino Canal de Santa Cruz (Almeida & Vasconcelos Filho, 1997; Leitão, 2007). Esta área estuarina é de 4.776 ha, sendo uma das maiores e mais importantes reservas biológicas da região. O Canal de Santa Cruz faz a ligação entre o ecossistemas costeiros, estuários e manguezais do complexo Itamaracá (MMA, 2002). É um ecossistema extremamente importante pela alta biodiversidade e por atuar como berçário para diversas espécies de peixes, crustáceos e moluscos de importância econômica (MMA, 2002).

O uso excessivo de pesticidas no meio rural, a descarga de efluentes industriais e esgoto nas áreas urbanas são fatores determinantes para a contaminação do meio ambiente. Dentre os diferentes ecossistemas que sofrem com este tipo de contaminação, as áreas de manguezais têm sido freqüentemente atingidas. Devido à baixa dinâmica de ondas inerentes a esse ambiente, o processo de recomposição destas áreas é demorado podendo levar vários anos (Kennish, 1997). A qualidade da água desse ecossistema sofre influência negativa da espécie humana que vive no seu entorno, que contribui com grande aporte de poluentes nocivos a biota estuarina e a própria população local. Os diversos poluentes podem atingir os ecossistemas aquáticos carregados pelo escoamento e drenagem das águas da chuva e irrigação (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

Descargas de efluentes de diversas fontes no meio aquático têm preocupado muitos pesquisadores, pela possibilidade de causar efeitos deletérios nos organismos expostos. Os poluentes metais pesados e diversos tipos de pesticidas, são compostos potencialmente citotóxicos e/ ou carcinogênicos aos diversos organismos vivos (Lemaire e Livingstone, 1993), eles e outros poluentes industriais podem induzir a alterações genotóxicas, clastogênicas direta ou indiretamente (através do estresse oxidativo) formando adutos de DNA, modificando o perfil proteômico de um organismo exposto (BAGCHI et al., 1995; MARNETT, 1999; DAILIANIS et al., 2003; CASIDA e QUISTAD, 2004). As alterações na molécula de DNA além de comprometer a saúde dos organismos, também podem comprometer as gerações futuras, por serem capazes de induzir o aparecimento de alterações herdáveis (RIBEIRO, 2003).

Particularmente com relação aos metais, por não serem biodegradáveis, podem causar risco, principalmente por serem facilmente incorporados à cadeia alimentar e tonarem-se tóxicos aos organismos vivos quando ultrapassam determinadas concentrações (Barros, 2012).

Dentro desse contexto o uso de organismos bioindicadores presentes no ecossistema impactado torna-se uma alternativa viável para mensurar os efeitos dessas substâncias tóxicas nos sistemas biológicos.

A ostra de mangue *Crassostrea sp.* (Bivalvia: Ostreidae) é uma espécie eurialina que habita os manguezais e estuários com uma vasta distribuição desde o sul do Brasil até o Caribe (Boffi, 1979). Como vários outros moluscos bivalves, *Crassostrea sp.* tem características importantes de uma espécie sentinela, sendo úteis no biomonitoramento da poluição (Wallner-Kersanach et al, 2000; Rebelo et al, 2003; Silva et al, 2003). As vantagens mais evidentes destes organismos são a sua ampla distribuição, hábito sésil e capacidade de concentração de produtos químicos com relação à água (Sunila, 1987). Esta espécie representa uma importante fonte de alimento em áreas costeiras do Brasil (Mancera e Mendo., 1996, Silva et al, 2001,2006), onde também foi previamente utilizado como um modelo biológico para estudos toxicológicos ambientais (Silva et al, 2001; Alves et al, 2002; Ferreira et al., 2004; Zanette et al, 2006). São excelentes modelos experimentais em estudos toxicológicos e indicados para estudos de genotoxicidade pois seus componentes celulares são muito sensíveis a agentes genotóxicos (Al-Sabti,1995).

Alguns biomarcadores (por exemplo, citologia, genética, bioquímica ou molecular) têm sido empregados com sucesso para detectar efeitos deletérios e subletais sobre as populações de animais, quantificando o estresse ambiental e os efeitos causados pelos poluentes (Bayne 1986; Monserrat et al 2007; Moore et al, 1986; Dorigan e Harrison, 1987; Adam et al 2010). Biomarcadores fornecem uma medida temporal e espacial integrada de poluentes biodisponíveis e têm o potencial para indicar as alterações provocadas por poluição que ocorrem nos ecossistemas, permitindo o início de estratégias de biorremediação antes de danos graves serem efetivados (Allen, J.I. e Moore 2004; Galloway, T.S., 2006).

Muitos biomarcadores de genotoxicidade foram aplicados em bivalves (Dixon et al, 2002). Entre os testes de genotoxicidade disponíveis, o ensaio cometa (CA) e o ensaio de micronúcleos (MN) são reconhecidos devido à sua robustez, sensibilidade e poder estatístico para avaliar danos na molécula de DNA (V. Heuse et al, 2008). Além disso, atualmente estudos apontam que a associação dos dois ensaios é o melhor teste da bateria para avaliar o potencial mutagênico, pois ambos os ensaios são muito sensíveis, simples e permitem detectar quebras em níveis cromáticas e cromossômicas, respectivamente (OECD, 2014).

O Ensaio MN tem sido aplicado em diferentes espécies de bivalves, tanto em condições de campo e laboratório: Hemócitos e células de brânquias são os alvos mais freqüentemente considerados (Bolognesi & Hayashi, 2011).

O Ensaio Cometa é uma técnica que permite detectar lesões potencialmente pré-mutagênicas (Singh et al, 1988; Tice, 1995). Esta técnica, que pode ser usada em qualquer tecido, e tem sido aplicada com sucesso em hemócitos e eritrócitos de várias espécies de moluscos e peixes (David et al, 2008; Ventura et al, 2008; Christofolletti et al, 2009). Esta técnica é importante pois complementa as análises do teste do micronúcleo (Rothfuss et al. 2010).

A associação dos Ensaio MN e Cometa pode ser considerada como a melhor alternativa entre os testes mutagênicos, porque têm alta sensibilidade, poder estatístico, sendo simples, versátil demandando baixo custo de tempo e investimento (Bolognesi and Fenech, 2012).

Diante do que foi exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta da ostra de mangue *Crassostrea sp.* aos impactos das atividades antrópicas e a qualidade ambiental de uma área do Complexo Estuarino canal de Santa Cruz-Itamaracá localizado ao longo da costa do nordeste brasileiro, através da avaliação de danos genômicos pelos ensaios Cometa e Micronúcleos.

2. Material e Método

2.1. Área de Estudo e local da Amostragem

Foram amostrados espécimes ($n=10$ /ponto de coleta) de ostra *Crassostrea sp.* ($5,389 \pm 0,461$ cm; $1,90 \pm 0,229$ g) no período do seco (março/2015) e chuvoso (julho/2015) em três pontos (P1= lado esquerdo 2013 ($7^{\circ}48'41.1''S$ – $34^{\circ}51'26.3''W$); P2= lado direito Norte ($7^{\circ}48'37.4''S$ – $34^{\circ}51'37.4''W$); P3= lado direito sul ($7^{\circ}48'34.2''S$ – $34^{\circ}51'46.1''W$) do complexo estuarino do canal de Santa Cruz, localizado no litoral Norte de Pernambucano (Figura 1). O estuário foi selecionado conforme os diferentes níveis de conservação, descritos pela CPRH - Agência Estadual de Meio Ambiente/PE. Para fins comparativos, os espécimes controle oriundos de cultivo no rio Coruripe, foram transplantados para uma estação de depuração em Coruripe – AL, ocorrendo o processo de depuração durante 48 horas.

Figura 1. Localização geográfica dos locais de coleta P-I (lado esquerdo), P-II (lado direito norte) e P-III (lado direito sul), do complexo estuarino Canal de Santa Cruz, analisados no presente estudo.



Fonte: Google maps.

2.2. Amostra de água

As amostras da água foram coletadas na depuradora e nos três pontos do estuário no Verão e Inverno a aproximadamente 70 cm de profundidade, e armazenadas em caixas térmicas a 4°C. As amostras foram devidamente acondicionadas em recipientes disponibilizados pelos laboratórios, Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL), O Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP) e Laboratório de Análises Minerais Solos e Água (LAMSA). No momento da coleta foram mensurados os parâmetros físico-químicos (Os parâmetros físico-químicos Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$), Sólidos Dissolvidos (mg/L), O (mgO_2/L) /L), OD% (Salinidade (mg/L), Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$) e pH) com multiparâmetro (556 MPS, YSI incorporated).

2.3. Ensaio Micronúcleo em *Crassostrea sp.*

Para o Ensaio Micronúcleo, uma suspensão de células foi obtida pela mistura da hemolinfa coletada de cada um dos 10 exemplares de *Crassostrea sp.* e EDTA na proporção 2/1 ml. A hemolinfa foi previamente coletada através da punção no músculo adutor posterior,

com uma seringa hipodérmica agulha calibre 21 (a fim de evitar danos para os hemócitos, de acordo com Nudi et al., 2010). Para cada ostra, a suspensão celular foi gotejada sobre as duas lâminas utilizando o método desenvolvido por Scarpato et al. (1990) e adaptado por Nudi et al. (2010) e aplicado em *Crassostrea sp.* As lâminas ficaram (5 min) secando ao ar à temperatura ambiente, em seguida foram fixadas (5 min) em metanol absoluto e novamente secas a temperatura ambiente (5 min). As lâminas foram coradas (5 min) com Giemsa e, em seguida, limpas e lavadas com água deionizada. Depois de secas, cada lâmina foi cuidadosamente observada sob um microscópio binocular Zeiss (1000 ×), acoplado a um (Zeiss) sistema de análise de computador AxioVision LE®, para quantificar o número de células micronucleadas por 1.000 analisados (MN%). Os MN foram identificados de acordo com os critérios descritos por Fenech et al (2003).

2.4. Ensaio Cometa

O método utilizado para o Ensaio Cometa foi a técnica alcalina, descrita por Singh et al. (1988), com modificações. Primeiramente, as lâminas foram mergulhadas em agarose comum (ponto de fusão normal) a 60 °C, secas e armazenadas em geladeira. As amostras de hemolinfa foram processadas concomitantemente àquelas utilizadas para o Ensaio Micronúcleo. Para a montagem das lâminas, primeiramente 200µL de hemolinfa foram misturados a 100 µL de solução EDTA - anticoagulante. Aliquotas (20 µl) de hemolinfa de cada animal foi homogeneizado com 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0, 5%), a 37 °C, em seguida foi dispreso numa lamina pré- tratada com agarose padrão 1,5% (ponto de fusão normal). Essas lâminas foram resfriadas e inseridas numa solução de lise (1mL Triton X-100, 20 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH10,0 - solução estoque: 146,1 g de NaCl 2,5M, 37,2 g de EDTA-titriplex 100 mM, 1,2 g de Tris 10 mM e 890 mL de água deionizada) durante 1h, seguidamente foi realizada a corrida de eletroforese em tampão alcalino (7,5 mL de EDTA-titriplex 200 mM 45 mL de NaOH 10 N e 1500 mL de água deionizada, pH~13), à baixa temperatura com os parâmetros (25V e 300 mA / 20min). As lâminas foram neutralizadas com o tampão Tris – HCl pH7,5 durante 10 minutos. Essas lâminas foram fixadas em etanol 10 minutos, coradas com Gel Red e utilizando microscópio de fluorescência combinando luz branca (488 nm) e filtro vermelho foi quantificado e classificados o número de núcleos celulares (100 núcleos/ostra) com danos aparentes em seu DNA. Todos os passos supracitados foram realizados na ausência de luz direta.

2.5. Análise estatística e procedimento dos dados

As análises estatísticas de teste micronúcleo e ensaio cometa foram realizadas utilizando o software Statistica v. 6.0 (STATSOFT, INC.). A frequência de células micronucleadas em *Crassostrea sp.*, bem como o número de células micronucleadas por 1000 células avaliadas (MN ‰) foram obtidas a partir de dez espécimes de cada local ($n = 10$ / ponto de coleta). Foram confeccionadas duas lâminas por espécime, e para cada ostra foram analisados aleatoriamente 100 núcleos. A análise de distribuição dos cometas e quantificação dos danos foi utilizada a classificação visual baseado na migração de fragmentos de DNA, definidos em classes que variam de zero a quatro de acordo com o tamanho da cauda formada pelo DNA danificado. As análises dos dados foram realizadas utilizando dois parâmetros distintos, o índice de dano (*ID*), calculado como o total de produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador da classe, $ID = 0.(n \text{ classe } 0) + 1.(n \text{ classe } 1) + 2.(n \text{ classe } 2) + 3.(n \text{ classe } 3) + 4.(n \text{ classe } 4)$; e a frequência do dano (*FD*), calculada como a porcentagem de todos os cometas em relação ao número total de células avaliadas, $FD = [(n \text{ total} - n \text{ classe } 0).100]/n \text{ total}$. A homogeneidade dos dados do Ensaio Micronúcleo e Ensaio Cometa foi verificada pelo teste de Bartlett, e, em seguida, os mesmos foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis quando a variância foi não-homogênea, seguido do teste *a posteriori* de Tukey com um nível de significância estatística de ($p < 5\%$).

2.6. Análise dos parâmetros físico-químicos

2.6.1. Análise de Metais

Os íons metálicos contaminantes, (Cádmio (Cd^{2+}), Cromo (Cr^{3+}), Cobre (Cu^{2+}), Ferro (Fe^{2+}), Mercúrio (Hg^{2+}), Chumbo (Pb^{2+}), Manganês (Mn^{2+}) e Zinco (Zn^{2+}) foram quantificados na amostra de água e no tecido visceral da ostra *Crassostrea sp.* A análise do Hg^{2+} foi realizada no Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP) de acordo com o método Absorção Atômica por Vapor Frio 3112B do Standart Methods Apha, (1998). A quantificação dos demais íons supracitados foram feitas no Laboratório de Análises Minerais Solos e Água (LAMSA) no Departamento de Engenharia Química da UFPE, utilizando Espectrofotometria de Absorção Atômica (Aparelho CG AA 7000 BC), a metodologia usada foi Standard Methods for Examination of Water and Wastewater Apha, (1998).

As concentrações de metais mensuradas na água foram comparadas com valores de referência para água salobra (impacto humano mínimo ou "classe 1" de acordo com a legislação CONAMA Resolução 357/2005, CONAMA – 2005) e valores de referência para água de consumo humano de acordo com o ministério da saúde pela Portaria nº 2914/2011 do MS - 2011).

2.7. Análise microbiológica da água e da *Crassostrea sp.*

As análises microbiológicas da ostra e da água estuarina foram feitas no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL) do Departamento de Nutrição da UFPE. As amostras foram obtidas após coletas e refrigeradas a 4°C até a sua entrega no laboratório. As análises foram através da contagem total dos seguintes microrganismos: *Coliformes* a 45°C (NMP/ml), *Estafilococos coagulase positiva* (UFC/g), *Salmonella sp.* 25g e *Vibrio parahaemolyticus* (UFC/g) segundo (FDA/AOAC, 2001; APHA, 1998).

Os parâmetros microbiológicos do tecido visceral da *Crassostrea sp.* foram comparados com os valores permitidos e proposto pela (ANVISA RDC 12/2001; Legislação do CONAMA nº 274/2000 e Portaria nº 2914/2011 do MS).

2.8. Dados pluviométricos

Os dados pluviométricos foram obtidos no *Site* da Agência Pernambucana de Águas e clima (APAC -2015).

3. Resultados

Dados pluviométricos

A partir dos dados pluviométricos obtidos por meio da Agência Pernambucana de Águas e clima /APAC -2015, os maiores índices pluviométricos no mês de março (estação seca) foram posteriores aos dias de coleta dos espécimes em estudo (Figura 2) para os três pontos de coleta (P1= lado esquerdo 2013, P2= lado direito Norte, P3= lado direito sul). Não houve precipitação nos dias de coleta no ponto 1 e 2, porém no último dia de coleta no ponto

3 houve precipitação de 4,3mm. Não foi observado no mês antecedente às primeiras coletas uma precipitação acentuada capaz de elevar além do normal o nível de água do ambiente em questão, podendo ser considerado um período seco. Em julho houve precipitação durante os três dias de coleta dos espécimes. Alta precipitação também ocorreu no mês de junho, sendo seus efeitos estendidos até o mês seguinte (mês de coleta), configurando-se como uma estação chuvosa.

Análise dos parâmetros físico-químicos

A partir da análise dos parâmetros físico-químicos (Tab. 1) e sua comparação com os índices propostos como aceitáveis pela resolução CONAMA 357/2005 para um ambiente de água salobra de Classe 1, observa-se que o parâmetro oxigênio dissolvido apresentou valor dentro dos limites proposto pela legislação no ponto 1 e 3 na estação seca, e no ponto 1, 2 e 3 na estação chuvosa. O pH manteve seus valores de acordo com a legislação em todos os pontos de coleta em ambas estações. O parâmetro microbiológico, coliformes a 45°C (termotolerante) para água estuarina apresentou valor fora do espectro aceito pela legislação em todos os pontos amostrais, durante as coletas realizadas (Tab. 2).

A porcentagem de oxigênio dissolvido na água do ponto 2 durante a estação seca mostrou-se menor que os pontos 2 e 3 nas duas estações. A condutividade apresentou um aumento sutil no ponto 2 na estação seca quando comparada com o ponto 3 no mesmo período, e quando comparado todos os pontos durante a estação chuvosa. A temperatura e salinidade apresentaram pequenas oscilações ao longo das coletas nas estações seca e chuvosa.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas na Depuradora e no Estuário Canal de Santa Cruz no verão e inverno de 2015. O estuário está situado Vila Velha - Itamaracá, PE, Brasil.

Parâmetro físico – químico	Controle	ESTAÇÃO						CONAMA *VMP
		Seca			Chuvosa			
		Depuradora	P1	P2	P3	P1	P2	
Temperatura °C	28,91	31,15	29,37	27,35	27,46	27,4	27,35	ND
Condutividade (mS/cm)	46,59	60,99	58,78	51,33	54,51	53,27	51,33	ND
DDS (mg/L)	28,19	35,5	35,26	32,03	33,84	33,16	32,03	ND
Salinidade	27,84	35,99	35,75	32,16	34,19	33,44	32,16	>5% <30%
OD%	95,1	110,9	77,9	103,2	118,7	116,7	103,2	ND
O (mgO ₂ /L)	6,2	6,78	4,82	6,81	7,7	7,66	6,81	> 5
pH	8	7,8	7,8	7,8	8,1	8,1	8,1	6,5 a 8,5

*VMP (mg/L) = valor máximo permitido para ambientes lóticos (Resolução CONAMA 357/2005, estabelecido para águas salobras classe 1). ND = Não Definido.

Tabela 2. Análise microbiológica da água da Depuradora e dos pontos de coletas = P1, P2, P3 no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil nas estações Seca e Chuvosa.

Microrganismos	Controle Depuradora	ESTAÇÃO					
		Seca			Chuvosa		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3
Coliformes a 45°C(NMP/ml)	(NI)	>1100	>1100	>1100	>1100	>1100	>1100
<i>Salmonella sp.</i> 25/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-I)	(-)	(-)
<i>V. parahaemolyticus</i> (UFC/mg)	(NI)	(NI)	(NI)	(NI)	(NI)	(NI)	(NI)
<i>E. coagulase</i> + (UFC/mg)	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0

NMP = Número mais provável. UFC = Unidade formador de colônia. NI – (Não Identificado), (-) Ausência.

A concentração de coliformes a 45°C (termotolerante) no tecido visceral de *Crassostrea sp.* nos pontos referentes à coleta da estação chuvosa, apresentou valor (> 1000 NMP/ml) muito superior ao espectro permitido pela legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução n. 12, de Janeiro de 2001 que regulamenta pescados e produtos da pesca destinados ao consumo humano, e da Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde que dispõe sobre valor máximo permitido para água destinada ao consumo humano. A ANVISA prevê através da Resolução n. 12, os limites para *Estafilococcus*

coagulase positiva (102 a 103 UFC/g), coliformes termotolerantes a 45° C (2 x 10 a 103 NMP/g) e *Salmonellas* sp (ausente em 25 g), em moluscos bivalves “in natura”, resfriados ou congelados não consumidos crus, e para *Vibrio parahaemolyticus*, limite de 103 NMP/g para pescado marinho ou estuarino apenas consumidos crus. (ANVISA, 2001).

A água estuarina também demonstrou Valores superiores de coliformes termotolerantes ao permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que estabeleceu padrões e normalizou os parâmetros de qualidade da água para cultivo de organismos aquáticos, onde a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, determina que a água salina ou salobra utilizada para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana não deverá exceder 43 coliformes termotolerantes por 100 mililitros de água e um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local.

Quando comparada as concentrações de coliformes a 45°C no tecido da ostra à resolução do CONAMA 274/2000 sobre as águas destinadas a balneabilidade (recreação de contato primário) a água foi considerada excelente (Tab. 3). As ostras das coletas da estação seca apresentaram ausência de coliformes estando dentro dos valores permitidos por todas legislações acima referenciadas.

Tabela 3. Análise microbiológica em *Crassostrea* sp. depurada e dos respectivos pontos de coletas = P1, P2 e P3 no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil nas estações Seca e Chuvosa.

Microrganismos	Controle Depuradora	ESTAÇÃO					
		Seca			Chuvosa		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3
Coliformes a 45°C(NMP/ml)	(NI)	(NI)	(NI)	(NI)	21	150	28
<i>Salmonella</i> sp. 25/g	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (UFC/mg)	(NI)	(NI)	(NI)	(NI)	(NI)	(NI)	(NI)
<i>Estafilococcus coagulase</i> + (UFC/mg)	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0

NMP = Número mais provável. UFC = Unidade formador de colônia. NI – (Não Identificado), (-) Ausência.

Metais pesados na água e em *Crassostrea sp.*

A partir da análise de metais pesados disponibilizados pelo Laboratório do ITEP e LAMSA (Tab. 4) e sua comparação com os índices propostos como aceitáveis pela resolução CONAMA 357/2005 para um ambiente de água salobra de Classe 1, e a Portaria 2914/2011 do MS para água de consumo humano, as análises de metais na água coletada na estação chuvosa revelaram concentrações de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) superiores ao estabelecido. Os demais metais apresentaram limites favoráveis pela legislação. Os limites do metal Cr não são definidos pelas legislações citadas anteriormente, sendo necessário comparar seus valores estabelecidos nessa pesquisa com outros dados previamente disponibilizados na literatura científica.

Tabela 4. Análise de íons na água da Depuradora e do Estuário Canal de Santa Cruz.

Metais pesados (Água)	Depuradora (mg/L)	Estação		CONAMA VMP** (mg/L)	MS VMP*** (mg/L)
		Seca (mg/L)	Chuvosa (mg/L)		
Manganês	ND*	ND	ND	0,1	0,1
Chumbo	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01
Zinco	ND	ND	ND	0,09	5
Ferro	ND	0,01	< 0,05	0,3	0,3
Cobre	ND	ND	ND	0,005	2
Mercurio	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,0002	0,001
Cádmio	ND	ND	0,01	0,005	0,005
Cromo	ND	ND	ND	0,05	-

*ND (Não detectável), **VMP = valor máximo permitido para ambientes lóticos (Resolução CONAMA 357/2005, estabelecido para águas salobras classe 1). MS= Ministério da saúde, ***VMP = valor máximo permitido para água destinada ao consumo humano (Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde).

As análises de metais no tecido visceral das ostras coletada na estação seca e chuvosa revelaram concentrações de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) inferiores ao estabelecido pela Resolução da ANVISA RDC nº 42/2013 que limita a concentração dos metais Pb (1,5 mg/kg) e Cd (2mg/kg) em moluscos bivalves apresentando-se “satisfatória” para o consumo. Os demais metais não apresentam limites definidos por essa legislação sendo necessário compará-los com outros dados semelhantes disponíveis.

Quando comparados com a portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde os metais, com exceção do cromo (Cr) e Cu para ostras da estação depuradora, apresentaram valores superiores, caracterizando a ostra do estuário como contraindicada para o consumo humano,

uma vez que a mesma filtra constantemente partículas e substâncias dissolvidas na água na qual está inserida. Comparando as concentrações de metais no tecido da ostra coletadas nas duas estações percebemos que o acúmulo foi maior na seca, exceto o metal cobre que mostrou-se mais concentrado no tecido da ostra coletada na estação chuvosa. Foi observado nas ostras da estação depuradora que os metais Zn, Fe e Pb estavam em maior concentração que as ostras estuarinas.

Tabela 5. Análise de metais pesados no tecido visceral de *Crassostrea sp.* depuradas e do estuário Canal de Santa Cruz .

Metais pesados	Depuradora (mg/L)	Estação		ANVISA	MS
		Seca (mg/L)	Chuvosa (mg/L)	VMP** (mg/L)	VMP*** (mg/L)
Manganês	1,79	5,39	4,53	-	0,1
Chumbo	0,61	0,42	0,37	1,5	0,01
Zinco	814,88	140,83	67,31	-	5
Ferro	136,20	74,81	68,43	-	0,3
Cobre	1,01	3,51	5,03	-	2
Cádmio	0,02	0,05	0,04	2,0	0,005
Cromo	0,02	3,56	0,87	-	-

*NA (Não analisado). **VMP = valor máximo permitido de contaminantes inorgânico em alimentos (Resolução ANVISA RDC N°42/2013, estabelecido para moluscos bivalves). MS = Ministério da saúde, ***VMP = valor máximo permitido para água destinada ao consumo humano (Portaria n° 2914/2011 do Ministério da Saúde).

Ensaio Micronúcleo (MN) e Ensaio Cometa

Os resultados obtidos a partir do teste do micronúcleo em espécimes de ostra *Crassostrea sp.* coletados no período seco e chuvoso estão apresentados nas tabelas (Tab. 6 e 7). Os dados das tabelas mostram a frequência com que as células micronucleadas - MN (Fig.2) foram encontradas na hemolinfa das ostras coletadas no complexo estuarino Canal de Santa de Cruz. Esses resultados demonstram que avaliação do efeito genotóxico, utilizando amostras da coleta do período seco, período com índice pluviométrico baixo nos 10 dias antes da coleta de acordo com a (APAC, 2015) e do período chuvoso, os pontos amostrais apresentaram frequências de micronúcleos (MN %) significativas em relação ao controle (Fig.3).

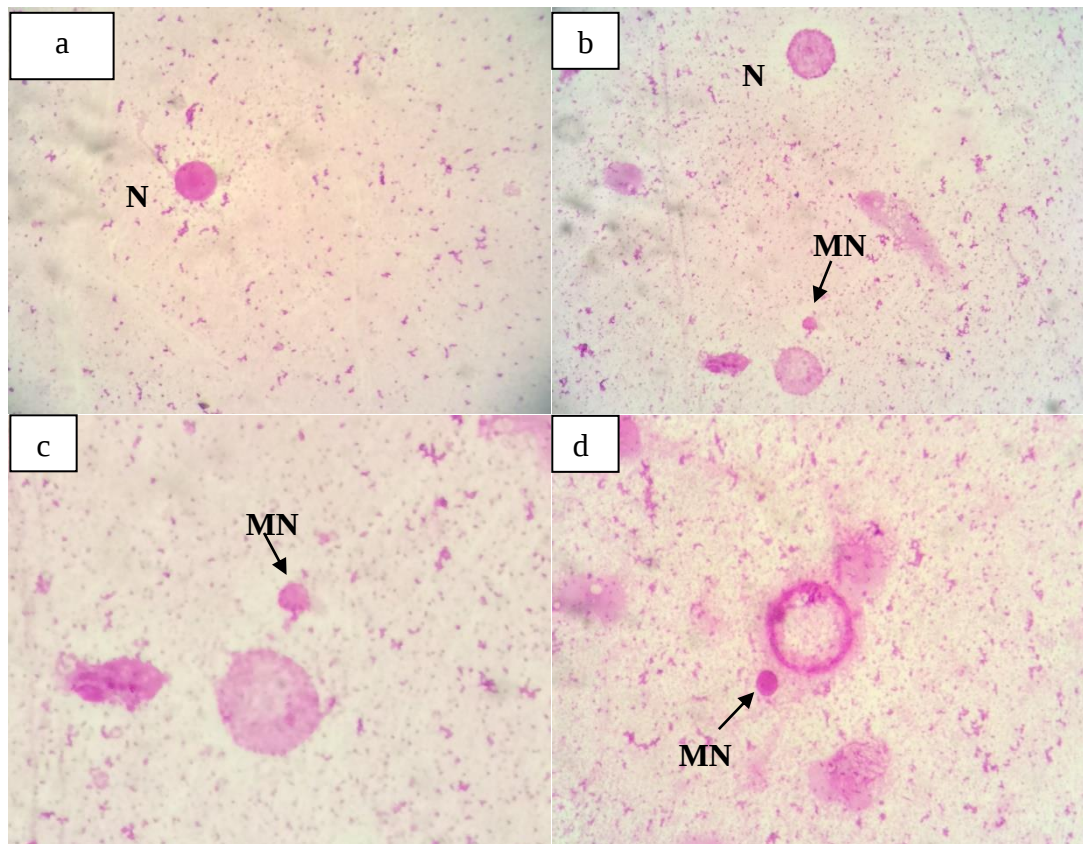
Tabela 6. Número de células normais (N) e micronucleadas (MN), com a sua frequência (%) em espécimes de *Crassostrea sp.* coletadas no período seco nos três pontos (P1, P2 e P3) do estuário Canal de Santa Cruz e Depuradora em Coruripe, no estado de Pernambuco e Alagoas, Brasil.

Espécime analisado	Canal de Santa Cruz (Período Seco)									Depuradora		
	P1			P2			P3					
	Células Normais	Cél. MN	Freq. (%)	Células Normais	Cél. MN	Freq. (%)	Células Normais	Cél. MN	Freq. (%)	Células Normais	Cél. MN	Freq. (%)
1	981	19	0,019	998	2	0,002	993	7	0,007	995	5	0,005
2	989	11	0,011	995	5	0,005	996	4	0,004	996	4	0,004
3	988	12	0,012	995	5	0,005	993	7	0,007	995	5	0,005
4	994	6	0,006	982	18	0,018	989	11	0,011	997	3	0,003
5	990	10	0,01	993	7	0,007	994	6	0,006	995	5	0,005
6	993	7	0,007	992	8	0,008	993	7	0,007	998	2	0,002
7	986	14	0,014	985	15	0,015	991	9	0,009	997	3	0,003
8	987	13	0,013	990	10	0,01	995	5	0,005	997	3	0,003
9	990	10	0,01	991	9	0,009	994	6	0,006	995	5	0,005
10	993	7	0,007	996	4	0,004	992	8	0,008	998	2	0,002
Total	9891	109	0,0109	9917	83	0,0083	9930	70	0,007	9963	37	0,0037

Tabela 7. Número de células normais (N) e micronucleadas (MN), com a sua frequência (%) em espécimes de *Crassostrea sp.* coletadas no período chuvoso nos três pontos (P1, P2 e P3) do estuário Canal de Santa Cruz e Depuradora em Coruripe, no estado de Pernambuco e Alagoas, Brasil.

Espécime analisado	Canal de Santa Cruz (Período Chuvoso)									Depuradora		
	P1			P2			P3			Células Normais	Cél. MN	Freq. (%)
	Células Normais	Cél. MN	Freq. (%)	Células Normais	Cél. MN	Freq. (%)	Células Normais	Cél. MN	Freq. (%)			
1	957	43	0,043	928	72	0,072	931	69	0,069	995	5	0,005
2	970	30	0,03	931	69	0,069	944	56	0,056	996	4	0,004
3	938	62	0,062	948	52	0,052	931	69	0,069	995	5	0,005
4	974	26	0,026	967	33	0,033	954	46	0,046	997	3	0,003
5	980	20	0,02	972	28	0,028	962	38	0,038	995	5	0,005
6	956	44	0,044	898	102	0,102	959	41	0,041	998	2	0,002
7	974	26	0,026	954	46	0,046	957	43	0,043	997	3	0,003
8	957	43	0,043	918	82	0,082	962	38	0,038	997	3	0,003
9	980	20	0,02	934	66	0,066	932	68	0,068	995	5	0,005
10	973	27	0,027	961	39	0,039	944	56	0,056	998	2	0,002
Total	9659	341	0,0341	9411	589	0,0589	9476	524	0,0524	9963	37	0,0037

Figura 2. Hemócitos de ostra *Crassostrea sp.*

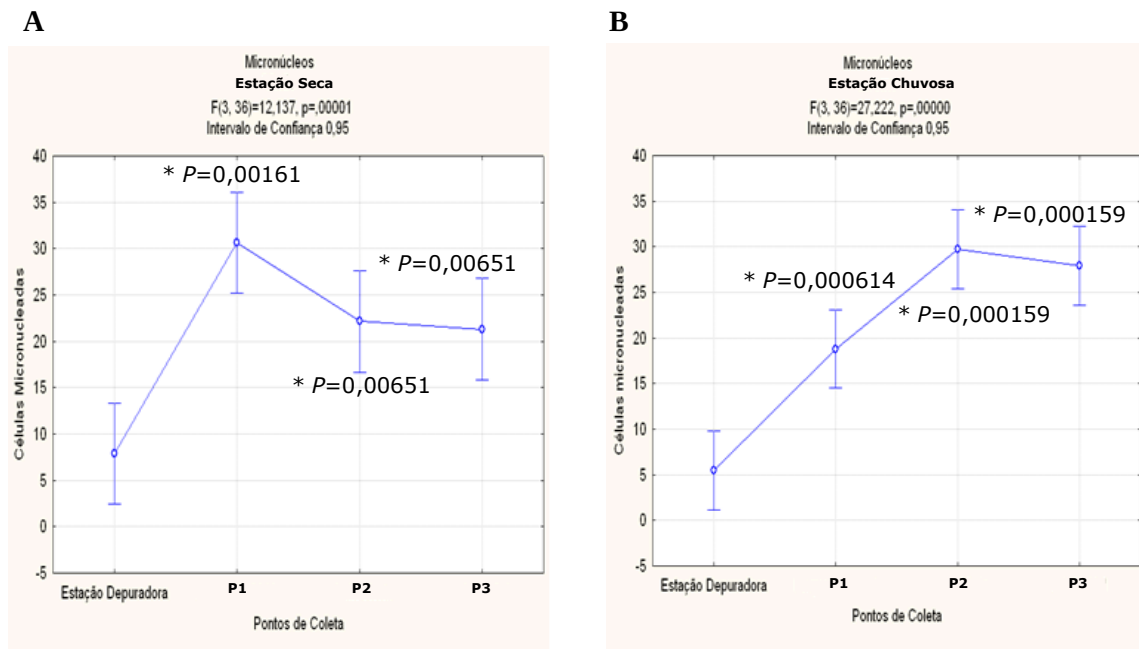


Apresentado-se de duas maneiras: N= Normais e MN= Micronucleado. Em (a) hemócitos normais e em (b, c e d) observamos simultaneamente hemócitos normais e MN. Fonte: Kelma Souza.

Na análise de micronúcleo de ostra *Crassostrea sp.* foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,001$) entre os três pontos (P1, P2 e P3) de coleta no estuário canal de Santa Cruz durante o período seco e chuvoso e a estação depuradora , essa diferença na frequência de MN apresentaram valores $p < 0,001$ (Fig. 3 A e B) para os respectivos pontos citados.

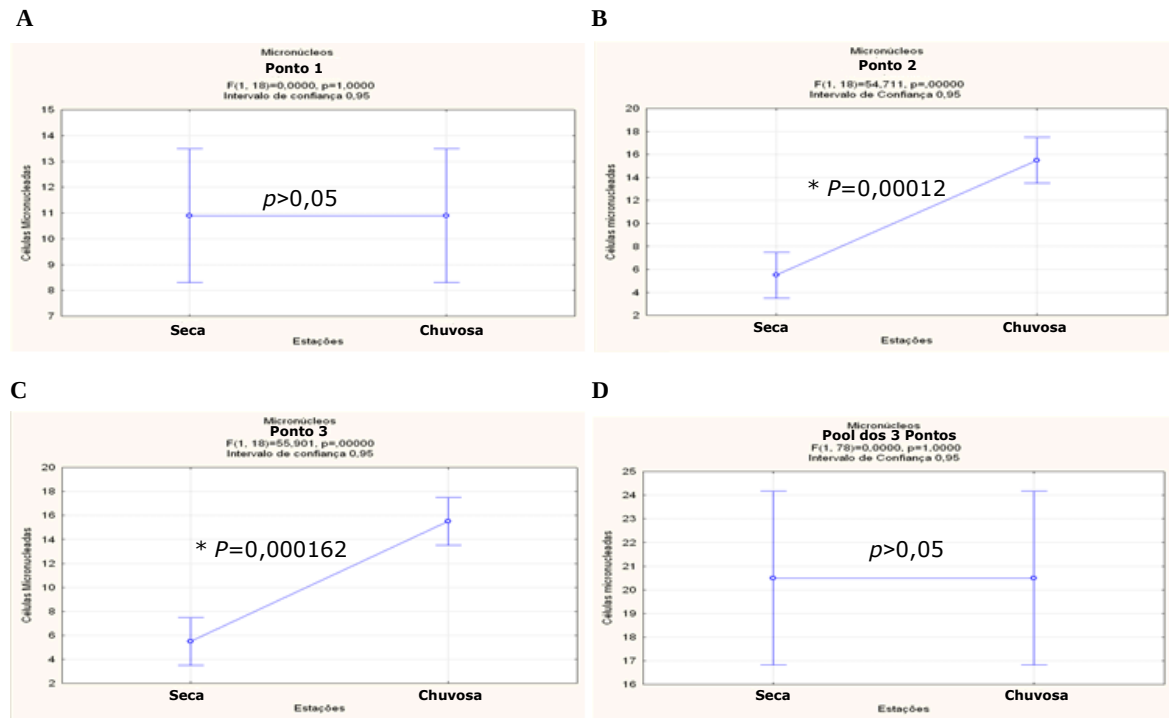
A comparação das frequências de células MN feita entre os pontos durante a estação seca (Fig. 3 A) mostrou semelhança na frequência de macrolesões, valor de $p > 0,05$. Contudo, comparações das frequências de MN feitas entre os pontos de coleta na estação chuvosa, mostram diferenças significativas ($p < 0,05$) para o ponto 1 vs ponto 2, e ponto 1 vs ponto 3, enquanto o ponto 2 vs ponto 1 apresentaram frequência de MN semelhantes sendo $p > 0,05$ (Fig 3 B).

Figura 3. Frequências de células Micronucleadas (MN%) na estação depuradora e nos pontos de coletas (P1, P2 e P3) do estuário nas estações seca (A) e chuvosa (B), observados em lâminas de hemolinfa de ostra *Crassostrea sp.* (10/área) analisada no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil. *Diferenças significativas $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.



Comparando a frequência de células micronucleadas dos pontos de coletas entre estação seca e chuvosa, notamos que diferenças significativas $p < 0,0001$ foi encontrada nos pontos 2 e 3, indicando maior ocorrência de macrolesões na estação chuvosa para os pontos citados (Fig. 4 B e C). No entanto semelhança entre as estações foi identificado no ponto 1 do estuário, sendo o valor de $p > 0,05$ (Fig. 4 A). Semelhança na frequência de MN ($p > 0,05$) também foram observadas quando as amostras da estação seca e chuvosa foram tratadas como um pool dos dois períodos (Fig. 4 D).

Figura 4. Comparação das Frequências de células Micronucleadas (MN%) entre os pontos do estuário na estação seca (A, B e C) e entre o estuário em sua totalidade (pool dos 3 pontos) nas estações seca e chuvosa (D), observados em lâminas de hemolinfa de ostra *Crassostrea sp.* (10/área) analisada no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil. *Diferenças significativas $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.



As médias das frequências de micronúcleos, índice de dano e frequência de dano das amostras da estação seca e chuvosa apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle (Tab.8).

Tabela 8. Médias das Frequências de micronúcleos (MN%), dos índices de danos (IDua) e frequências de danos no DNA em hemócitos de espécimes de *Crassostrea sp.* ($n = 10$ ostras/ponto) analisada no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil.

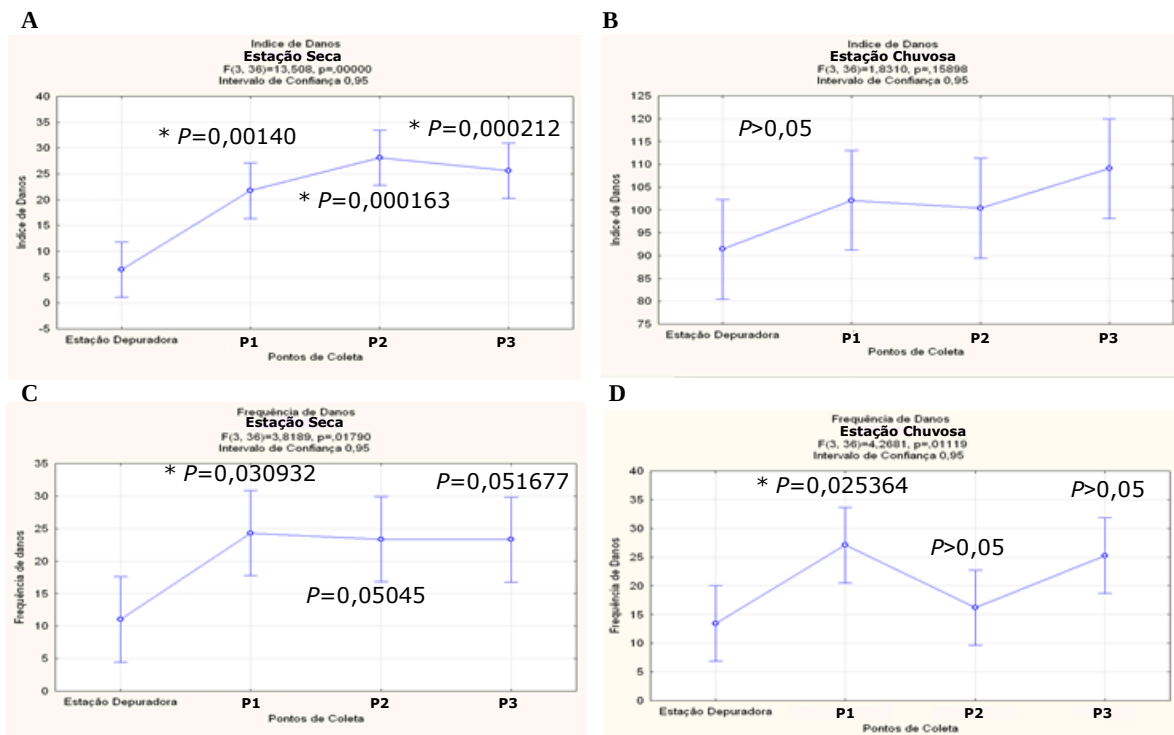
	Controle	ESTAÇÃO					
		Verão			Inverno		
Área de Coleta	Depuradora	P1	P2	P3	P1	P2	P3
MN (Média±DP)	3,7±1,18 ^a	10,09±3,9 ^b	8,3±4,99 ^b	7±2,0 ^b	34,1±13,46 ^b	58,9±23,45 ^b	52,4±12,88 ^b
ID(ua) (Média±DP)	91,4±13,52 ^a	118,5±35,08 ^b	172,7±67,02 ^b	130,5±28,12 ^b	102,1±10,95 ^b	100,4±23,01	109,1±18,07 ^b

DP = desvio padrão. Pontos P1= Lado esquerdo 2013, P2= Lado direito norte, P3 = lado direito sul. ^{a, b} $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.

Na análise de danos no DNA pelo Ensaio Cometa, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,0001$) nos índices de dano entre os três pontos de coleta da estação seca no estuário Canal de Santa Cruz e depuradora (Fig. 5 A). Na estação chuvosa houve semelhanças no índice de dano nos três pontos de coleta, sendo o valor de $p > 0,05$ (Fig. 5 B).

Diferença significativa ($p < 0,05$) na frequência de dano para o estuário na estação seca em relação a estação depuradora foi observada no ponto 1. Enquanto os pontos 2 e 3 apresentaram similaridade entre as frequências de danos (Fig. 5 C). A frequência de dano em ostras coletadas na estação chuvosa foi significativa ($p < 0,05$) no ponto 1, contudo nos pontos 2 e 3 houve semelhança na frequência de dano apresentado valor de $p > 0,05$ (Fig. 5 D).

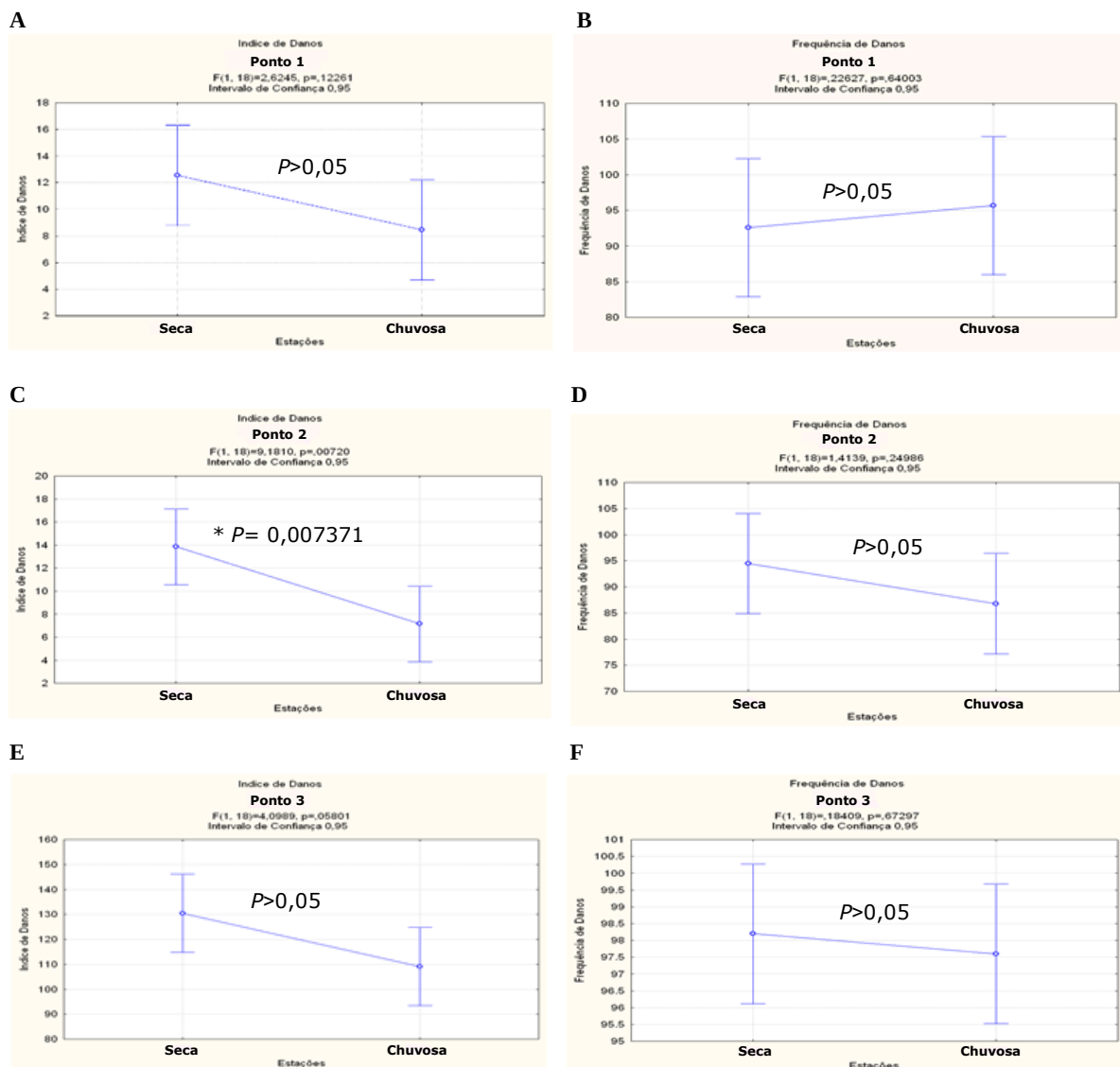
Figura 5. Índice de danificação no DNA (IDua) nas estações seca A) e chuvosa (B) e Frequência de dano genômico nas estações seca (C) e chuvosa (D), observados em lâminas de hemolinfa de ostra *Crassostrea sp.* (10/área) analisada no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil. *Diferenças significativas $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.



Comparando o índice de dano no DNA em células da hemolinfa de *Crassostrea sp.* coletadas no mesmo ponto de coleta na estação seca e chuvosa, notamos que diferenças significativas ($p < 0,05$) foram encontradas no ponto 2, enquanto semelhança ($p > 0,05$) foi observada no índice de dano entre as estações no ponto 1 e 3 (Fig. 6 A, C e E). Esses resultados indicam maior ocorrência de alterações DNA durante a estação seca para o ponto 2. Contudo, valor ligeiramente maior de $p > 0,05$ foi identificado no ponto 1 de coleta.

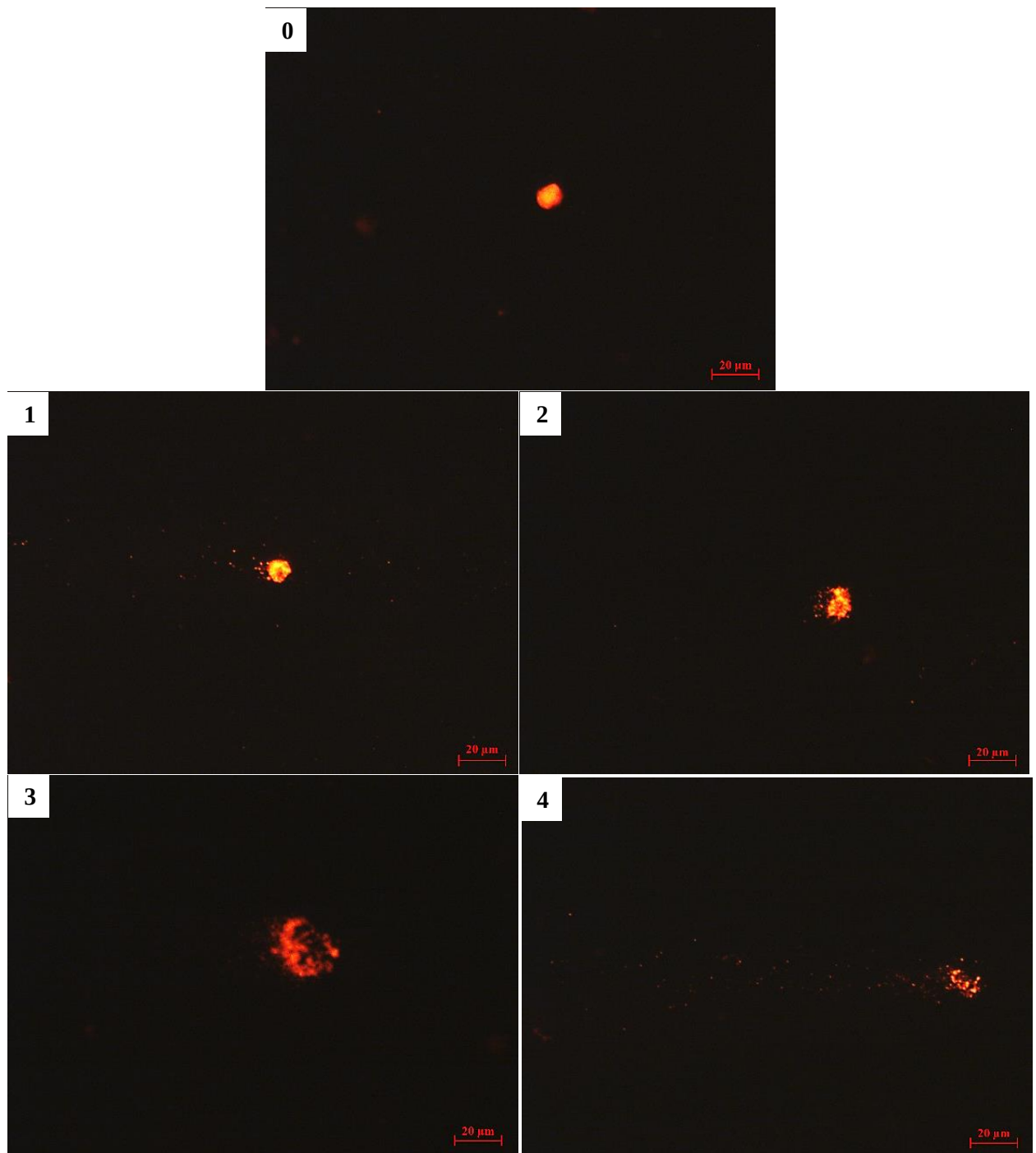
Comparando a frequência de dano em ostras coletadas durante a estação seca e chuvosa observamos ocorrência de microlesões em ambas estações para os três pontos de coleta, onde todos apresentaram $p > 0,05$ (Fig. 6 B, D e F).

Figura 6. Índice de danificação no DNA (IDua) nas estações seca e chuvosa para os pontos de coleta do ponto P1 (A), P2 (C), P3 (E) e na Frequência de dano genômico no ponto 1 (B), P2 (D) e P3 (F), observados em lâminas de hemolinfa de ostra *Crassostrea sp.* (10/área) analisada no estuário Canal de Santa Cruz, estado de PE, Brasil. *Diferenças significativas $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.



Comparando a frequência de dano em ostras coletadas na estação chuvosa e seca observamos ocorrência de microlesões em ambas estações para os três pontos, onde todos apresentaram $p>0,05$ (Fig. 6 B, D e F). A imagem dos quatro níveis de dano encontrados em célula da hemolinfa de ostra do mangue está apresentada na (Fig. 7).

Figura 7. Ensaio cometa em hemolinfa de ostra do mangue *Crassostrea sp.* oriundas do Estuário Canal de Santa Cruz, PE -Brasil. Os núcleos dos hemócitos foram classificados de acordo com o sistema de níveis de dano (DNA cometa) de 0 - 4. Nível 0 representa células sem danos no DNA e nível 4 representa células com o máximo de dano no seu DNA.



Fonte: Kelma Souza.

4. Discussão

Os dados pluviométricos indicam que durante as coletas da estação chuvosa o aporte de água que chega ao estuário é maior, podendo trazer para os ambientes costeiros substâncias nocivas aos organismos aquáticos que vivem neste local. Esse aporte de água também pode provocar diluição das substâncias poluentes presentes no meio aquático. Diante dos resultados citogenéticos, observa-se a interferência da pluviosidade sobre a intensificação dos danos genéticos na ostra *Crassostrea sp.* Os estudos realizados por Souza & Fontanetti (2006), em rio, apresentaram maiores índices de alterações em período de reduzido nível de água, indicando influência da sazonalidade e precipitação. Segundo Ergene et al. (2007) as concentrações dos poluentes nas águas dependem do fenômeno de enriquecimento ou diluição, causado pela chuva ou pela drenagem da água. Isso explicaria as diferenças estatísticas significativas nas frequências de macrolesões (MN) e microlesões (DNA cometa) quando comparados os pontos de coletas nas estações seca e chuvosa.

Segundo (Brito et al, 2012; Porto et al, 2005), a Chuva contribui para a dispersão da água e biodisponibilidade de contaminantes de agricultura e atividade industrial, e muitos contaminantes aquáticos de danos no DNA. Se não reparados, os danos no DNA podem afetar as funções de genes importantes, levando a uma rápida alteração no metabolismo celular, transformação e morte celular.

A quantificação dos metais na água revelou elevada concentração de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) nos pontos amostrais do inverno, corroborando a alta frequência de MN presentes em todos os pontos de coleta do mesmo período. A concentração de chumbo identificada nas ostras da estação depuradora foi a mesma da estação chuvosa, porém a frequência de MN foi significativamente maior que nas ostras depuradas. Esse resultado pode estar relacionado com menor tamanho, tempo de filtração e bioacumulação das ostras da estação chuvosa, assim como seu longo período de contato direto com o metal citado em seu ambiente natural durante todo seu ciclo de vida intensificando o processo de bioacumulação e diminuição da eliminação de possíveis contaminantes. A concentração de chumbo Pb na água da estação depuradora reflete a bioacumulação desse metal nos tecidos moles da ostra durante o cultivo antes do processo de depuração, porém os efeitos genotóxicos nessas ostras foi significativamente menor que as ostras das estações seca e chuvosa, sugerindo que as ostras da estação depuradora devido ao maior tamanho e idade tiveram maior eficiência no processo de eliminação dos metais pesados.

Os estudos de Yabe & Oliveira (1998) relacionaram elevadas concentrações de chumbo à presença de danos no DNA dos eritrócitos de *Tilapia rendalli*.

O Cd é classificado como tendo efeitos bastante severos quanto aos efeitos sobre a divisão celular (Patra et al.2004). O Cd apresenta alta toxicidade, ampla distribuição no ambiente e longo período de meia-vida (Almeida et al.2001). Indústrias químicas, de tintas e têxteis são as principais fontes de contaminação por Cd (Marcano et al.2002). As altas concentrações de cádmio nos pontos de coleta sugerem, portanto, que efluentes industriais são lançados nos rios que desaguam no canal de Santa Cruz, impactando diretamente esse ecossistema e colocando risco a biota, os seres humanos que vivem no entorno do estuário, e comprometendo seriamente o status de conservação desse ambiente considerado berçário de muitas espécies marinhas.

Segundo Fenech (2000), os contaminantes são capazes de induzir aberrações cromossômicas por diversos mecanismos, sendo a ação clastogênica e a aneugênica as mais comumente observadas. Estudos de Sanchez-Galan et al.(1999) e de Ayllón e Garcia-Vazquez (2000) relataram a presença de micronúcleos em peixes expostos ao cádmio. A indução de micronúcleos pode se relacionar a atrasos dos cromossomos durante a anáfase, devido ao mau funcionamento do fuso, ação aneugênica (Fernandes et al. 2007; Fenech, 2000), ou pela presença de fragmentos acêntricos derivados de quebras cromossômicas, ação clastogênica (Matsumoto et al. 2006; Fenech, 2000). Sendo assim, as altas frequências de micronúcleos observadas em hemócitos de ostras coletadas na estação chuvosa deve estar correlacionada a exposição desses organismos ao Cd presente nas águas dos pontos amostrais nessa estação. Esses resultados, como apresentados por Hoshina et al. (2008) e Matsumoto et al. (2006), indicam potencial genotóxico do cádmio.

Com o Ensaio Cometa constatou-se perda significativa de integridade do DNA pela identificação de cometas de classes 1, 2, 3 e 4 (Figura 7). Esse evento resultou em elevados ID (ua)s e demonstrou elevado potencial genotóxico das amostras. Segundo Kamman et al., 2001; Duarte et al., 2012), o Ensaio Cometa é considerado dano genômico potencialmente pré-mutagênico. Esses danos no DNA foram mais intensos durante a estação seca, quando o estuário sofreu menos efeito da pluviosidade.

A significativa genotoxicidade observada pelos ensaios cometa e micronúcleo, utilizados como parâmetro biótico, sugere que o Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz sofre influência negativas de grandes quantidades de substâncias com potencial genotóxico, dentre elas os metais Pb, Cd e poluentes orgânicos. Esses últimos comprovados pela presença

de coliformes fecais a 45°C que é um indicativo de contaminação esgoto doméstico sem o devido tratamento.

Níveis de alto de Zn encontrados nas ostras da estação depuradora e nas estações seca e chuvosa sugerem que esses organismos estavam expostos a altas concentrações de metais, que podem ter produzido mais proteínas de ligação com metal, por exemplo, metalotioneínas, que estão envolvidos no sequestro e detoxificação de certos metais por longos períodos de tempo (Kohler e Riisgård 1982). Noel- Lambot et al. (1978) também relataram que metalotioneína pode fixar metais dentro dos tecidos. Há também evidências de que o Cu e Zn em ostras são armazenados em estruturas citoplasmáticas. (Viarengo 1989).

Ostras normalmente acumulam concentrações elevadas de zinco (Engel e Brouwer 1982) e, portanto, são considerados eficiente acumuladores desses metais (Rainbow *et al.*, 1990). A acumulação de zinco na ostra americana ostra *C. virginica* ocorre através basófilos amebócitos, que podem mover livremente através dos tecidos e pode sequestram e remover o excesso de cobre e zinco. Sugere-se que em áreas contaminadas esta ostra tem mais do que um mecanismo de regulação de cobre e zinco, neste caso, a produção de amebócitos e metalotioneína pelo organismo (Engel, 1999).

Embora não existam estudos disponíveis sobre mecanismos de armazenamento de zinco em *C. rhizophorae*, é provável que esta espécie apresenta um padrão de acumulação semelhante ao *C. virginica* (Wallner-Kersanach et al, 2000).

A origem de altas concentrações de zinco em ostras nativas no Canal de Santa Cruz pode vir de tintas anti-incrustantes e reparos de lanchas e barcos usados na atividade turística local.

Embora as concentrações de alguns metais encontrados na água do estuário canal de Santa Cruz não tenham sido tão elevadas como seria de esperar, a sensibilidade dos ensaios Cometa e MN puderam detectar danos na molécula de DNA em baixíssimas concentrações de poluentes. Segundo (Monserrat et al 2007; Sponchiado et al 2011), testes de genotoxicidade são altamente sensíveis para detectar danos genômicos, mesmo quando os poluentes são presentes em baixas concentrações (Monserrat et al 2007; Sponchiado et al 2011).

A alta frequência de MN encontrada nos hemócitos de ostra *Crassostrea sp.* coletadas na estação seca e chuvosa indicam que o estuário recebe substâncias poluentes que provocam efeitos clastrogênico/aneugênico e mutagênico em ambas estações. Esses resultados são indicativos de ocorrência de macrolesões no material genético da espécie em estudo. O nível de significância apresentado na frequência de micronúcleo para o estuário na estação seca e chuvosa, reflete o grau do impacto ao qual o ambiente estuarino Canal de Santa Cruz está

exposto. Similaridade nas frequências de MN entre os pontos de coleta na estação chuvosa, sugere que neste período toda área estudada está impactada. Esses resultados são confirmados quando as amostras da estação seca e chuvosa foram tratadas como um pool dos dois períodos.

Os poluentes citados anteriormente são oriundos dos efluentes domésticos da comunidade ribeirinha, das atividades turísticas e dos efluentes industriais liberados ao longo dos rios que desaguam no Complexo estuarino Canal de Santa Cruz. A presença de coliformes termotolerantes em todos os pontos de coletas na estação seca e chuvosa, e a concentração desses microrganismos no tecido da ostra em todos os pontos na estação chuvosa, são indicativos de presença de poluentes orgânicos no ambiente estuarino estudado. Esses poluentes associados a presença de Pb e Cd podem ter estimulado o aumento da frequência de MN devido a sua capacidade de provocar um impacto genético (Bijlsma e Loeschcke, 2012).

Indução de MN também foi evidenciado em mexilhões e peixes após exposição a metais pesados (Bolognese et al., 2012; de lemos et al., 2001). Outros autores como (Mersch et al., 1996; Scarpato et al., 1996; Venier et al., 1997) também relataram indução de MN por poluentes orgânicos, corroborando com o indicativo de poluição orgânica devido a presença de coliformes termotolerantes na água estuarina nas estações seca e chuvosa.

Baixa frequência de MN foi encontrado em *C. corteziensis* exposta a 80 e 160 µg de clorpirifós, porém essa frequência não apresentou diferença significativa entre o controle Segundo Benitez -Trinidad (2014).

Segundo Burgeot e Galgani (1995), frequência de MN em ostras cultivadas em área contaminada por Cd e Cu não exibiu sensibilidade ao gradiente de poluição, apresentando alta variabilidade interindividual. Estes resultados são relatados para outros bivalves, como *Macoma balthica* e *Mytilus edulis* (Barsiené et al., 1996).

Quanto à frequência MN em espécies de ostras, poucos estudos estão disponíveis na literatura. Em *Crassostrea gigas*, Burgeot et al. (1995) encontraram uma frequência de MN basal de 2,8, enquanto em *Crassostrea virginica*, Weis et al. (1995) encontraram uma frequência basal de MN de 4,8. Nível basal semelhante de MN (3,7) foi encontrado em nossos estudos com a ostra *Crassostrea sp.* proveniente da depuradora. Poucos trabalhos estão disponíveis para a frequência basal de MN nos moluscos bivalves. A este respeito, a Tabela 9 mostra que os níveis basais de MN descritos na literatura variam entre os organismos bivalves a partir de 0,54 - 5,7 MN / 1.000 células. Nossas descobertas sobre as frequências de MN em células de hemolinfa de *Crassostrea sp.* mostram eficiência dos ensaios e uso da ostra como bioindicador, pois o número de MN encontrados supera os observados na literatura, onde as

médias de células MN encontradas ficaram entre 7 – 10,9 na estação seca e 34,1 – 58,9 MN/1000 célula analisadas na estação chuvosa, sugerindo que o complexo estuarino Canal de Santa Cruz encontra-se sob forte impacto da ação antropogênica.

Tabela 9. Frequência de micronúcleos (MN) em moluscos bivalves.

Organismo	Tecido	Povente	MN/ 1000 cells	Referencia
<i>Crassostrea sp.</i> (coleta estação seca)	Hemolinfa	Urbano e industrial	P1– 0,9 P2 – 8,3 P3–7	Presente trabalho
<i>Crassostrea sp.</i> (coleta estação chuvosa)	Hemolinfa	Urbano e industrial	P1– 4,1 P2– 8,9 P3– 2,4	Presente trabalho
<i>Mya arenaria</i>	Hemolinfa	Composto orgânico, arsênio	15.4	Debenest et al., 2013
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Heomolinfa Brânquias	Urbano e industrial	5.5 5.1	Taleb et al., 2009
<i>Dreissena polymorpha</i>	Hemolinfa	Di-methylar-sinic-acid Cromato de potássio	6-9 3.2	Mersch et al., 1996
<i>Cerastoderma edule</i>	Hemolinfa	Contaminante químico	0.4	Ruiz et al., 2013
<i>Ruditapes phillipinarum</i>	Brânquias	Metais traço Cr, Ni	4 - 16	Sacchi et al., 2013
<i>Crassostrea corteziensis</i>	Brânquias	Chlorpirifos	1.2	Benitez-Trinidad et al., 2014
<i>Mytilus edulis</i>	Brânquias	Zona contaminada	1. 7- 3.3	Barsiene et al., 2008
<i>Macoma balthica</i>	Brânquias	Zona contaminada	1.2– 3,63	Barsiené et al. 2008
<i>Mytilus edulis</i>	Brânquias	Óleo bruto	2.4	Barsiené e Andreike – naite, 2007
<i>Mytilus trossulus</i>	Brânquias	PCB, DDT, HCB, HCH, organobromados (PBDE)	6	Kopecka et al., 2006
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Glândula digestiva	Hg ⁺²	2.3	Pytharopoulou et al., 2013
<i>Mytilus provincialis</i>	Brânquias	Cloreto de zinco	2.2	Majone et al., 1987
<i>Crassostrea gigas</i>	Células do coração	Benzo(a)-pireno	2.8	Burgeot et al., 1995

A identificação de frequência de danos e índices de danos no genoma de *Crassostrea sp.* indica que microlesões no DNA ou dano genômico estão acontecendo devido à presença,

no ecossistema estuarino, de poluentes que interagem negativamente com a molécula do DNA. A semelhança na frequência e índice de dano sugerem que esses eventos estão acontecendo nos períodos e/ou área de coleta dos espécimes. Essas microlesões estão diretamente relacionadas como o aporte de poluente orgânicos e inorgânicos presentes no corpo d'água do complexo estuarino Canal de Santa Cruz.

A expressiva frequência de dano para o estuário durante a estação seca em relação a estação depuradora no ponto 1 de coleta, área como residências margeando o estuário, confirmam quebras na molécula do DNA de ostra *Crassostrea sp.* Em relação a frequência de danos nos pontos de coletas 2 e 3 na estação seca foi observado que os valores de p foram ligeiramente maiores que ($p > 0,05$), indicando a possibilidade de interferência do grupo amostral coletado nessas áreas. O alto índice de dano no DNA de *Crassostrea sp.* nos três pontos de coletas na estação seca quando comparadas com a estação depuradora, também indica que poluentes genotóxicos estão presentes no estuário estudado, sinalizando que toda área estudada está impactada. Similaridade nos índices de danos observados nos três pontos de coletas durante a estação chuvosa também indica a possibilidade de interferência do grupo amostral coletado nessa área e sendo sobrepulhado pela ação do Cd, uma vez que no ponto 2 o valor de p foi ligeiramente maior que $p > 0,05$.

Índices de danos observados nesse estudo indicam que microlesões no DNA estão acontecendo na ostra do mangue, podendo ter efeito deletérios sobre alguns genes dos organismos estudados e comprometer o status de conservação do estuário, tendo em vista que os quatro níveis de dano (Fig. 6) foram encontrados em célula da hemolinfa de ostra do mangue.

A sensibilidade dos Ensaio Cometa e Micronúcleo observados neste trabalho, reforçam o potencial uso desses ensaios e do bivalve *Crassostrea sp.* no monitoramento da qualidade e toxicidade de áreas estuarinas que apresentam contaminação química (inorgânica), orgânica e microbiológica.

No estuário Canal de Santa Cruz as principais fontes de contaminação são provenientes do crescente polo industrial que tem se desenvolvido no litoral norte e a intensa atividade canavieira que ocorre na região (Barletta & Costa 2009). Sendo assim, o impacto causado nos estuários dos rios Jaguaribe e Sirinhaém possui uma forte associação com essas atividades desenvolvidas nas regiões. Os resultados genotóxicos observados no estuário Canal de Santa Cruz são semelhantes aos encontrados na região Sudeste do Brasil por Souza et al (2013) na espécie *Centropomus parallelus*, demonstrando que os níveis de danificação

genômica aumentam em regiões próximas a áreas com grandes contingentes demográficos e industriais.

O Canal de Santa Cruz é classificado como uma área de preservação ambiental, porém mesmo sendo uma APA, tem sofrido os efeitos diretos das atividades turísticas que ocorrem nesta localidade. Estudos realizados por Vila Nova & Torres (2012), revelam que a presença de áreas de preservação ambiental próximas a mananciais, não são uma garantia da conservação dos recursos hídricos e biológicos. De fato, isto é corroborado por nossos dados, que destacam que a presença desta APA de Santa Cruz pode não estar sendo uma garantia de integridade do material genético das espécies que se encontram nesse ecossistema. Estudos recentes relatam que danos no DNA provocam nos organismos alterações patofisiológicas que incluem: retardo do crescimento, disfunções enzimáticas e anormalidades no desenvolvimento, fato que pode estar acontecendo com as populações de *Crassostrea sp.*, e em outros organismos que vivem nesse habitat (Adamet al. 2010; Pinheiro et al. 2013; Pinheiro & Toledo 2010; Ribeiro et al. 2013; Vila Nova & Torres 2012).

Os efeitos dos danos no DNA das espécies estuarinas podem comprometer a qualidade ambiental dos estuários, tendo como consequências negativas a perda de diversidade biológica e contaminação direta pelo consumo desses pescados pelas comunidades locais, que têm a pesca extrativista como meio de sobrevivência.

5. Conclusão

Deste modo, inferimos que existem contaminantes no complexo estuarino Canal de Santa Cruz que induzem efeitos genotóxicos no molusco bivalve *Crassostrea sp.* O impacto genotóxico foi confirmado pela detecção de microlesões no DNA (Ensaio Cometa) e pela alta frequência de macrolesões (MN) em células da hemolinfa. As análises físico-químicas e microbiológicas da água e dos tecidos moles da ostra, em conjunto com as respostas genéticas das ostras indicam que o complexo estuarino Canal de Santa Cruz encontra-se impactado pela ação antropogênica. Portanto, os Ensaio Cometa e Micronúcleo, e o organismo bioindicador *Crassostrea sp.* demonstraram ser excelentes ferramentas no monitoramento de poluição de áreas estuarinas, devido a sua sensibilidade e fidelidade aos efeitos de possíveis xenobióticos genotóxicos presentes nesses ecossistemas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq), e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT ambientes tropicais/ CNPq pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- Adam, M. L., Torres, R. A., Sponchiado, G., Motta, T. S., Oliveira, C. M. R., Carvalho-Filho, M. A.; Correia, M. T. S. (2010). Environmental degradation at a public park in Southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). *Water, Air, and Soil Pollution*, 211, 61–68.
- Allen, J.I.; Moore, M.N. Environmental prognostics: is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Mar. Environ. Res.* 58, 227–232 (2004).
- Almeida, Z.S.; Vasconcelos Filho, A.L. (1997). Contribuição ao conhecimento de peixes Pleuronectiformes da área de Itamaracá-PE (Brasil). *Trab. Oceanog. Univ. Fed. PE.* 25:69-82.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*;343:121-135.
- Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Dal Pai Silva, M. ; ALVES JÚNIOR, R., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution*, 114: 169-175.
- Alves, S.R.C., Severino, P.C, Ibbotsom, D.P., Silva, A.Z.X., Lopes, F.R.A.S., Sáenz, L.A., Bainy, A.C.D., 2002. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Marine Environmental Research*. v. 54, p. 241-245.
- AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS. A pesca no litoral Norte. Diagnóstico sócio ambiental- Litoral Norte de Pernambuco. p. 91-98.2011.Disponível em: < <http://www.cprh.pe.gov.br>.
- AYLLÓN, F. & GARCIA-VAZQUEZ, E., 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research*, 467: 177-186.
- ANVISA - Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001- Brasília: D.O.U., 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III.
- ANVISA – RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013- Brasília: D.O.U., 2013. Regulamento Técnico Mercosul sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos.

APAC – Agência Pernambucana de águas e clima.
<http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php>. Accessed 10 nov. 2015.

APHA., 1998. Standard Methods for the Examination of Water and wastewater. American Publication of Health Association, Washington, DC, 20^a/ 22^a ed.

Bagchi, D.; Bagchi, M.; Hassoun, E.A.; Stohs, S.J., 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, v. 104, p. 129-140.

Bayne, B. L., 1986. Measuring the effects of pollution at the cellular and organism level. In: G. Kullemberg (ed.), *The role of the oceans as a waste disposal option*, Riedel (pp. 617–634). New York: NY.

Barros, D.; Barbieri, E., 2012. Analysis of occurrence of metals: Ni, Zn, Cu, Pb and Cd in oysters (*Crassostrea brasiliana*) and sediment collected in the Cananeia Estuary-SP (Brazil).

Barletta, M., & Costa, M. F., 2009. Living and non-living resources exploitation in a Tropical Semi-arid Estuary. *J Coastal Res.*(56), 371-375.

Basiené, J, Tapia G, Barsyte D., 1996. Chromosome of molluscs inhabiting some mountain spring of eastern Spain. *J. Mollus. Stud.* 62: 539-543.

Barsiené, J.; Andreikénaitė, L., 2007. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels exposed to crude oil from the North Sea. *Ekologija* 53: 9-15.

Barsiene, J. et al., 2004. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. *Environ. Toxicol.* 19, 365–371.

Barsiené, J.; Andreikénaitė, L.; Garnaga, G.; Rybakovas, A., 2008. Genotoxic and cytotoxic effects in the bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. *Ekologija* 54: 44-50.

Barsiene, J. et al., 2006. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 469–478.

Belfiore, N.M.; Anderson, S.L., 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: A review. *Mutat Res* 489:97-122.

Benitez-Trinidad, A.B; Bernal-Hernández, Y.Y; Moreno-Hernández ,C.L; Medina-Díaz, I.M, Robledo-Marenco, M.L; Barrón-Vivanco ,B.S; Domínguez-Ojeda , D.; Romero-Bañuelos, C.A; Girón-Pérez , M.I; Rojas-García , A.E., 2014. Acetylcholinesterase inhibition and micronucleus frequency in oysters (*Crassostrea corteziensis*) exposed to chlorpyrifos. Research report. 11: 247-256.

Bijlsma, R.; Loeschcke, V., 2012. Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evolutionary Applications*, 5(2), 117–129.

Bolognesi, C.; Fenech, M. Mussel micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 7: 1125-1137.

- Bolognesi, C.; Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205–213.
- Bolognesi, C.; Fenech, M., 2012. Mussel micronucleus cytome assay. *Nature protocols* vol.7 N.º6.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P. & Sciutto, A., 2006. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of spill: Haven case study. *Mar. Environ. Res* 65, S287–S291.
- Burgeot, T., His, E., & Galgani, F., 1995. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Research*, 342, 125–140.
- Carraro, 2007. Caracterização dos impactos ambientais na ilha de Itamaracá, Pernambuco, *Rev. Bras. Enga. Pesca* 2[2], maio.
- Casida, J.E.; Quistad, G.B., 2004. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research in Toxicology*, v. 17, p. 983–998.
- Christofolletti, C.A.; David, J.A.O.; Fontanetti, C.S., 2009. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): a methodological comparison. *Genetics and Molecular Biology*; 32:155-159.
- Collins, A.R. ; MA, A.G. ; DUTHIE, S.J., 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells. *Mutation Research*, 336: 69–77.
- Collins, A., Dusinska, M. ; Franklin, M., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30: 139–146.
- Collins, A. 2004. Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26: 249–261.
- Collins, A., Oscoz, A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., SMITH, C. ; Stetina, R. 2008. The Comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 30(3): 143–151.
- Conama, 2005. Resolução Conama no 357, de 17 de março de 2005 - Brasília: D.O.U., 2005. Available at: <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Accessed 10 Jan. 2016.
- Conama, 2000. Resolução Conama no 274, de 29 de novembro de 2000 - Brasília: D.O.U., 2000. Available at: <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Accessed 10 Jan. 2016.
- Countryman, P. I., & Heddle, J. A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, 41, 321–332.
- Dailianis, S.; Domouhtsidou, G.P.; Raftopoulou, E.; Kaloyianni, M.; Dimitriadis, V.K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, v. 56, p. 443–470.

David, J.A.O.; Hoshina, M.M.; Fontanetti, C.S., 2008a. DNA damage in *Mytella falcata* (Mytiloidea, Mytilidae) cells: a new tool for biomonitoring studies in tropical estuarine ecosystems. *Naturalia*, 31:1-7.

Debenest, T.; Gagné, F.; Burgeot, T.; Blaise, C.; Pellerin, J., 2013. DNA integrity assessment in hemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) in the Saguenay Fjord (Québec, Canada). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 621-629.

Dixon, D.R., Prusky, A.M., Dixon, L.R.J.; Jha, A.N., 2003. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17, 495–507.

Dorigan, J. V., & Harrison, F. L., 1987. Physiological responses of marine organisms to environmental stressors. Washington, DC: U.S. Department of Energy.

Duarte, I. D. ; Dias, M. C. D.; David, J. A. O & Matsumoto, S. T. 2012. A qualidade da água da Lagoa Jacuném (Espírito Santo, Brasil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos, mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 211-219.

Engel, D.W., 1999. Accumulation and cytosolic partitioning of metals in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Environ Res* 47:89–102.

Engel, D.W.; Brouwer, M., 1982. Detoxification of accumulated trace metals by the American oyster *Crassostrea virginica*: laboratory vs. environment. In: Vernberg WB, Calabrese A, Thurberg FP, Vernberg FJ (eds) *Pollution physiology of estuarine organisms*. Academic Press, New York, pp 89–107.

Ergene, S., Çavas, T., Çelik, A., Koleli, N., Kaya, F.; Karahan, A. 2007. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16: 385-391.

Fenech, M.; Chang, W.P.; Kirsch-Volders, M.; Holland, N.; Bonassi, S.; Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 534:65-75.

FDA/AOAC, 2001. "Bacteriological Analytical Manual" da Food and Drug Administration , editado por Association of Official Analytical Chemists em suas últimas edições e ou revisões Brasil.

Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C.; Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* expose to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 88(3): 252-259.

Ferreira, A. G., Santos Machado, A. L., Zalmon, I. R., 2004. Temporal and spatial variation on heavy metal concentrations in the bivalve *Perna perna* (Linnaeus, 1758) on the Northern Coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 47, n. 2, p. 319- 327.

Galloway, T.S., 2006. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 606–613.

Heuser, V.; Andrade, V.; Peres, A.; Braga, L.; Chies, J., 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells, *Cell Biol. Int.* 32, 1223–1229.

Hose, J. E.; Cross, J.; Smith, S. G.; Dichl, D., 1987. *Mar. Environ. Res.* 22, 167–176.

Hoshina, M.M., Angelis, D.F. & Marin-Morales, M.A. 2008. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutation Research*, 656: 44-48.

IBAMA, 2002. Relatório técnico: avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade das zonas costeira e marinha.

Brito, I.A.; Freire, C.A.; Yamamoto, F.Y.; Assis, H.C.S.; Souza-Bastos, L.R.; Cestari, M.M.; Ghisi, N.C.; Prodocimo, V.; Neto, F.F.; Oliveira Ribeiro, C.A., 2012. *J. Environ. Monit.*, 14, 615–625.

Kamman, U., Bunke, M.; Steinhart, H. 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Research*, 498: 61-77.

Kennish, M. J., 1997. Practical handbook of estuarine and marine pollution. Boca Raton: CRC Press.

Kempf, M., 1970. Nota preliminar sobre os fundos costeiros da região de Itamaracá (norte do Estado de Pernambuco, Brasil). *Trab. Oceanografia. Universidade Federal de Pernambuco. PE. Recife*, v. 9/11, p. 95-110.

Klobucar, G., Pavlica, M., Erben, R.; Papes, D., 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*, 64: 15-23.

Kohler, K.; Riisgård, H.U, 1982. Formation of metallothioneins in relation to accumulation of cadmium in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 66:53–58.

Kopecka, J.; Lehtonen, K.K.; Barsiené, J.; Broeg, K.; Vuorinen, P.J.; Gercken, J. et al., 2006. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the gulf of Gdansk (southern Baltic). *Mar. Pollut. Bull.* 53: 406-421.

Lemaire, P.; Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends Comparat. Biochem. Physiol.* 1119-1120.

Mancera, E. ; Mendo, J., 1996. Population dynamics of the oyster *Crassostrea rhizophora* from the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. *Fisheries Research*. v. 26, pp. 139-148.

Marcano, L.; Carruyo, I.; Del Campo, A.; Montiel, X., 2002. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study. *Environmental Research*, Section A, 88: 30-35.

Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, v. 424, p. 83-95.

Matsumoto, S.T.; Mantovani, M.S.; Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C.; Marin-Morales, M.A. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 148-158.

Mersch, J.; Beauvais, M.N.; Nagel, P., 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mut. Res.* 371: 47-55.

Ministério da saúde – MS, 2011 – Portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2011- Brasília: D.O.U., 2011. Available at: <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Accessed 10 Jan. 2016.

Moore, M. N.; Lowe, D. M.; Livingstone, D. R.; Dixon, D. R., 1986. Molecular and cellular indices of pollutant effects and their use in environmental impact assessment. *Water Science and Technology*, 18, 223–228.

Monserat, J. M.; Martínez, P. E.; Geracitano, L. A.; Amado, L. L.; Martins, C. M. G.; Pinho, G. L. L.; Chaves, I. S.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-Lima, J.; Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146, 221–234.

Monteith, D.K.; Vanstone, J., 1995. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. *Mutation Research.*; 345: 97-103.

Noel-Lambot, F.; Bouquegneau, J.M.; Frankenke, F.; Distche, A., 1978. Le role des metallothioneines dans le stockage des metaux lourds chez les animaux marins. *Revue Int Oceanogr Med* 49:13–20.

Nudi, A. H.; Wagener, A. L. R.; Francioni, E.; Sette, C. B.; Sartori, A. V.; Scofield, A., 2010. Biomarkers of PAHs exposure in crabs *Ucides cordatus*: Laboratory assay and field study. *Environmental Research*, 110, 137–145.

Nwani, C.D.; Lakra, W.S.; Nagpure, N.S.; Kumar, R.; Kushwaha, B.; Srivastava, S.K., 2010. Mutagenic and genotoxic effects of carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 202-208.

OECD, Test No. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay, 2014, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224179-en>.

Oliveira-Martins, C. R.; Grisolia, C.K., 2009. Toxicity and genotoxicity of wastewater from gasoline stations. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 4, 853-856.

Patra, M.; Bhowmik, N.; Bandopadhyay, B.; Sharma, A., 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 199-223.

Pinheiro, M. A., Duarte, L. F., Toledo, T. R., Adam, M. L.; Torres, R. A., 2013. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environ Monit Assess*, 185(10), 8273-8285.

Pinheiro, M. A.; Toledo, T. R., 2010. Malformation in the crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)(Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), in São Vicente (SP), Brazil. *Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha*, 1, 61-65.

Polard, T ; Jean, S. ; Merlina, G. ; Laplanche, C. ; Pinelli, E. ; Gauthier, L., 2011. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 144–149.

Porto, J. I. R.; Araújo, C. S. O.; Feldberg, E., 1997. *Environ. Res.* 97, 287–292.

Pytharopoulou, S.; Kournoutou, G.G.; Leotsinidis, M.; Georgioud, C.D.; Kalpaxis, D.L., 2013. Dysfunctions of the translational machinery in digestive glands of mussels exposed to mercury ions. *Aquat. Toxicol.* 134-135: 23-33.

Rebelo, M.F.; Amaral, M.C.R.; Pfeiffer, W.C., 2003. High Zn and Cd accumulation in the oyster *Crassostrea rhizophorae*, and its relevance as sentinel species. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1341–1358.

Ribeiro, L.R.; Marques E.K., 2003. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra. p.21-27.

Ribeiro, C. A. O; Katsumiti, A.; França, P.; Maschio, J.; Zandoná, E.; Cestari, M. M., 2013. Biomarkers Responses in Fish (*Atherinella brasiliensis*) of Paranaguá Bay, Southern Brazil, for Assessment of Pollutant Effects. *Brazilian Journal of Oceanography*, 61, 1-11.

Rothfuss, A.; O'Donovan, M.; De Boeck, M.; Brault, D.; Czich, A.; Custer, L.; Hamada, S.; Plappert-Helbig, U.; Hayashi, M.; Howe, J.; Kraynak, A.R.; Van Der Leede, B.J.; Nakajima, M.; Priestley, C.; Thybaud, V.; Saigo, K.; Sawant, S.; Shi, J.; Storer, R.; Struwe, M.; VOCK, E.; Galloway, S., 2010. Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies. *Mutation Research*, 702(1): 40-69.

Ruiz, P.; Diaz, S.; Orbea, A.; Carballal, M.J.; Villalba, A.; Cajaraville, M.P., 2013. Biomarkers and transcription levels of cancer-related genes in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain) with disseminated Neoplasia. *Aquat. Toxicol.* 101-111.

Sacchi, A.; Mouneyrac, C.; Bolognesi, C.; Sciuttoc, A.; Roggieri, P.; Fusi, M. *et al.*, 2013. E. Biomonitoring study of an estuarine coastal ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Environ. Pollut.* 177:82-89.

Sanchez-Galan, S.; Linde, A. R.; Garcia-Vazquez, E., 1999. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 43: 301-304.

Scarpato, R.; Migliore, L.; Alfinito-Cognetti, G.; Barale, R, 1990. Induction of micronucleus in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Marine Pollution Bulletin*, 21(2), 74–80.

Scarpato, R.; Migliore, L.; Barale, L., 1990. The micronucleus assay in *Anodonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenicity. *Mut. Res.* 245: 231-237.

Silva, C.A.R.; Rainbow, P.S.; Smith, B.D., 2003. Biomonitoring of trace metal contamination in mangrove-lined Brazilian coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae*: comparative study of regions affected by oil, salt pond and shrimp farming activities. *Hydrobiologia* 501, 199–206.

Silva, D. A. M. ; Buzitis, J. ; Krahm, M. M. ; Bícigo, M. C. ; Pires-Vanin, A. M. S., 2006. Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. *Marine Pollution Bulletin*. v. 52, p. 175-183.

Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Scheider, E.L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175:184-191.

Sunila, I., 1987. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Annales Zoological Fennici*. v. 24, p. 55-69.

Souza, T.S.; Fontanetti, C.S., 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat. Res.*, 605: 87-93.

Souza, T.S.; Fontanetti, C.S., 2012. DNA damage of erythrocytes of fish *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 7, n. 2.

Taleb, Z.M.; Benali, I.; Gherras, H.; Ykhlef-Allal, A.; Bachir-Bouiadjra, B.; Amiard, J.C., et al., 2009. Biomonitoring of environmental pollution on the Algerian west coast using caged mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanologia* 51: 63-84..

Tice, R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; RYU, J.C.; Sasaki, Y.F., 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.

Tice, R.R., 1995. The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venitt, S, eds. *Environmental Mutagen*. CIDADE, Bios Scientific Publishers. 315-339.

- Tomita, R.Y.; Beyruth, Z., 2002. Toxicologia de ambientes aquáticos. O biológico, v. 64,p. 135-142.
- Valverde, M.; Rojas, E., 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681: 93-109.
- Venier, P.; Maron, S.; Canova, S., 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutation Research*, 390, 33–44.
- Ventura, B.C., Angelis, D.F.; Marin-Morales, M.A., 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 90: 42-51.
- Vila Nova, F. V. P.; Torres, M. F. A., 2012. Environmental Evaluation in Conservation Units: Estuary of the Maracaípe River, Ipojuca-PE. *Revista de Geografia*, 29, 199-224.
- Virarengo, A. et al., 2007. A biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN wreck on marine organisms in the Ligurian sea (Italy). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 607–616.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Crit Rev Aquat Sci* 1:295–317.
- Wallner-Kersanach, M.; Theede, H.; Eversberg, U.; Lobo, S., 2000. Accumulation and Elimination of trace metals in a ransplantation experiment with *Crassostrea rhizophorae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 40–45.
- Wallner-Kersanach, M., 1994. Assessment of trace metal pollution of Todos os Santos Bay, Brazil, on the basis of measurements of bivalves and sediments. PhD thesis, University of Bremen.
- Weis, P.; Weiqb, J.S.; Couch, J.; Daniels, C.C.; Chend, T, 1995. Pathological and genotoxicological observations in oysters (*Crassostrea virginica*) living on chromated copper arsenate (CCA)-treated wood. *Mar. Environ. Res.* 39: 275-278.
- Yabe, M.I.S.; Oliveira, E.O., 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Química Nova*, 21: 551-556.
- Zanette, J.; Monserrat, J. M.; Bianchini, A., 2006. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 143 C, p. 187-195.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE DO TECIDO DE OSTRAS *Crassostrea sp.* E O EFEITO DE PESTICIDAS E ÍONS EM SUA ATIVIDADE



A ser submetido ao periódico

Aquatic Toxicology

ISSN: 0166-445X

Caracterização da acetilcolinesterase do tecido de ostra *Crassostrea sp.* e o efeito de pesticidas e íons em sua atividade

Paula Rayane de Souza, Kelma Sirleide de Souza, Marlyete Chagas de Araújo, Kaline Catyele Campos Silva, Caio Rodrigo Dias Assis, Ranilson de Souza Bezerra.

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Autor correspondente:

Ranilson de Souza Bezerra.

Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de Pernambuco,

50670-901 Recife, Pernambuco, Brasil

Tel.: + 55 81 21268540;

Fax: + 55 81 21268576.

E-mail: ransoube@uol.com.br

Resumo

Biomarcadores enzimáticos de diversos organismos aquáticos tem sido utilizado para detectar e avaliar a exposição de contaminantes em níveis sub-letais. As enzimas Colinesterases têm sido comumente aplicadas como biomarcadores para a exposição de moluscos aos pesticidas organofosforados e carbamatos. Acetilcolinesterase (AChE; 3.1.1.7) é uma enzima do grupo das serino-esterases que atua na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina garantindo a intermitência dos impulsos nervosos responsáveis pela comunicação neuronal. Ela é uma enzima alvo para os pesticidas e, as medidas da inibição de sua atividade são amplamente utilizadas em espécies de bivalves como biomarcador dos efeitos da exposição desses poluentes químicos neurotóxicos. Neste contexto, o presente estudo objetivou caracterizar parcialmente parâmetros cinéticos e físico-químicos da acetilcolinesterase presentes nos tecidos de *Crassostrea sp.* e investigar o efeito *in vitro* de pesticidas e íons metálicos sobre sua atividade a fim de avaliar seu potencial como biomarcador. O pH ótimo encontrado foi de 8,0 e 8,5 para a acetilcolinesterase de brânquias e vísceras, respectivamente. A temperatura ótima de 70°C para AChE branquial e 75°C para AChE visceral. A enzima apresentou ser estável até 100°C nos dois tecidos. Os parâmetros cinéticos de V_{max} em brânquias e vísceras foi de $18,169 \pm 0,52$ mU/mg e $12,139 \pm 0,31$ mU/mg, respectivamente. O valor de K_m $0,502 \pm 0,05$ mM para as brânquias e $0,255 \pm 0,04$ mM para vísceras. Todos os pesticidas usados mostraram efeito inibitório na atividade da AChE apresentando decréscimo significativo. Os íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} e Al^{2+} em 0,1 mM inibiram a atividade nos dois tecidos de estudo, brânquias em 79%, 88%, 73%, 100%, 77% e 100%. E nas vísceras em 85%, 100%, 41%, 65%, 100% e 59% respectivamente. A AChE de brânquias da *Crassostrea sp.* mostrou potencial biomarcador para o carbamato carbaril, e o íon Cu^{2+} . E a AChE de vísceras para o carbamato carbofuran. Sendo esta enzima, considerada uma ferramenta útil no monitoramento de toxicidade ambiental.

Palavras-chave: Ostra do mangue, Acetilcolinesterase, Metais pesados, Pesticidas.

1. Introdução

A acetilcolinesterase (AChE), é uma enzima regulatória responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos que está presente nos sistemas nervosos central e periférico, promovendo a hidrólise da ACh nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas. É a enzima mais eficiente em hidrolisar ésteres de colina e sua eficiência catalítica bem como sua alta reatividade com vários inibidores covalentes e não covalentes são determinadas pela arquitetura funcional única do seu sítio ativo (Matos, 2012).

A inibição do seu mecanismo ocorre devido aos efeitos da exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos, bem como a íons metálicos e resulta em acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica gerando uma hiper-estimulação colinérgica (Nunes et al., 2014). A inibição por metais se dá pela ligação dos metais à enzima que ocorre através de ligações com grupamentos tióis proteicos, alterando de maneira irreversível o estado de hidratação do sítio ativo (Marques et al., 2011). Já a inibição do pesticida se dá pela interação com o sítio esterásico da AChE, diferindo apenas no tipo de ligação – fosforilação para organofosforado e carbamilação para carbamatos, impedindo a ligação do substrato (Assis et al., 2011).

Estes poluentes apresentam alta toxicidade, não se degradam de forma natural e acumulam-se nos tecidos vivos, causando vários distúrbios e doenças (Ibrahim et al., 2010). Nos animais, os metais pesados tóxicos atuam em reações altamente específicas, enzimáticas em sua maioria, e alterações no sistema que envolve essas reações, resultando em efeitos negativos. Monitorar e controlar a presença destas substâncias no meio ambiente é necessária uma vez que esses compostos têm se tornado um problema de saúde humana e ambiental (Assis et al., 2010).

A ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae* também conhecida como ostra nativa é um molusco bivalve considerado um excelente bioindicador de contaminação aquática devido as suas características, tais como: o hábito sésil, filtrador, cosmopolita, abundante e resistente a variações ambientais. Desta forma a análise dos efeitos biológicos dos poluentes que contaminam o ambiente estuarino pode ser realizada a partir do estudo de biomarcadores bioquímicos, como as enzimas, que apresentam um alto grau de especificidade e rapidez na resposta as alterações da substância alvo (Vieira *et al.*, 2004). Este bivalve apresenta uma capacidade de filtração em torno de 90 à 100 L de água por dia (Casasbellas, 1991). A regulação da taxa de filtração é influenciada, não só pela concentração de partículas, mas

também em função do seu tamanho. As partículas podem ser rejeitadas, refluídas pela parte posterior direita das brânquias ou filtradas nas brânquias. Pela ação dos cílios branquiais, estas são conduzidas aos palpos labiais, onde são selecionadas de acordo com o seu tamanho e levadas à boca, digeridas no estômago e absorvidas no intestino (Borges, 1989).

Como a estrutura da acetilcolinesterase apresenta variações inter e intraespecíficas, naturais e mutagênicas, é justificável a necessidade de caracterizar a sua atividade em diversas espécies, bem como também verificar sua sensibilidade a alguns compostos. Por isso, a relevância deste estudo com a espécie *Crassostrea sp.*

2. Materiais e Métodos

2.1. Coletas dos espécimes e extração enzimática

Ostras foram coletadas em Vila Velha no complexo estuarino do canal de Santa Cruz localizado no litoral Norte de Pernambucano. Foram coletadas 80 ostras, de mesmo tamanho (comprimento de concha ± 4 cm) no período seco (verão). Estes espécimes foram encaminhados para o Laboratório de Enzimologia (LABENZ) no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em temperatura ambiente onde foram abertas as valvas e extraídos órgãos, separando vísceras, brânquias e feita a homogeneização em tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, em uma concentração de 200 mg/mL com posterior centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C para a remoção de restos celulares. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes intitulados como extratos brutos.

2.2 Atividade de Acetilcolinesterase e dosagem protéica

Foram determinadas segundo Ellman et al. (1961), ensaio feito em quadruplicata. A atividade foi realizada incubando em microplaca 20 μ L do sobrenadante adicionado 200 μ L de reagente cromogênico DTNB 0,25 mM e 20 μ L dos substratos acetilcolina (62 mM) adicionadas imediatamente antes da leitura a 405 nm em um tempo de 180 segundos. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 μ mol de substrato por minuto. O teor de proteína foi estimado de acordo com (Sedmack e Grossberg 1978).

2.3. Parâmetros cinéticos

A Constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram estimadas por ensaio da atividade enzimática em concentrações crescentes de acetilcolina (0,8 - 20,8 mM de concentração final). As atividades foram ajustadas a uma regressão não linear, utilizando o software MicroCal™ Origin® Versão 8.0 (MicroCal, Northampton, MA, EUA).

2.4. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros analisados foram pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade térmica. O pH ótimo foi determinado ensaiando a atividade da enzima por 180s em uma faixa de pH que variou de 4,0 a 9,5 utilizando os tampões: citrato-fosfato (4,0 a 7,5), Tris-HCl (7,2 – 8,7) e NaOH- Glicina (9,0 – 9,5) e mensurada a absorbância em espectrofotômetro de microplaca (xMark™ BIORAD) a 405 nm. A temperatura ótima e a estabilidade da acetilcolinesterase foram avaliadas perante diferentes temperaturas que variaram de 25° a 100°C, com intervalos de 5°C. O perfil da atividade proteolítica frente a variação de temperatura foi avaliado em 180 segundos. No ensaio de estabilidade térmica para cada temperatura avaliada, a amostra foi incubada por 30 minutos em banho maria e em seguida a atividade foi mensurada após 15 minutos a 25°C (temperatura ambiente).

2.5. Ensaio de inibição seletiva

As amostras foram submetidas aos inibidores BW284c51 (inibidor de AChE), brometo de neostigmina e eserina (inibidores de colinesterases totais) em cinco concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 mM. O ensaio foi realizado em quadruplicata de acordo com (Silva et al., 2013), incubando-se em microplaca 10 µL do extrato bruto com 10 µL do inibidor. Em seguida 200 µL de DTNB (0,25 mM) foi adicionado e a reação iniciada após a adição de 20 µL de substrato acetilcolina (62 mM). A absorbância foi seguida a 405 nm por 180s e a atividade residual foi determinada utilizando a ausência do inibidor como atividade de 100%. Os inibidores foram incubados com o extrato bruto 10 µL e 10 µL de inibidor durante 1 h adicionado 200 µL de DTNB (0,25 mM) e 20 µL de substrato acetilcolina (62 mM).

2.6. Ensaio com íons metálicos

Foram determinados segundo Bocquené *et al.*(1990) em quadruplicata a atividade de AChE ensaiada na presença de íons: Hg^{2+} (HgCl_2), Zn^{2+} (ZnCl_2), Fe^{3+} (FeCl_3), Cu^{2+} (CuCl_2) Cd^{2+} (CdCl_2), Mn^{2+} (MnCl_2), Mg^{2+} (MgCl_2) Ca^{2+} (CaCl_2), K^{+2} (KCl_2), Al^{2+} (AlCl_2) nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10mM. A atividade da enzima foi realizada incubando em microplaca 10 μL de sobrenadante e 10 μL de íon, após 40 minutos a temperatura ambiente, foi colocado 200 μL de reagente cromogênico DTNB (0,25 mM) e 20 μL do substrato acetilcolina (62 mM) adicionado imediatamente antes da leitura a 405 nm em um tempo de 180 segundos. As respectivas atividades residuais foram determinadas considerando na ausência de inibidores como atividade de 100%.

2.7. Ensaio com pesticidas

Os extratos foram incubados durante 60 min a 25°C com pesticidas organofosforado (diclorvós) e carbamatos (carbaril e carbofuran). Os inseticidas foram primeiro dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) e então diluídos em água destilada para cinco concentrações finais que variaram de 0,001 a 10 mM, com cada subsequente concentração 10 vezes maior do que a concentração anterior. A incubação foi realizada de acordo com Assis *et al.*(2010) e a atividade residual foi determinada utilizando a ausência de pesticidas como a atividade de 100%. Estes dados foram analisados estatisticamente através de regressão não-linear por meio do decaimento polinomial ou exponencial ($p > 0,05$) utilizando o software Microcal Origin versão 8.0.

2.8. Estimativa de IC50, IC20 e Ki

A concentração capaz de inibir 50% e 20% a atividade da enzima (IC50 e IC20, respectivamente) foi estimada para cada inibidor (pesticida ou íon). Estes dados foram necessários para calcular a constante de inibição (K_i), utilizando a equação de Cheng e Prusoff (1973):

$$Ki = \frac{IC50}{1 + [S]/Km}$$

Em que [S] corresponde a concentração de substrato.

3. Resultados

A enzima AChE nos tecidos brânquiais e viscerais apresentou atividade específica de $15,6 \pm 0,0046$ e $10,5 \pm 0,0038$ mU/mg, respectivamente. Os parâmetros cinéticos, velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m), foram analisados utilizando o substrato iodeto de acetilcolina em diferentes concentrações (0,8 a 20,8 mM). A velocidade máxima (V_{max}) de hidrólise de acetiltiocolina encontrada em brânquias e vísceras para a *Crassostrea sp.* foi de 18.169 ± 0.52 mU/mg e 12.139 ± 0.31 mU/mg, respectivamente. O valor de K_m que representa a concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima da reação foi 0.502 ± 0.05 mM para as brânquias e 0.255 ± 0.04 mM para vísceras. Estes valores são comparados aos reportados na literatura para espécies de *Crassostrea sp.*, outros moluscos e de peixe (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de AChE em diferentes tecidos e espécies

Espécie	K_m (mM)	V_{max} (U/mg proteína)	Tecido	Referência
<i>Crassostrea sp.</i>	$0,255 \pm 0,04$	$1,21 \pm 0,31$	Vísceras	Presente estudo Presente estudo Monserrat et al. 2002
<i>Crassostrea sp.</i>	$0,502 \pm 0,05$	$1,81 \pm 0,52$	Brânquias	
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	$0,04 \pm 0,003$	$1,92 \pm 0,04$	Brânquias	
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	$3,08 \pm 0,604$	$1,62 \pm 1,07$	Músculo adutor	Domingos, 2007
<i>Aplysia californica</i>	$0,122 \pm 0,04$	-	Hemolinfa	Fite e Srivatsan, 2003
<i>Aplysia californica</i>	$0,2201 \pm 0,04$	-	Gânglio Central	Fite e Srivatsan, 2003
<i>Cerastoderma edule</i>	$5,57 \pm 2,68$	$2,54 \pm 0,48$	Músculo adutor	Nilin, 2012
<i>Cichla ocellaris</i>	0.769 ± 0.27	$0,189 \pm 0.04$	Cérebro	Silva, 2013
<i>R. canadum</i>	0.430 ± 0.14	243.2 ± 20.5	Cérebro	Assis, 2014

O pH ótimo encontrado para AChE de brânquias e vísceras em *Crassostrea sp.* foi de 8,0 e 8,5, respectivamente (Figura 1). Para a temperatura ótima é visto que a atividade da

enzima foi máxima em 70°C nas brânquias e 75°C no tecido visceral (Figura 2). A AChE nos dois tecidos mostrou-se termoestável até 100°C por 30 minutos (Figura 3).

Figura 1. Efeito de pH (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de *Crassostrea sp.*

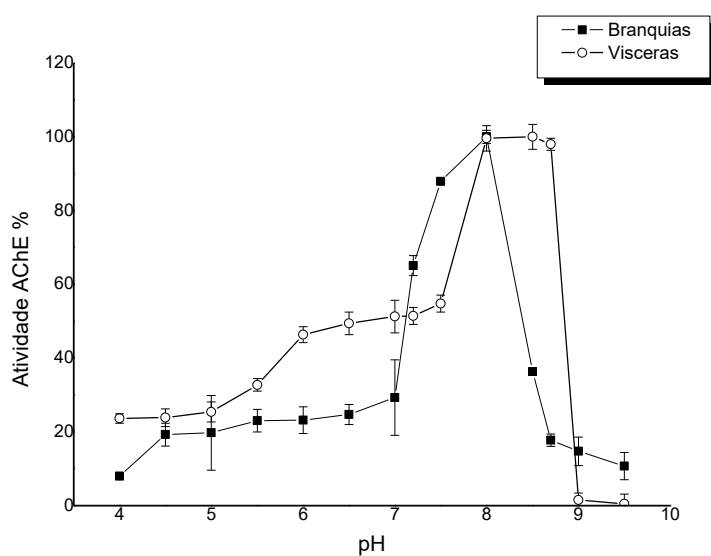


Figura 2. Temperatura ótima (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de *Crassostrea sp.*

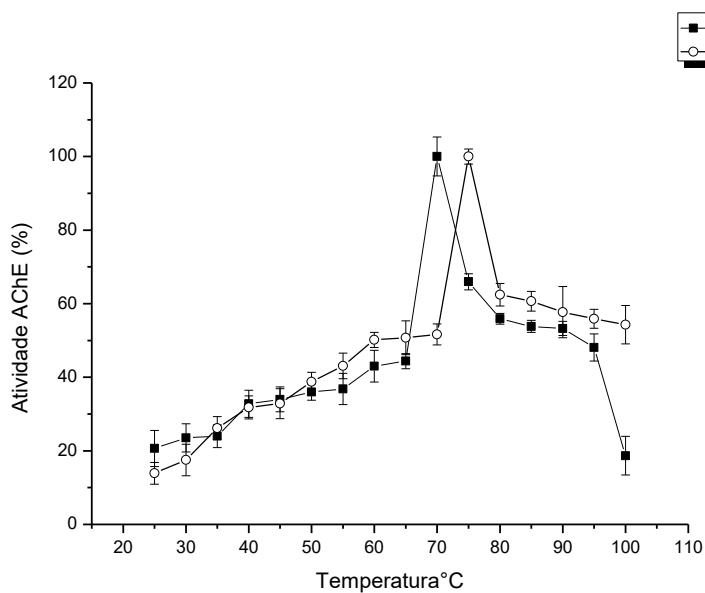
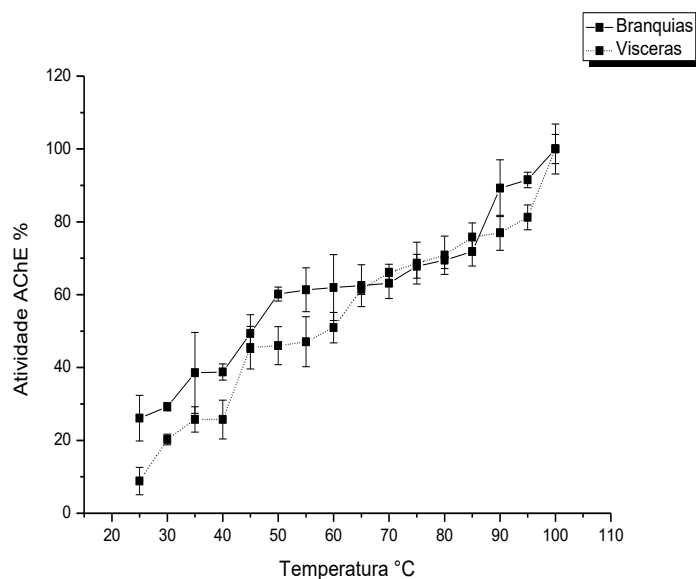


Figura 3. Estabilidade térmica (brânquias e vísceras) sobre a atividade de AChE de *Crassostrea sp.*



A atividade de AChE dos tecidos em estudo da *Crassostrea sp.* foi abruptamente reduzida na presença do inibidor seletivo Iso-OMPA, evidenciando a presença de BChE (Figura 4A e 4B) e BW284c51 confirmando a presença de AChE em brânquias e vísceras (Figura 4C e 4D). Inibição significativa também foi observada na presença dos inibidores de colinesterases totais neostigmina (Figura 4E e 4F) e eserina (Figura 4G e 4H). Os valores de IC₂₀ e da concentração inibitória média (IC₅₀) destes inibidores são apresentados na tabela 2.

Figura 4. Atividade da AChE em *Crassostrea sp.* em presença de concentrações crescentes (0-10 mM) dos inibidores seletivos: Iso-OMPA (A-Brânquias; B- Visceras); BW284c51 (C- Brânquias; D- Visceras); neostigmine (E- Brânquias; F- Visceras); eserine (G- Brânquias; H- Visceras).

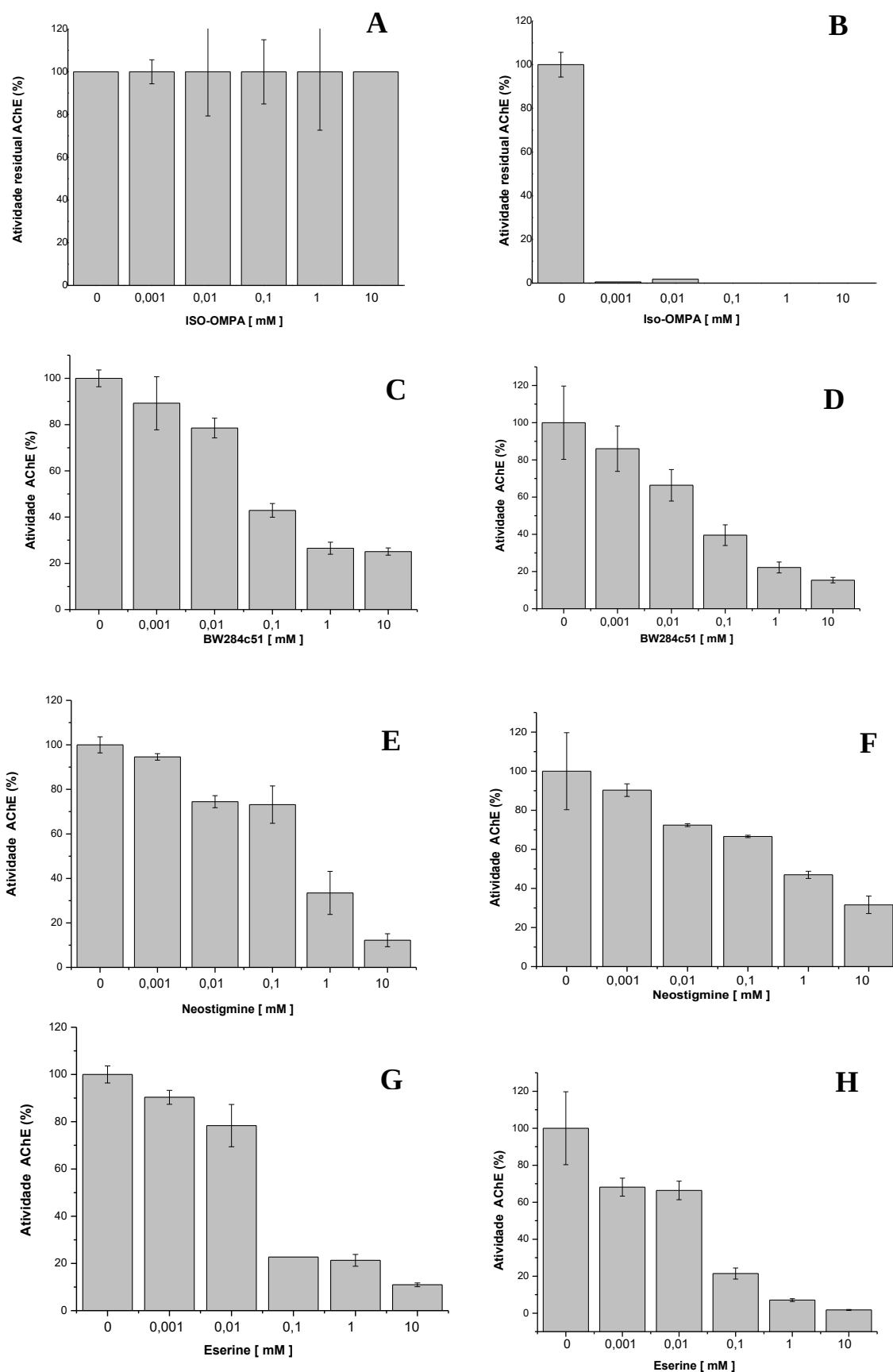


Tabela 2. Valores de IC 20 e IC 50 estimados para *Crassostrea sp.* na presença de inibidores seletivos.

Inibidor	Brânquias		Vísceras	
	IC20 (µM)	IC50 (µM)	IC20 (µM)	IC50 (µM)
BW284c51	8,5	61	0,8	13,8
Iso-OMPA	0,16	0,58	0,13	0,15
Neostigmine	8,5	317	5,7	732
Eserine	3,6	42	0,3	4,4

Três íons (Fe^{2+} , K^+ e Ca^{2+}) em AChE de vísceras não mostraram efeito inibitório na concentração de 0,1mM. Enquanto Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} e Al^{2+} inibiram a atividade nos dois tecidos de estudo, brânquias em 79%, 67%, 88%, 73%, 100%, 77% e 100% respectivamente. E nas vísceras em 85%, 100%, 100%, 41%, 65%, 100% e 59% quando submetidos a mesma concentração. Os valores de IC20, IC50 e Ki desses íons são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de IC₂₀, IC₅₀ e Ki estimados para AChE de *Crassostrea sp.* na presença de alguns íons metálicos.

Íons	Brânquias			Vísceras		
	IC20 (mM)	IC50 (mM)	Ki (mM)	IC20(mM)	IC50(mM)	Ki (µM)
Zn²⁺	0,00020	0,0012	$1,52 \times 10^{-5}$	0,00013	0,00029	$1,21 \times 10^{-6}$
Cu²⁺	0,00010	0,00012	$1,02 \times 10^{-6}$	0,00057	0,0057	$2,34 \times 10^{-5}$
Cd²⁺	0,001005	0,00118	$9,48 \times 10^{-6}$	0,000109	0,00015	$6,17 \times 10^{-7}$
Hg²⁺	0,0014	0,0015	$1,16 \times 10^{-5}$	0,0031	0,17	$7,00 \times 10^{-5}$
Mn²⁺	0,00019	0,00046	$3,71 \times 10^{-6}$	0,00036	0,00067	$2,78 \times 10^{-6}$
Ba²⁺	0,00016	0,00048	$3,93 \times 10^{-6}$	0,00010	0,00013	$5,37 \times 10^{-7}$
Al²⁺	0,00085	0,0010	$8,26 \times 10^{-6}$	0,00012	0,00016	$6,75 \times 10^{-7}$

Todos os pesticidas utilizados mostraram efeito inibitório sobre a atividade da acetilcolinesterase de brânquias e vísceras de *Crassostrea sp.* (Figura 6). Os valores da concentração inibitória média dos pesticidas (IC50) para brânquias e vísceras respectivamente, foram: 404 e 0,55 µM (diclorvos), 0,13 e 3,5 µM (carbaril), 155 e 0,41 µM (carbofuran). A Tabela 4 mostra além da constante de inibição (Ki) e IC50, o IC20 dos pesticidas em tecidos de *Crassostrea sp.*, considerando que 20% de inibição da AChE é o ponto a partir do qual se considera a presença de um agente anticolinesterásico na amostra. De acordo a FAO (2007), 20% de inibição da atividade colinesterásica é o ponto a partir do qual se considera a presença de um agente anticolinesterásico em uma amostra, seja ele um

pesticida ou não. Essa porcentagem pode ser considerada uma concentração prejudicial ao organismo, contudo sinais e sintomas aparecem acima de 50% de inibição e a morte ocorre após 90%.

Figura 6. Efeito de pesticidas carbamatos e organofosforados sobre a atividade de AChE em *Crassostrea sp.* Carbaril (A- Brânquias; B- Visceras); Carbofuran (C- Brânquias; D- Visceras); Diclorvos (E- Brânquias; F- Visceras).

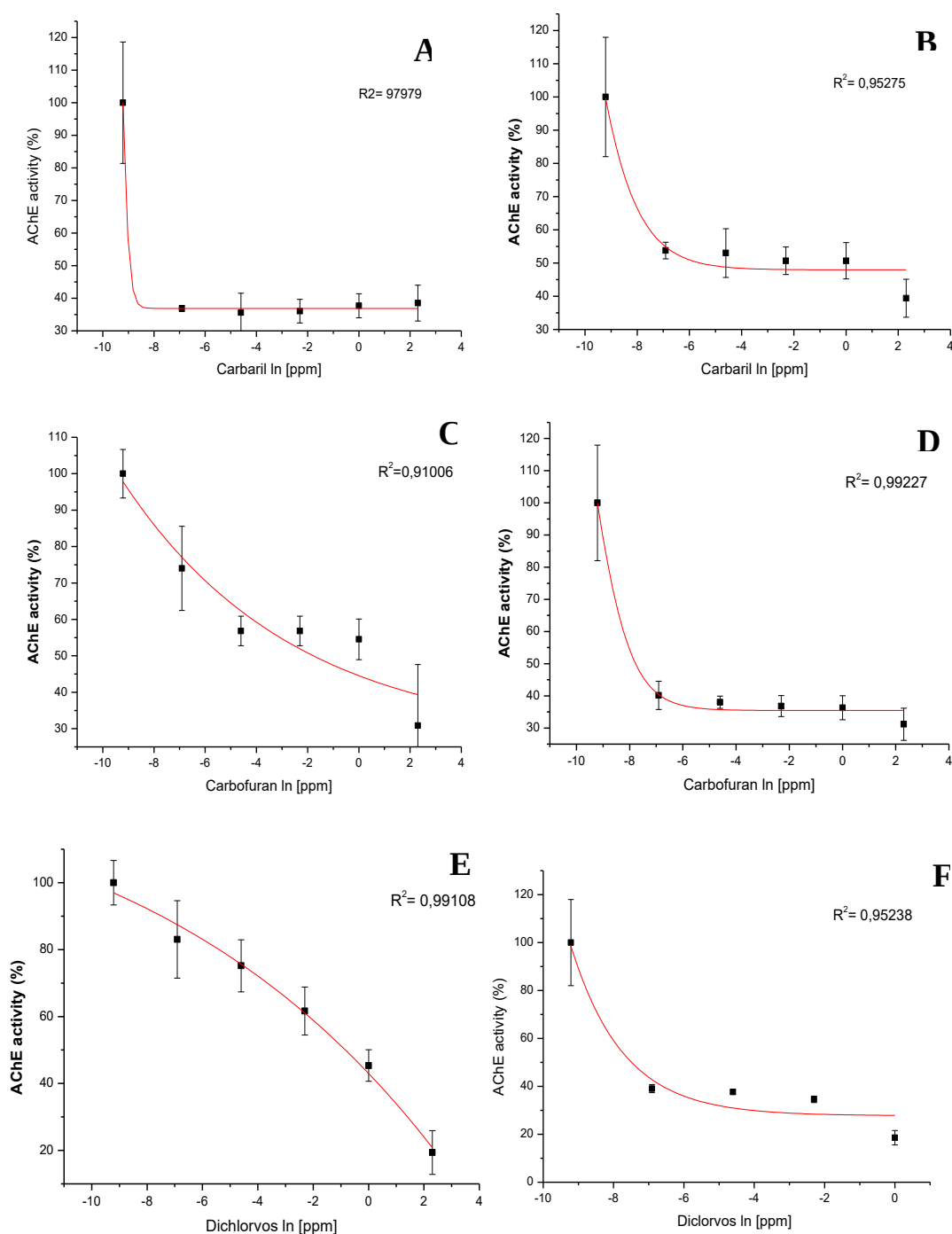


Tabela 4. Valores de IC20, IC50 e Ki estimados para *Crassostrea sp.* na presença de pesticidas organofosforado e carbamatos.

Pesticida	Brânquias			Visceras		
	IC20 (μ M)	IC50 (μ M)	Ki (μ M)	IC20(μ M)	IC50(μ M)	Ki (μ M)
Diclorvós	4,1	404	$3,2 \times 10^{-3}$	0,14	0,55	$2,25 \times 10^{-6}$
Carbofuran	0,63	155	$1,24 \times 10^{-3}$	0,15	0,41	$1,71 \times 10^{-6}$
Carbaril	0,10	0,13	$1,05 \times 10^{-6}$	0,17	3,5	$1,41 \times 10^{-5}$

4. Discussão

O uso de substrato e inibidor específico evidenciou a presença de AChE nos tecidos de brânquias e vísceras, e BChE em vísceras da *Crassostrea sp.* Estudos realizados por Monserrat et al, (2002) apontam para existência de duas isoformas (tipo A e B) de colinesterases extraídas com e sem detergente em brânquias de *Crassostrea sp.* Resultados semelhantes foram encontrados a partir de brânquias de ostra *C. gigas*, demonstrando que a colinesterase tipo B é insensível à inibição ISO-OMPA (Bocquené et al, 1997). No presente estudo também observamos ausência de inibição de colinesterase em brânquias pelo isso-OMPA em todas concentrações ensaiadas. Analisando a atividade da colinesteras em vísceras na presença desse inibidor notamos ISO-OMPA inibiu fortemente a atividade da enzima, mesmo a uma concentração de 0,001 mM, indicando que esta enzima pode ter mais de um perfil de inibição, sinalizando presença de expressiva de BChE em vísceras.

Monserrat et al, (2002) observou atividade aproximada de 2,1 mU/mg de AChE em homogeneizados de brânquias sem tratamento com o detergente Triton, e 5 U/mg para homogenatos com Triton. Os autores Fite e Srivatsan, (2003) em Ensaio de inibição usando BW284c51 em *Aplysia* identificou presença de AChE na hemolinfa e gânglio central, enquanto o inibidor isso-OMPA inibiu a atividade da enzima, mesmo em concentração de 1 mM indicando que esta enzima tem um perfil de inibição únic. Silva, (2004) também observou atividades aproximadas a 14,0 mU/mg em vísceras de *Crassostrea sp.* Neste estudo, a atividade de AChE em brânquias foi significativamente maior em relação às vísceras, fato que pode ser explicado pela maior inervação este órgão (Almeida, 2002). Dados na literatura relatam que grande variabilidade das características das colinesterases tem sido encontrada em diferentes espécies de moluscos e diferentes tecidos do mesmo organismo (Talesa et al., 2001; Bonacci et al., 2004; Cunha et al., 2007).

Estudo realizados por Chio et al. (2011) observaram que atividade ChE no músculo adutor da *Manila clam*, *R. philippinarum*, variou de 6,14 a 9 13,24 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Outros organismos (mexilhões e peixe) também demonstram grandes variações na atividade AChE (Galloway et al, 2002; Oliviera et al, 2007). A atividade de ChE nas amostras de organismos pode variar com fatores bióticos (classe ou espécie de bivalve ou Mexilhão, idade, tamanho, período reprodutivo, e as condições fisiológicas) e abióticos relacionados para o habitat (temperatura, pH, salinidade, etc) (Chio et al, 2011). Estudos anteriores indicaram que a variação nas atividades de AChE de mexilhões foi relacionada a diversos outros fatores, incluindo as diferenças de sexo, idade e tamanho (Varela e Augspurger, 1996, Fairbrother et al, 1989

Embora tenha sido evidenciada a presença de BChE nas vísceras de *Crassostrea sp.* o substrato acetilcolina foi hidrolisado com mais eficiência evidenciando a presença de AChE. Fato que pode ser observado através dos valores de K_m que foram de $(0.255 \pm 0.04 \text{ mM}$ em vísceras e $0.502 \pm 0.05 \text{ mM}$ brânquias); e $0,884 \pm 0,05 \text{ mM}$ para os substratos acetilcolina e butirilocolina, respectivamente. Estes valores estão próximos aos relatados em estudos anteriores para outras espécies de moluscos, peixes, conforme tabela 1.

Mas, por outro lado, é visto que a acetilcolinesterase encontrada em vísceras apresenta maior afinidade com o substrato acetilcolina, sendo que o k_m neste tecido foi de $0.255 \pm 0.04 \text{ mM}$ e o de brânquias $0.502 \pm 0.05 \text{ mM}$.

A atividade proteolítica máxima para AChE de brânquias e vísceras foi observada em pH 8,0 e 8,5 respectivamente. Este resultado foi semelhante ao encontrado para AChE em vários trabalhos feitos com peixes, bem como para *P. managuensis* (Araújo et al., 2016), *Cichla ocellaris* (Silva et al., 2013) e *Colossoma macropomum* (Assis et al., 2010) que obtiveram maior atividade proteolítica em pH 8,0. E em moluscos no trabalho de (Bocqné et al., 1990) em que *Mytilus edulis* e *Crassostrea gigas* o pH 8,5 foi o que obteve uma maior atividade enzimática. Também no trabalho de (Bocqné, 1990) o *Mytilus edulis* foi o molusco que apresentou uma temperatura ótima para a reação enzimática de aproximadamente 50°C.

Atualmente é comprovado que a AChE possui temperatura ótima de atuação entre 20 e 45°C e pH que oscila na faixa de 6,5 a 8,5 (Assis et al.,2014). Entretanto, a caracterização das propriedades físico-químicas da AChE é necessária uma vez que os tecidos podem conter várias esterases não – específicas que podem contribuir para a atividade medida, levando a falhas na avaliação e interpretação dos resultados, principalmente, em estudos ecotoxicológicos (Ferreira et al., 2010; Howcroft et al., 2011).

As temperaturas ótimas elevadas para a AChE de *Crassostrea sp.* pode ser atribuído pelo fato desses animais viverem em ambientes quentes. Diversos estudos indicam que os periódicos ciclos de exposição de moluscos bivalves ao ar seguido de re-submersão na água do mar, em virtude das oscilações nos níveis de maré, podem ser responsáveis por grandes variações na fisiologia destes animais (Steffani & Branchi, 2003). Logo, a região nordeste é bastante quente e as ostras ou ficam expostas ao sol nas raízes das árvores ou submersas em uma pequena quantidade de água, e em outros momentos, quando a maré está alta, a submersão pode estar em um nível maior de água. Nesta situação, as ostras vivem em um ambiente que varia bastante de temperatura. Isto justifica o fato de apresentarem também enzimas termoestáveis em altas temperaturas.

Sete (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} e Al^{2+}) dos onze íons avaliados neste trabalho apresentaram efeito inibitório na concentração de 0,1 mM nos tecidos branquiais e viscerais. A AChE dos dois tecidos apresentou sensibilidade relativamente acentuada a estes íons (Inibição $\geq 50\%$ em 0,1 mM) exceto Hg^{2+} na acetilcolinesterase de visceras. Cobre e zinco já são conhecidos como inibidores da AChE (Bocquené et al., (1990); Olson e Christensen, (1980); Tomlinson et al., (1980). Vários estudos têm mostrado a influência do zinco em muitos mecanismos celulares. Este cátion divalente é uma importante molécula envolvida na neurotransmissão Baranano et al., (2001); Smart et al., (2004) e a ativação de diferentes metaloenzimas, como zinco hidrolases (Henick and Fierke, 2005).

Vários relatos na literatura reportam inibição dos metais em espécies aquáticas tais como de 100% para *Electrophorus electricus* em Tomlinson et al. (1980) na presença de Zn^{2+} e Cu^{2+} ; 71% para *Arapaima gigas* frente a Hg^{2+} e 60% para *Electrophorus electricus* com o íon Ba^{2+} em (Assis, 2011). Entretanto na presença dos íons K^+ e Ca^{2+} na concentração de 1 mM, houve uma ativação da enzima, fato relatado também no trabalho de Assis (2011) em *Colossoma macropomum*.

Entre estes, os íons Mn^{2+} e Al^{2+} ; Cu^{2+} , Cd^{2+} e Ba^{2+} 0,1 mM inibiram 100% a atividade da colinesterase em estudo, de brânquias e vísceras, respectivamente. Segundo Jemec et al.(2007) alterações na atividade da AChE, quando exposta a concentrações de cobre, está relacionada a capacidade do metal em substituir o cofator da enzima, resultando na incapacidade de sua interação com o substrato, resultando em inibição significativa. Estudos indicam que os altos níveis de Mn podem ser tóxicos para os organismos terrestres e aquáticos, especialmente devido às suas propriedades neurotóxicas (Benedetto et al., 2009). O metal interfere na degradação da acetilcolina, importante neurotransmissor, o que resulta no

acúmulo do substrato nas sinapses. Esse evento provoca alterações motoras que podem culminar na morte do indivíduo (Vutukuru *et al.* 2006).

Neste trabalho, mais de 50% da AChE de *Crassostrea sp.* brânquias foi inibida frente ao íon Cu^{2+} em todas as concentrações da análise (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 Mm). Com isso pode-se afirmar que esta enzima é bastante sensível a ponto de ser inibida pelo íon cobre em uma concentração muito baixa, comprovando a eficiência da enzima AChE das brânquias de *Crassostrea sp.* em ser um biomarcador para este íon.

Dentre os pesticidas testados, o carbamato carbaril foi o que apresentou mais forte efeito inibitório na AChE branquial e o carbofuran na AChE visceral de *Crassostrea sp.* Inseticidas carbamatos são inibidores diretos da AChE por carbamilação do sítio ativo e não requerem biotransformação, de modo que eles podem induzir efeitos tóxicos agudo mais rápido do que a maioria dos compostos organofosforados (Tham *et al.*, 2009).

Ensaio de exposição 96h (*in vivo*) ao clorpirifós em ostra *C. corteziensi* demonstrou inibição da atividade da AChE, sendo as atividades residuais de 40% na presença de 80µg/ml e 18% em 160 µg/ml do pesticida, não houve mortalidade das ostras durante o ensaio de exposição, porém após 12h de ensaio observou-se o fechamento das valvas das ostras (Benitez-Trinidad *et al.*, 2014). Há relatos que sugerem que estas ostras são capazes de isolar-se a partir de um ambiente contaminado por fechar suas válvulas (Kramer *et al.*, 1989; Mersch *et al.*, 1993). Além disso, nos moluscos bivalves, o contato com os compostos tóxicos, provoca uma redução na atividade de filtração; Assim, isto pode reduzir o tempo de exposição (Van der Gaag *et al.*, 1990; Wrisberg *et al.*, 1992).

De acordo com Doran *et al.*, (2001), reduções significativas na atividade da AChE para o músculo adutor de mexilhão, *Amblema plicata*, foram demonstradas em um intervalo de concentração do pesticida organofosforado clorpirifós de 0,1-2,0 mg L⁻¹. Estudos realizados por Choi *et al.* (2011), relatam inibição por organofosforados semelhante no músculo adutor da clam Manila, *R. philippinarum*, cujo demonstraram reduções significativas na atividade da ChE (35-67%) com um intervalo de dose de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹ de clorpirifos, redução na atividade ChE de 20,8% após a exposição de 6-0,1 mg L⁻¹ ao pesticida diazinon. Os autores também observaram a inibição da ChE por toxicidade dependentes de quatro pesticidas diferentes. O aumento da inibição da atividade de ChE *R. philippinarum* durante a exposição a pesticidas ocorreu com aumento do tempo de exposição e aumento da concentração de pesticidas

Combinações de PO e outros contaminantes são altamente sinérgicas na sua capacidade para inibir a actividade da AChE (Bocquené *et al.*, 1995; Forget *et al.*, 1999).

Os valores de IC₂₀ e IC₅₀ dos pesticidas testados no presente estudo, para *Crassostrea sp.*, estão abaixo dos limites de tolerância recomendados em regulamento nacional e internacional.

A Resolução nº 20/1986 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) recomenda um limite máximo de resíduo para organofosforados de 10 µg/L (0,45 µM) para águas das classes 1 e 2; 100 µg/L (4,5 µM) para a classe 3. O USEPA National Primary Drinking Water Standards (1984) prevê um limite máximo de 0,04 mg/L (aproximadamente 1,8 µM) para o carbamato carbofuran e 3,15 µM de carbamato carbaril. Os resultados deste estudo mostram que *Crassostrea sp.* pode vir a apresentar efeitos deletérios significativos, devido a forte inibição da AChE em concentrações mais baixas do que as previstas em legislação vigente. Vale ressaltar que a contaminação subletal pode alterar significativamente vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos ao penetrarem nos órgãos destes animais.

5. Conclusão

O uso de substratos e inibidores evidenciou a presença de AChE em brânquias e vísceras de *Crassostrea sp.* Todos os pesticidas deste estudo mostraram efeito inibitório sobre a atividade da AChE nos dois tecidos de *Crassostrea sp.*, principalmente o carbamato carbaril na AChE de brânquias e carbofuran na AChE de vísceras. A maioria dos metais pesados demonstraram potencial para influenciar a atividade da AChE na concentração de 0,1 mM, principalmente o íon Cobre (Cu²⁺) na AChE de brânquias, podendo esta enzima ser um possível biomarcador para este íon.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- Araújo, M. C.; Assis, C. R. D.; Silva, L. C.; Machado, D. C.; Silva, K. C. C.; Lima, A. V. A.; Carvalho Jr., L. B.; Bezerra, R. S.; Oliveira, M. B. M. 2016. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. *Aquatic Toxicology*, Amsterdã, v. 177, p. 188-189.
- Assis, C.R.D., Bezerra, R.S., Carvalho Jr., L.B., 2011. Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. In: Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides in Modern World – Book 5*. Intech, Rijeka, Croatia.
- Assis, C.R.D., Castro, P.F., Amaral, I.P.G., Maciel Carvalho, E.V.M., Carvalho Jr., L.B., Bezerra, R.S., 2010. 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* 29, 2243–2248.
- Assis, C.R.D., Linhares, A.G., Oliveira, V.M., França, R.C.P., Santos, J.F., Marcuschi, M., Carvalho, E.V.M., Bezerra, R.S., Carvalho Jr, L.B., 2014. Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. *Fish Physiol Biochem*.
- Assis, C.R.D.; Castro, P.F.; Amaral, I.P.G.; Carvalho Jr, L.B., Bezerra, R.S. 2007. Effect of diclofos on the acetylcholinesterase of tambaqui (*Colossoma macropomum*) brain. v. 26, p. 1451–1453.
- Barañano, D.E, Ferris, C.D., Syder, S.H., 2001. Atypical neural messengers. *Trends in Neuroscience* 24, 99-106.
- Benedetto, A., Au, C., and Aschner, M., 2009. Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: Insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. *Chem. Rev.* v. 109, 4862–4884,
- Benitez-Trinidad, A.B; Bernal-Hernández, Y.Y; Moreno-Hernández, C.L; Medina-Díaz, I.M; Robledo-Marengo; M.L, Barrón-Vivanco; B.S, Domínguez-Ojeda, D.; Romero-Bañuelos, C.A; Girón-Pérez, M.I; Rojas-García, A.E, 2014 . Acetylcholinesterase inhibition and micronucleus frequency in oysters (*Crassostrea corteziensis*) exposed to chlorpyrifos. *Research report*. 11: 247-256.
- Bonacci S, Browne MA, Dissanayake A, Hagger JA, Corsi I, Focardi S, et al, 2004. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. *Mar Pollut Bull*; 49(5–6):445–55.
- Bocquene G, Roig A, Fournier D., 1997. Cholinesterases from common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Lett* 407(3):261–266.
- Bocquené, G., Bellanger, C., Cadiou, Y., Galgani, F., 1995. Joint action 1 of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* 4, 266- 279.

Casasbellas, M.A.C. Depuración de Moluscos, Xunta de Galicia, v. 18, p.60, 1991

Cheng, Y., Prusoff, W.H., 1973. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* 22, 3099–3108.

Choi, J.Y., Yu, J., Yang, D.B., Ra, K., Kim, K.T., Hong, G.H., Shin, K.H., 2011. Acetylthiocholine (ATC) - cleaving cholinesterase (ChE) activity as a potential biomarker of pesticide exposure in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, of Korea, *Marine Environmental Research*.

Cunha I, Mangas-Ramirez E, Guilhermino L., 2007. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). *Comp Biochem Physiol*, 145:648–57.

Domingos, V., Azevedo, M., Silva, M.D., 2007. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. / *Environmental Research*.105, 350–363.

Doran, W.J., Cope, W.G., Rada, R.G., Sandheinrich, M.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in the threeridge mussel (*Amblma plicata*) by chlorpyrifos: Implications for biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, 91-98.

FAO, Food and Agriculture Organization, 2007. Pesticides in Food Report 2007. FAO Plant Production and Protection Paper 191. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Fairbrother, A., Bennett, R. S., Bennett, J. K., 1989. Sequential sampling of plasma cholinesterase in mallards (*Anas platyrhynchos*) as an indicator of exposure to cholinesterase inhibitors. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 117-122.

Ferreira, N.G.C., Santos. M.J.G., Domingues, L., Calh a, C.F., Monteiro, M., Amorim, M.J., et al., 2010. Basal levels of Enzymatic biomarkers and energy reserves in *Porcellionides pruinosus*. *Soil Biol. Biochem.* 42 (12). 2128 -2136.

Forget, J., Pavillon, J. F., Beliaeff, B., Bocquen , G., 1999. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC_{50} values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (copepoda, harpactico da). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 912-918.

Hernandez,Y.Y, DIAZ, I. M., 2010. Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. *Ecotoxicology* 19:819–825.

Hernick, M., Fierke, C.A., 2005. Zinc hydrolases: the mechanisms of zinc-dependent deacetylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 433, 71-84.

Howcroft, C.F., Gravato, C., Amorim, M.J.B., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Biochemical characterization of cholinesterase in *Enchytraeus albidus* and assesment of in vivo and in vitro effects of different soil properties, copper and phenmedipham. *Ecotoxicology* 20 (1), 119-130.

Ibrahim, M. N. M. et al., 2010. A novel agricultural waste adsorbent for the removal of lead (II) ions from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, v. 182 n. 1-3, p. 377- 385, out.

Kramer, K.J.M.; Jenner, H.A.; De Zwart, D., 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia* 188/189: 433-443.

Marques SM, Antunes SC, Nunes B, Gonçalves F, Pereira R., 2011. Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pelophylax perezi*) inhabiting a deactivated uranium mine. *Ecotoxicology* 20:1315–1327.

MATOS, K.S. Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano / Karina Silvia Matos. – Lavras: UFLA, 2012. 148 p. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Mersch, J.; Beauvais, M.N; Nagel, P., 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mut. Res.* 371: 47-55.
 Monserrat, J.M; Bianchini, A.; Bainy, A.C, 2002. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Environ* 54(3–5):781–785

Nilin, J. Biomarcadores em *Cerastoderma edule* na avaliação da contaminação por mercúrio na ria de aveiro, Portugal. Tese, Fortaleza, 2012.

Nunes, B., Barbosa, A.R., Antunes, S.C., Gonçalves, F., 2014. 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.

Silva, A. Z. Avaliação de biomarcadores bioquímicos na ostrado-Mangue (*crassostrea rhizophorae*) (mollusca:bivalvia) exposta a óleo diesel em diferentes salinidades. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

Silva, K.C.C.; Assis, C. R. D.; Oliveira, V. M.; Carvalho JR, L. B.; Bezerra, R. S., 2013. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. *Aquatic Toxicology*, Amsterdã, v. 126, p. 191-197.

Smart, T.G., Hosie, A.M., Miller, P.S., 2004. Zn^{2+} ions: modulation of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist* 10, 432-442.

Talesa V, Romani R, Antognelli C, Giovannini E, Rosi G, 2001. Soluble and membrane-bound acetylcholinesterase in *Mytilus galloprovincialis* (Pelecypoda: Filibranchia) from the northern Adriatic sea. *Chem-Biol Interac*;134:151–66.

Tham, L.G., Perumal, N., Syed, M.A., Shamaan, N.A., Shukor, M.Y., 2009. Assessment of *Clarias batrachus* as a source of acetylcholinesterase (AChE) for the detection of insecticides. *Journal of Environmental Biology* 30, 135–138.

Van der Gaag M.A.; Gauthier, L.; Noordsij A.; Lévi, Y; Wrisberg, M.N.; 1990 Methods to measure genotoxins in wastewater: evaluation with in vivo and in vitro tests. In: Waters MD, *et al.* (eds), Genetic toxicology of complex mixtures, Plenum Press, New York, 6: 215-232.

Varela, V. M., Augspurger, T., 1996. Cholinesterase Activity as a Device for Biomonitoring U.S. Fish and Wildlife Service, Southeast Region, Atlanta, GA.

Vieira, R.H.S.F. Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado. São Paulo, Varela, 47p. 2004.

Wrisberg, M.N; Bilbo C.M, Spliid, H., 1992. Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. Ecotoxicol. Environ. Saf. 23: 191-205.

CAPÍTULO 3

Resposta de Biomarcadores bioquímicos a variações sazonais em três tecidos de ostra do mangue *Crassostrea sp.* extraída do Complexo estuarino canal de Santa Cruz, litoral norte de Pernambuco - Brasil.



**A ser submetido ao periódico Comparative
Biochemistry and Physiology, Part C
(ISSN: 1532-0456)**

Resposta de Biomarcadores bioquímicos a variações sazonais em três tecidos de ostra do mangue *Crassostrea sp.* extraída do Complexo estuarino canal de Santa Cruz, litoral norte de Pernambuco - Brasil.

Kelma Sirleide de Souza¹, Paula Rayane de Souza¹, Kaline Catiely Campos Silva ¹, Ricielly, Marlyete Chagas de Araújo¹, Juliet Fátima Xavier¹, Andreia Cybelly¹, Werlayne Mendes de Santana¹, Caio Rodrigo Dias Assis¹, Ranilson de Souza Bezerra¹

^aLaboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

Corresponding author:

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

email: ransoube@uol.com.br

Resumo

Respostas de biomarcadores bioquímicos foram avaliados em brânquias, vísceras e músculo adutor de ostra do mangue *Crassostrea sp.* coletadas no Complexo estuarino canal de Santa Cruz localizado no litoral de PE- Brasil e comparados com os mesmos tecidos de ostras depuradas. O estuário apresenta-se como um ecossistema poluído por receber descargas domésticas, industriais, e pesticidas de efluente agrícolas. A concentração de metais traços (Cr, Cd, Cu, Mn, Zn, Pb e Hg) na água depurada e do estuário, e nas partes moles, exceto Hg, da *Crassostrea sp.* foi avaliada. Níveis altos de metais foram encontrados na água durante o inverno, e na ostra maiores concentrações no verão. Parâmetro microbiológico indicaram presença superior a 1100 NMP/ml de coliformes fecais a 45°C. Os parâmetros físico-químicos indicaram valores maiores de temperatura, salinidade, condutividade e sólidos dissolvidos no verão, enquanto pH, OD, OD% foram maiores no inverno. A atividade da AChE em vísceras e brânquias foi significativamente menor que as ostras depuradas, resposta antagônica entre as estações foi observada nos três tecidos, onde a AChE do músculo adutor teve maior atividade no inverno em relação ao verão e ostras depuradas. No presente estudo foram observadas diferenças sazonais e respostas sinérgicas em todos os biomarcadores mensurados, nas atividades enzimáticas detoxificadoras (CAT e SOD), nos antioxidantes não enzimáticos GSH, GSSG, GSH/GSSG e peroxidação lipídica (nível de MDA), e enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, pepsina, amilase, leucioaminopeptidase e amino-peptidases), a concentração dos íons Cu e Pb, e a presença de coliformes fecais na água estuarina. Analisados em conjunto, os dados obtidos apontam para respostas de biomarcadores em ostras, indicando que esses organismos apresentaram indícios de neurotoxicidade ou de danos causados por estresse oxidativo a macromoléculas. Havendo a necessidade para futuro monitoramento dos efeitos biológicos de contaminantes em tais organismos e no ambiente estudado. Eles também apontam para a importância de considerar a sazonalidade, os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e como esses fatores que influenciam nas respostas de biomarcadores em programas de monitoramento de contaminação ambiental.

Palavras-chave: *Crassostrea sp.*, Biomarcadores, Biomonitoramento, Canal de Santa Cruz.

1. INTRODUÇÃO

Biomarcadores podem ser definidos como uma alteração biológica (variando desde respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas, até respostas no nível molecular) a qual pode estar relacionada à exposição ou ao efeito tóxico de produtos químicos xenobióticos presentes no ambiente (Everaarts et al., 1994; van der Oost et al., 2003). Entre os biomarcadores, os bioquímicos ou moleculares, detectam a primeira alteração biológica frente à presença de um xenobiótico (WALKER, 1996; WALKER *et al.*, 1998). Essas alterações moleculares podem nos fornecer informações antecipadas dos efeitos destas substâncias sobre os organismos.

Biomarcadores conseguem unir as abordagens química e biológica no monitoramento ambiental. Eles também permitem caracterizar quimicamente os poluentes e determinar suas concentrações no meio, podendo estimar o impacto causado pelos poluentes ao seu metabolismo (WATSON e MUTTI, 2003).

Dentre essas substâncias, as enzimas representam papel importante, pelo alto grau de especificidade e rapidez na resposta às alterações pertinentes às substâncias-alvo. O uso de enzimas como biomarcadores baseia-se na interferência negativa ou inibitória, causada pelas substâncias-alvo, em sua atividade catalítica (MARCO e BARCELÓ, 1996).

Atividade da colinesterase foi previamente utilizada como um biomarcador eficiente da contaminação em bivalves (Doran et al, 2001; Ventura et al, 2002; Valbonesi et al, 2003; Bonacci et al, 2004; Alves et al, 2006; Binelli et al, 2006; Ricciardi et al). A inibição da AChE está diretamente ligada com o mecanismo de ação do organofosforados (OP) e carbamatos que bloqueiam a ação desta enzima (Reigart e Roberts, 1999; Benitez-Trinidad et al., 2014). Os efeitos primários dos OP e carbamatos não se restringem às colinesterases: outras esterases podem ser inibidas, dentre elas as enzimas digestivas tripsina e quimotripsina (KAM et al., 1979; FISCHER, 1988; CASIDA e QUISTAD, 2004 e 2005).

Defesas antioxidantes são outros exemplos de biomarcadores bioquímicos elucidados para sinalizar a poluição devido a presença de radicais livres. As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas (catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase) e não-enzimáticas (pex. glutatona reduzida, ácido ascórbico, vitamina E e β caroteno) (Storey, 1996).

A observação das alterações na atividade das enzimas detoxificadoras aponta para outras vias de monitoramento através do estresse oxidativo gerado (PEÑA-LLOPIS et al., 2003; SUREDA et al., 2006), além de serem parâmetros de validação para os resultados obtidos com as colinesterases. (BOCQUENÈ et al., 1990; STURM et al., 1999; RODRÍGUEZ-FUENTES e GOLD-BOUCHOT, 2000; SCOTT e SLOMAN, 2004; RAO, 2006).

Quando a poluição provoca um desequilíbrio do estado redox da célula, danos em biomoléculas, tais como lípidos e proteínas, podem ocorrer pelo processo de lipoperoxidação (LPO) (Sies & Stahl,

1992). Desse modo, a determinação LPO tem sido também muito usada para expressar situação de estresse oxidativo em invertebrados (Montserrat et al., 2003).

Espécies sentinelas, como ostra do mangue *Crassostrea sp.*, produzem essas substâncias conhecidas como biomarcadores, e devido a sua capacidade de acumular concentrações elevadas de metais, compostos orgânicos e ainda sobreviver em ambientes contaminados, podem indicar as flutuações de metais e traço e outros poluentes disponíveis em água e sedimento (VIARENGO & Nott, 1993; Rainbow, 1995).

Desse modo, o presente estudo objetivou avaliar a resposta dos biomarcadores bioquímicos (CAT, SOD, GSH, GSSG, RAZÃO GSH/ GSSG, LPO, ChEs e enzima digestivas) em três tecidos (brânquias, vísceras e musculo adutor) de ostras do mangue *Crassostrea sp.* e sua relação com o impacto das atividades antrópicas no estuário Canal de Santa de Cruz.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Locais da amostragem

Foram amostrados espécimes ($n = 60$) de ostra *Crassostrea sp.* De ambos os sexos ($5,389 \pm 0,461$ cm; $1,90 \pm 0,229$ g) no período do seco (março/2015) e chuvoso (julho/2015) no complexo estuarino Canal de Santa Cruz, localizado no litoral Norte de Pernambuco, e para fins comparativos, os espécimes controle foram coletados na Depuradora em Coruripe – AL, onde as ostras foram climatizadas e inseridas em tanques com água para o processo de depuração durante 48 horas.

O Canal de Santa Cruz é um braço de mar que separa a Ilha de Itamaracá do continente, estando localizado no litoral norte de Pernambuco ($7^{\circ}34'00''$, $7^{\circ}55'16''$ S e $34^{\circ}48'48''$, $34^{\circ}52'24''$ W) (Figura 1). O Canal de Santa Cruz possui uma extensão de 22 Km e larguras variáveis de 0,6 a 1,5 Km. Nas baixas marés a profundidade varia de 4 a 5 metros, chegando até ser inferior a 2 metros; o referido Canal se comunica com o mar ao norte, pela Barra de Catuama e, ao Sul, pela Barra Sul ou Orange, podendo alcançar até 10 metros de profundidade nesses locais de comunicação. Segundo Macêdo (1974) e Flores-Montes *et al* (1998), o Canal recebe influência continental através de vários rios, sendo os principais: Catuama, Carrapicho, Botafogo e Congo na parte Norte e Igarassu e Paripe, ao Sul; sendo que a bacia hidrográfica abrange cerca de 730 Km². (Figura 1).

Figura 1. Localização geográfica do Complexo estuarino Canal de Santa (Pernambuco, Brasil).



Fonte: Google maps.

2.2. Análise dos parâmetros físico-químicos

2.2.1. Análise de Metais

Os íons metálicos contaminantes, (Cádmio (Cd^{2+}), Cromo (Cr^{3+}), Cobre (Cu^{2+}), Ferro (Fe^{2+}), Mercúrio (Hg^{2+}), Chumbo (Pb^{2+}), Manganês (Mn^{2+}) e Zinco (Zn^{2+}) foram quantificados na amostra de água e no tecido visceral da ostra *Crassostrea sp.* A análise do Hg^{2+} foi realizada no Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP) de acordo com o método Absorção Atômica por Vapor Frio 3112B do Standart Methods Apha, (1998). A quantificação dos demais íons supracitados foi feita no Laboratório de Análises Minerais Solos e Água (LAMSA) no Departamento de Engenharia Química da UFPE, utilizando Espectrofotometria de Absorção Atômica (Aparelho CG AA 7000 BC), a metodologia usada foi Standard Methods for Examination of Water and Wastewater Apha, (1998).

As concentrações de metais mensuradas na água foram comparadas com valores de referência para água salobra (impacto humano mínimo ou "classe 1" de acordo com a legislação CONAMA Resolução 357/2005, CONAMA – 2005) e valores de referência para água de consumo humano de acordo com o ministério da saúde pela Portaria nº 2914/2011 do MS - 2011).

2.2.2. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$), Sólidos Dissolvidos (mg/L), O_2 (mgO_2/L) /L), OD% (Salinidade (mg/L), Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$) e pH foram mensurados utilizando multiparâmetro.

2.3. Extração enzimática

As ostras *Crassostrea sp.* foram sacrificadas num banho de gelo (0°C). Os tecidos brânquias, vísceras e músculo posterior foram removidos imediatamente, reunidas e homogeneizadas (disruptor de tecido IKA RW 20-digitais, Staufen, Alemanha) em tampão de 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, até atingir a concentração de 200 mg de tecido por mL de tampão. Os homogeneizados foram centrifugados durante 15 min a $1000 \times g$ (4°C) e os sobrenadantes (extratos em bruto) foram congelados a -20°C para mais ensaios. Durante a homogeneização do músculo adutor posterior foi adicionado 3% de Triton X-100 com o objetivo de extrair ChEs das na membrana celular.

2.4. Determinação da atividade ChEs

A atividade enzimática foi realizada de acordo com Assis et al. (2010). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 μmol de substrato por minuto. Os brancos foram preparados substituindo as amostras de extrato bruto por tampão.

2.5. Atividade total de Superóxido dismutase (t - SOD)

Avaliação da atividade enzimática SOD total (T-SOD) foi realizada de acordo com Misra e Fridovich, (1972) a 25°C . Foram medidos alterações na absorbância por 15 segundos para um total de 2 min, a 480nm . Uma unidade de t-SOD foi definida como a quantidade de enzima que provoca 50% de inibição da oxidação de epinefrina. A atividade enzimática da t-SOD no tecido foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U/mg).

2.6. Atividade da Catalase (CAT)

A atividade de CAT foi medida de acordo com Aebi (1984). A taxa constante k de decomposição de H_2O_2 sob condições experimentais de temperatura ($\sim 22^{\circ}\text{C}$) e pH (7,0) foi determinado como sendo 2,3, medindo as alterações absorbância por 10 segundos, durante 1,5 min a 240nm . A atividade enzimática também foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U / mg de proteína).

2.7. Níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Níveis de GSH foram analisados de acordo com método de HISSIN e HILF (1976). A leitura foi feita num espectrofluorímetro utilizando um comprimento de onda de 350nm. Os resultados foram expressos em μmol por mg de proteína com referência a uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de GSH.

2.8. Níveis de glutathiona oxidada (GSSG)

Os níveis de GSH foram analisados de acordo com o método HISSIN E HILF (1976). Esta mistura foi incubada durante 15 min. à temperatura ambiente e protegida da luz. A leitura foi feita num espectrofluorímetro utilizando um comprimento de onda 350nm de Emissão. Os resultados foram expressos em μmol /mg de proteína com a referência uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de GSSG.

2.9. Quantificação da Peroxidação lipídica (LPO)

A LP foi medida por meio da estimativa de níveis de malondialdeído (MDA) usando um ácido tiobarbitúrico (TBA) reação (método TBARS) de acordo com Ohkawa et ai. (1979). Na reação teste TBARS, MDA ou substâncias como MDA e TBA reagem para produzir um pigmento rosa com absorção máxima em 532nm. Os resultados foram expressos como nmol por mg de proteína utilizando uma curva padrão gerada usando concentrações diferentes solução propano 1,1,3,3-tetrametoxi. Como controle positivo, amostras de brânquias, vísceras e músculo adutor posterior foram incubadas numa solução de 30 μM nitroprussiato de sódio (SNP) durante 45 min antes do ensaio.

2.10. Atividade das enzimas digestivas

2.10.1. Atividade de Pepsina

Atividade foi realizado de acordo Pavlisko et ai. (1997) utilizando 2,0% (w / v) de hemoglobina (preparado em 0,1 M de glicina-HCl, pH 2,5) como substrato específico. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar a hemoglobina para produzir uma mudança de 0,001 unidade de absorbância por minuto.

2.10.2. Atividade da Amilase

A atividade da amilase foi avaliada de acordo com a metodologia do Bernfeld (1955) utilizando 2% (w / v) de amido como substrato. A absorbância a 570 nm foi medida com um leitor de microplacas. Um ensaio em branco foi preparado, no qual a amostra foi substituída por água destilada. A atividade enzimática foi expressa em microgramas de maltose liberado por minuto por miligrama de proteína.

2.10.3. Atividade de Proteases específicas

As atividades enzimáticas de tripsina, quimotripsina e leucina-aminopeptidase, foram determinados em microplacas com o uso de Na-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), succinil proline fenilalanina alanina aminotransferase p-nitroanilide (SAPNA) e p-nitroanilide-leucina (Leu-p-NaN) como substratos específicos, respectivamente (Bezerra et al., 2005). Estes substratos foram dissolvidos em sulfóxido de dimetilo (DMSO) a uma concentração final de 8 mM. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os extratos enzimáticos (30 µl) foram incubados com 140 µl de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, e 30 µl de substrato por um período de 15 minutos. Logo depois, as leituras de absorbância foram medidas utilizando um leitor de microplacas. O comprimento de onda usado nas medições foi de 405 nm. Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um mol de p-nitroanilina por minuto. A atividade específica foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U/mg).

2.10.4. Determinação das proteínas totais

O teor de proteína foi estimado de acordo com Bradford et. al (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

2.11. Análise estatística

Na análise das enzimas detoxificadoras todos os conjuntos de dados são expressos como médias e $\pm$ desvio padrão (SD). Todos os grupos foram testados quanto à normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov, e apresentaram uma distribuição normal. Por conseguinte, a significância estatística foi avaliada com o teste t pareado ou ANOVA seguido de pós teste de Newman-Keuls, utilizando o software GraphPad Prism Versão 5.0 para Windows (San Diego, CA, EUA). Os dados das atividades das demais enzimas foram analisados utilizando uma análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativa quando $P < 0,05$, utilizando o programa Microcal™ Origin™ versão 8.0 (Software, Inc, EUA).

3. RESULTADOS

Análise dos parâmetros físico-químicos da água

A temperatura, condutividade, sólido dissolvido na água do complexo estuarino canal de Santa Cruz foram mais altos no verão, enquanto, oxigênio dissolvido, porcentagem de oxigênio e pH foram maiores no inverno. Estes parâmetros da água do canal de Santa Cruz tiveram valores, na estação seca e chuvosa, superiores aos obtidos da água controle (depuradora). Valores de pH ligeiramente maior e menor para o estuário canal de Santa Cruz foi identificado no inverno e verão respectivamente, quando comparados com a água da depuradora (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas na Depuradora e no Estuário Canal de Santa Cruz no seco e chuvoso de 2015. O estuário está situado Vila Velha - Itamaracá, PE, Brasil.

Parâmetro físico -químico	Controle Depuradora	ESTAÇÃO	
		Seca	Chuvosa
Temperatura °C	28,91	29,29	27,40
Condutividade (mS/cm)	46,59	57,03	52,92
DDS (mg/L)	28,19	34,26	33,01
Salinidade (mg/L)	27,84	34,63	33,26
OD%	95,1	97,33	112,86
O (mgO ₂ /L)	6,2	6,14	7,39
pH	8	7,8	8,1

Metais pesados na água

A partir da análise de metais pesados disponibilizados pelo Laboratório do ITEP e LAMSA (Tab. 2) e sua comparação com os índices propostos como aceitáveis pela resolução CONAMA 357/2005 para um ambiente de água salobra de Classe 1, e a Portaria 2914/2011 do MS para água de consumo humano, as análises de metais na água coletada no inverno revelaram concentrações de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) superiores ao estabelecido. Os demais metais apresentaram limites favoráveis pela legislação. Os limites do metal Cr não são definidos pelas legislações citadas anteriormente, sendo necessário comparar seus valores estabelecidos nessa pesquisa como outros trabalhos.

Tabela 2. Análise de íons na água da Depuradora e do Estuário Canal de Santa Cruz.

Metais pesados (Água)	Depuradora	Estação		CONAMA VMP**	MS VMP***
		Seca	Chuvosa		
Manganês	ND*	ND	ND	0,1	0,1
Chumbo	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01
Zinco	ND	ND	ND	0,09	5
Ferro	ND	0,01	< 0,05	0,3	0,3
Cobre	ND	ND	ND	0,005	2
Mercúrio	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,0002	0,001
Cádmio	ND	ND	0,01	0,005	0,005
Cromo	ND	ND	ND	0,05	-

*ND (Não detectável), **VMP (mg/L) = valor máximo permitido para ambientes lóticos (Resolução CONAMA 357/2005, estabelecido para águas salobras classe 1). MS = Ministério da saúde, ***VMP (mg/L) = valor máximo permitido para água destinada ao consumo humano (Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde).

A Tabela 3 apresenta as concentrações de metais encontradas no tecido visceral da ostra *Crassostrea sp.* capturadas no estuário e depuradora durante as estações seca (verão) e chuvosa (inverno). Nas estações estudadas os resultados mostraram diferenças entre as estações, nas concentrações acumuladas de cada um dos metais evidenciados na ostra, observamos que eles variaram sazonalmente, demonstrando diferentes padrões de biodisponibilidade. Ostras do canal de Santa Cruz da estação chuvosa (inverno) tiveram as mais altas das concentrações de Mn, Pb, Zn, Cd, Fe e Cr acumulados, e ostras da estação seca (verão) apresentaram as maiores concentrações de Cu. As ostras da depuradora apresentaram maior biodisponibilidade para os metais Pb, Zn e Fe, e menores para os metais Mg, Cu, Cd e Cr, quando comparados com as ostras coletadas do estuário nas estações seca e chuvosa.

Tabela 3. Análise de metais pesados no tecido visceral de *Crassostrea sp.* depuradas e do estuário Canal de Santa Cruz.

Metais pesados	Depuradora	Estação		ANVISA VMP**	MS VMP***
		Seca	Chuvosa		
Manganês	1,79	5,39	4,53	-	0,1
Chumbo	0,61	0,42	0,37	1,5	0,01
Zinco	814,88	140,83	67,31	-	5
Ferro	136,20	74,81	68,43	-	0,3
Cobre	1,01	3,51	5,03	-	2
Mercúrio	NA	NA	NA	0,5	0,001
Cádmio	0,02	0,05	0,04	2,0	0,005
Cromo	0,02	3,56	0,87	-	-

*NA (Não analisado). **VMP (mg/Kg) = valor máximo permitido de contaminantes inorgânico em alimentos (Resolução ANVISA RDC Nº42/2013, estabelecido para moluscos bivalves). MS = Ministério da saúde, ***VMP

(mg/L) = valor máximo permitido para água destinada ao consumo humano (Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde).

A análise microbiológica da água do complexo estuarino canal de Santa Cruz comprovou a presença de coliformes fecais a 45°C (termotolerante), os para água estuarina apresentou valor fora do espectro aceito pela legislação em todos os pontos amostrais, durante as coletas realizadas (Tab. 4).

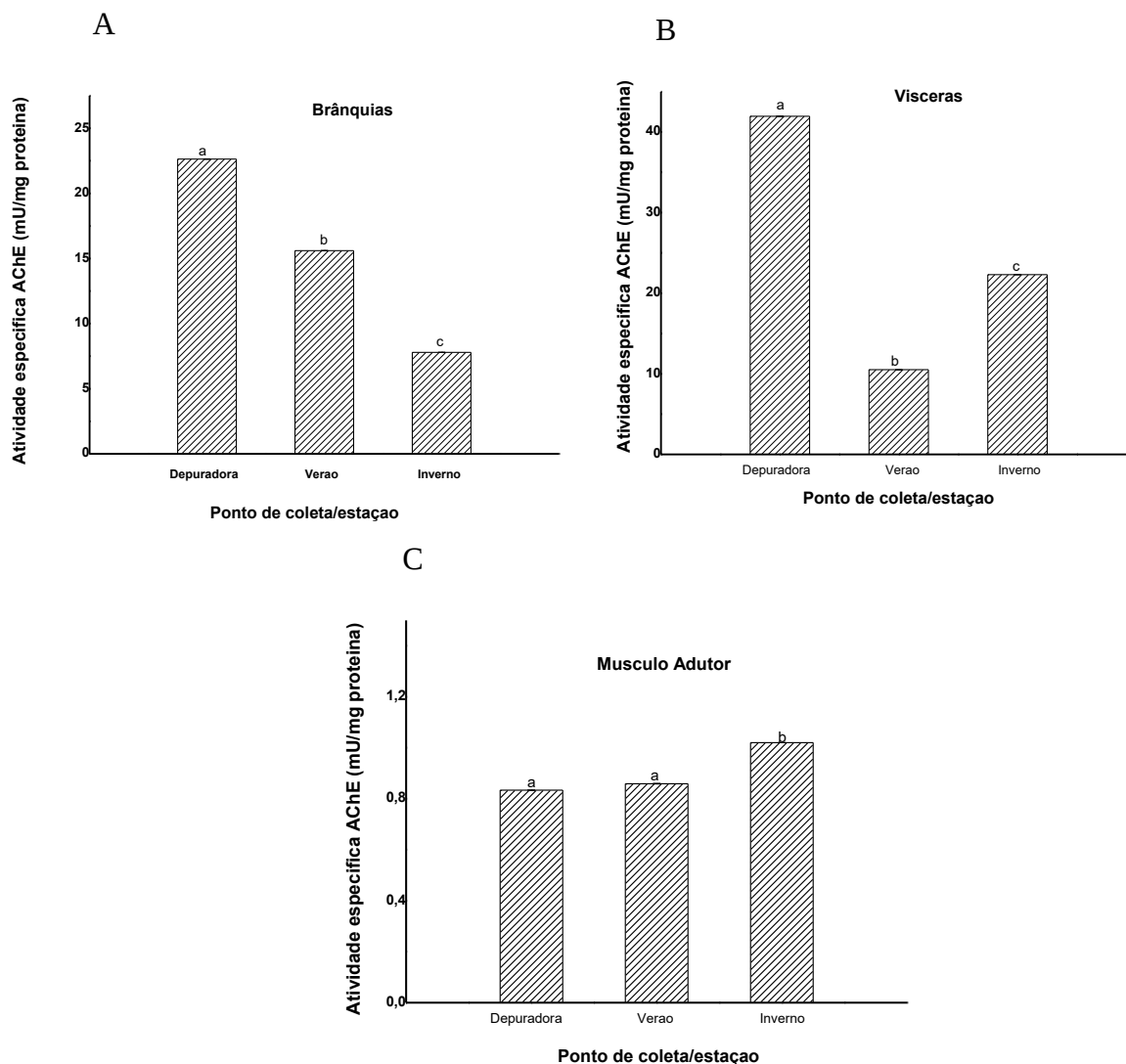
Tabela 4. Análise microbiológica da água da Depuradora e do estuário Canal de Santa Cruz, no estado de PE, Brasil nas estações seca e chuvosa.

Microrganismos	Controle Depuradora	ESTAÇÃO	
		Estação seca	Estação chuvosa
Coliformes a 45°C(NMP/ml)	(-)	>1100	>1100
<i>Salmonella sp.</i> 25/g	(-)	(-)	(-)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (UFC/mg)	(-)	(-)	(-)
<i>Estafilococcus coagulase</i> + (UFC/mg)	<10,0	<10,0	<10,0

NMP = Número mais provável. UFC = Unidade formador de colônia. (-) Ausência.

Com base na hidrólise do substrato iodeto de acetilcolina 62 mM, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) de brânquias, vísceras e músculo adutor de ostra coletadas no estuário canal de Santa Cruz na estação seca foi significativamente menor que as das ostras depuradas, enquanto as atividades da coleta da estação chuvosa foram significativamente menores para os tecidos viscerais e brânquiais, e maior para o músculo adutor. Valores da atividade da AChE dos três tecidos variou sazonalmente, apresentando diferenças significativas entre as estações, sendo significativamente menor na estação seca para vísceras e músculo adutor, e menor na estação chuvosa para brânquias (Fig. 2).

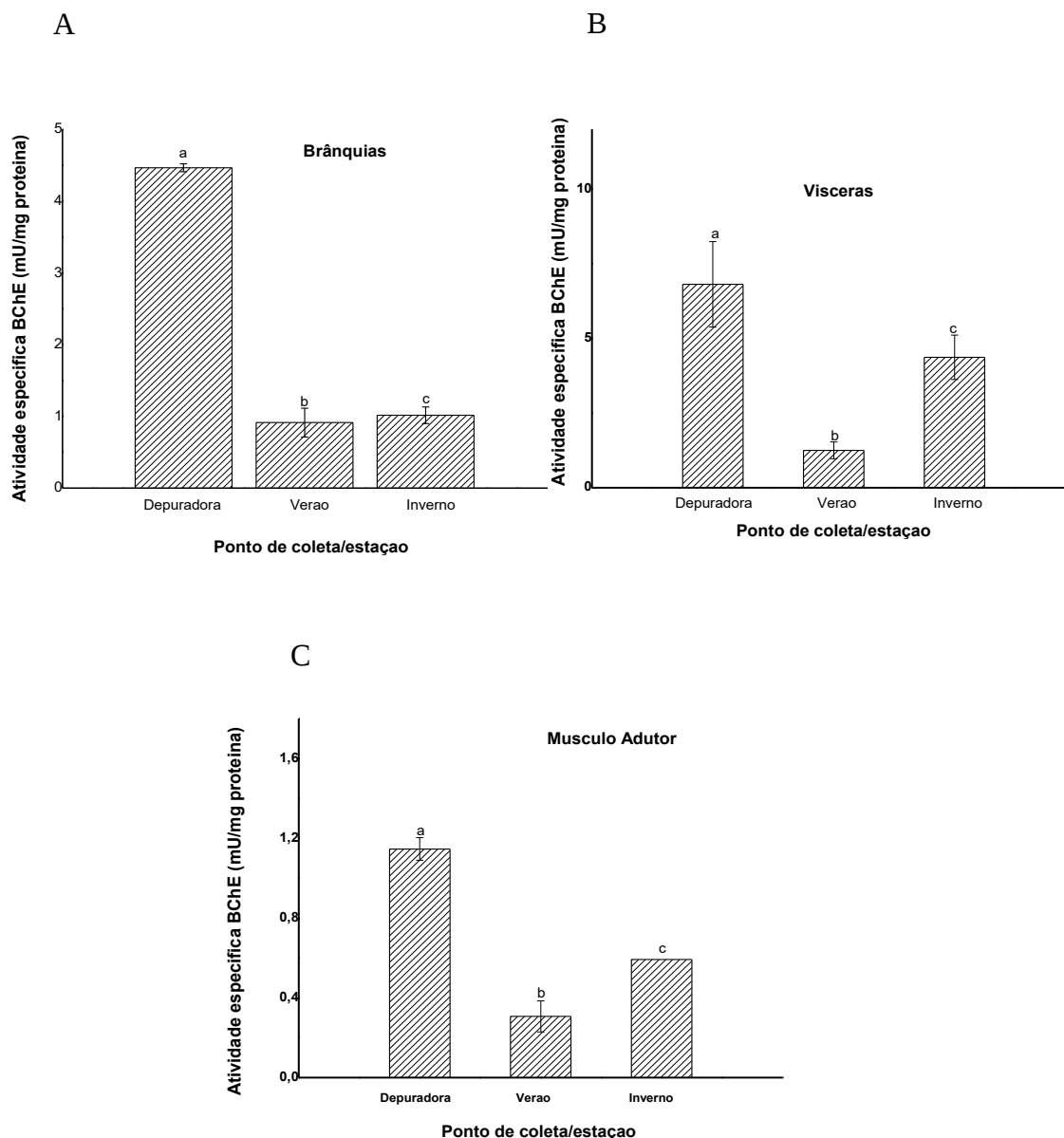
Figura 2. Atividade de Acetilcolinesterase em brânquias (a), vísceras (b) e músculo adutor posterior (c) de espécimes ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL) e espécimes no Complexo estuarino canal de Santa Cruz, PE nas estações seca (verão) e chuvosa (inverno).



Os valores estão expressos como medias. a, b c = representam diferenças sazonais significativas entre as atividades mensuradas nos tecidos iguais, e o controle. ^{a,b,c} $p < 0,05$.

Com base na hidrólise do substrato iodeto de butirilcolina 62 mM, a atividade da butirilcolinesterase (BChE) de brânquias, vísceras e músculo adutor de ostra coletadas no estuário canal de Santa Cruz na estação seca e chuvosa, tiveram estatisticamente significância menor que as ostras depuradas. Em relação a sazonalidade, houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de BChE nos três tecidos entre as estações, sendo a atividade de BChE menor na estação seca (Figura 3).

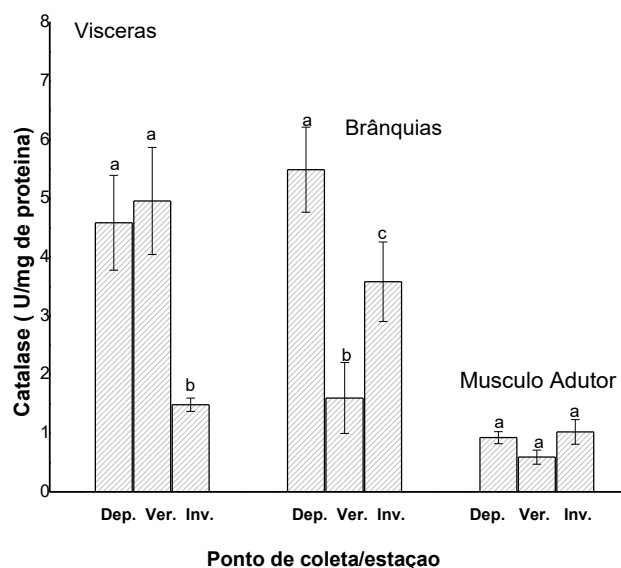
Figura 3. Atividade de Butirilcolinesterase em brânquias (a), vísceras (b) e músculo adutor posterior (c) de ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletadas no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca (verão) e chuvosa (inverno).



Os valores estão expressos como medias. a, b e c = representam diferenças sazonais significativas entre as atividades mensuradas nos tecidos iguais, e o controle. ^{a,b,c} $p < 0,05$.

As mudanças sazonais nos biomarcadores foram observadas em dois tecidos, vísceras e brânquias, das ostras do canal de Santa Cruz. As ostras coletadas na estação seca mostraram atividade de CAT significativamente maior que aquelas da estação chuvosa, nas vísceras e nenhuma diferença significativas em relação as ostras depuradas. No entanto, o nível de CAT em brânquias de ostras do estuário apresentou aumento significativo na estação chuvosa em relação aqueles da estação seca, que mostrou uma diminuição significativa na atividade da CAT, quando comparada as das ostras depuradas. A atividade da CAT no músculo adutor das ostras do estuário não apresentou diferença estatística significativa entre as estações e depuradora (Fig. 4).

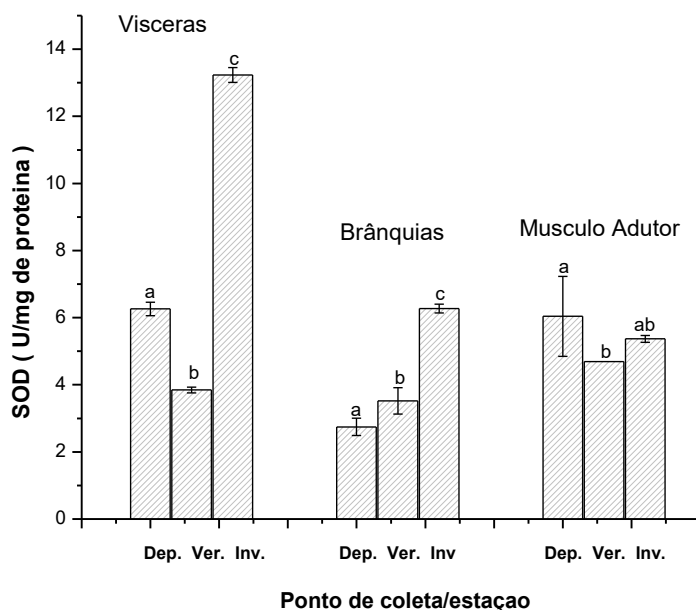
Figura 4. Atividade de catalase (Cat) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca (verão) e chuvosa (inverno).



Os valores estão expressos como medias. a, b c = representam diferenças significativas entre as estações, e entre estações e o controle. ^{a,b,c} $p < 0,05$.

Os resultados dos níveis de SOD medidos nas brânquias e vísceras em ostras coletadas no estuário durante a estação seca, chuvosa e depuradora estão resumidos na Fig. 5. Houve aumento significativo entre as estações nos níveis de SOD, onde tanto brânquias como vísceras apresentaram maior atividade da SOD na estação chuvosa. As atividades da SOD das brânquias nas duas estações foram significativamente maior que as ostras depuradas, enquanto as vísceras mostraram resposta antagônica aumentando na estação chuvosa e diminuindo na estação seca, em relação as ostras depuradas. No músculo adutor não foi observado diferença estatística na atividade de SOD entre as estações, apenas entre estação seca e depuradora.

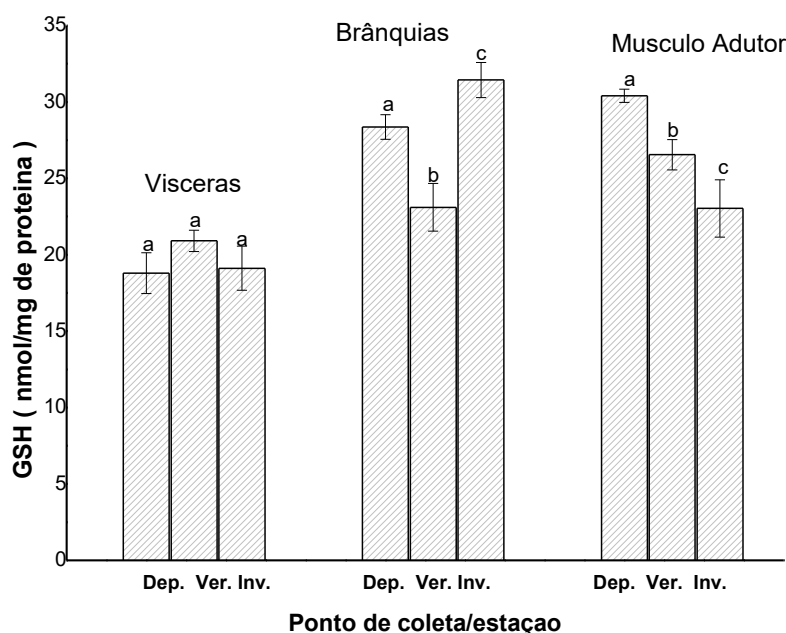
Figura 5. Atividade de Superóxido dismutase (SOD) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Compelxo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca (verão) e chuvosa (inverno).



Os valores estão expressos como medias. a, b c = representam diferenças sazonais significativas entre as atividades mensuradas nos tecidos iguais, e o controle. ^{a,b,c} $p < 0,05$.

Houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de glutathiona oxidada (GSSG) de vísceras e brânquias entre as estações e depuradora. Em vísceras, durante a estação seca, os níveis de GSSG foi maior que na estação chuvosa e depuradora; enquanto em brânquias uma resposta sazonal contrária foi observada, isto é, os níveis de GSSG foram significativamente menores em ostras da estação seca do que na estação chuvosa. Os níveis de GSSG em brânquias e músculo adutor foram menores nas duas estações quando comparadas a ostra depurada. No músculo adutor, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de GSSG entre as estações, enquanto o contrário observamos na depuradora (Fig. 6).

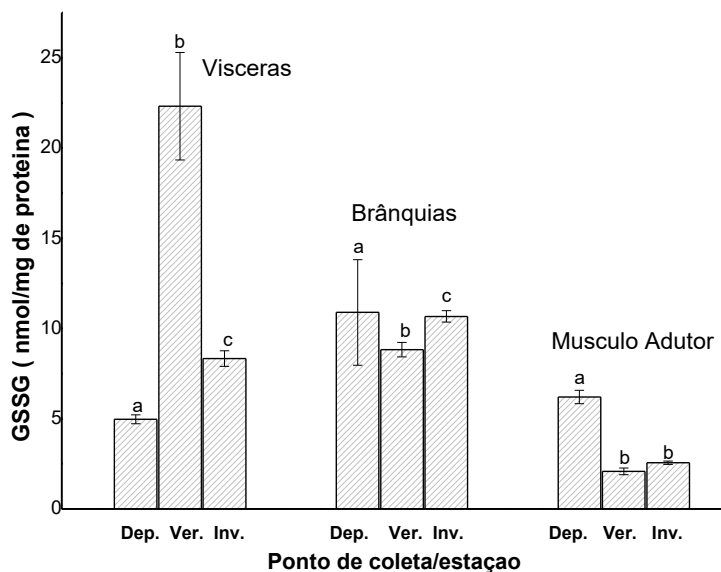
Figura 6. Atividade de Glutathiona oxidada (GSSG) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Compelxo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca (verão) e chuvosa (inverno).



Os valores estão expressos como medias. a, b c = representam diferenças sazonais significativas entre as atividades mensuradas nos tecidos iguais, e o controle.^{a,b,c} $p < 0,05$.

Em ostras da região estuarina (Canal de Santa Cruz), as respostas relacionadas com a poluição nos níveis de GSH foram observadas na estação seca e chuvosa para brânquias e músculo adutor, ambos com diferenças estatísticas significantes (Fig. 7). Atividade de GSH em brânquias da estação seca foi significativamente menor que na estação chuvosa, e maior nas ostras depuradas. No entanto, uma resposta sazonal inversa no músculo adutor foi observada, ou seja, observou-se um nível de GSH significativamente menor em ostras da estação chuvosa que na estação seca. Comparando as atividades de GSH das duas estações com a depuradora, observamos que nas brânquias o nível de GSH na estação chuvosa foi menor que as ostras depuradas, enquanto no músculo adutor a atividade de GSH das duas estações foi significativamente menor.

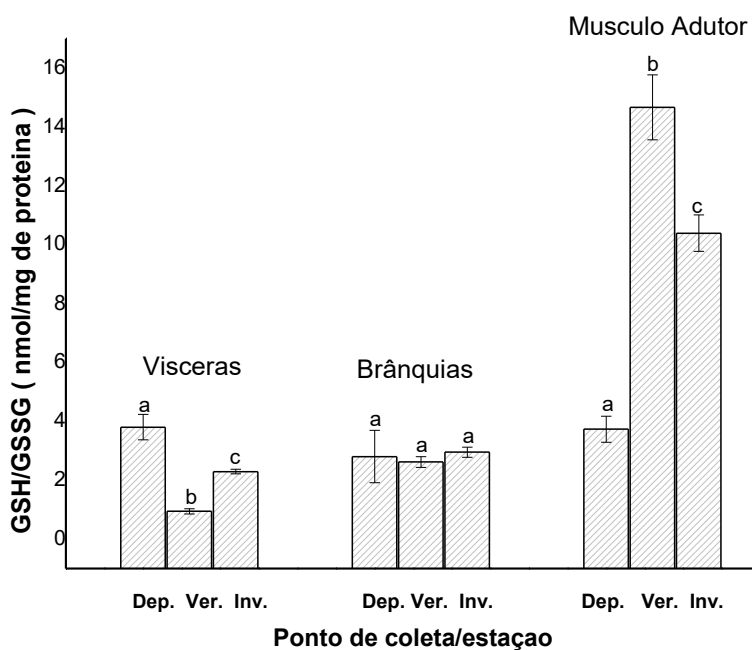
Figura 7. Atividade de Glutathiona reduzida (GSH) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Compelxo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca (verão) e chuvosa (inverno).



Os valores estão expressos como medias. a, b c = representam diferenças sazonais significativas entre as atividades mensuradas nos tecidos iguais, e o controle. ^{a,b,c} $p < 0,05$.

A razão GSH/GSSG analisada nesse estudo para estimar o estado de oxidorredução (referente à toxicidade) dos sistemas biológicos da ostra *Crassostrea sp.* do estuário canal de Santa Cruz, demonstrou diferenças significativas nas vísceras e músculo adutor entre as estações seca e chuvosa. Sendo que nas vísceras a razão GSH/GSSG foi significativamente menor na estação seca que na estação chuvosa. Condição contrária essa foi observada no musculo adutor onde a razão GSH/GSSG foi significativamente menor na estação chuvosa que na estação seca. Comparando a razão GSH/GSSG entre os tecidos da ostra do estuário e ostras depuradas, observamos que nas vísceras essa razão foi significativamente menor que as ostras depuradas em ambas estações, enquanto no musculo adutor a razão GSH/GSSG das ostras do estuário foi significativamente menor na estação chuvosa e maior na estação seca. (Figura 8).

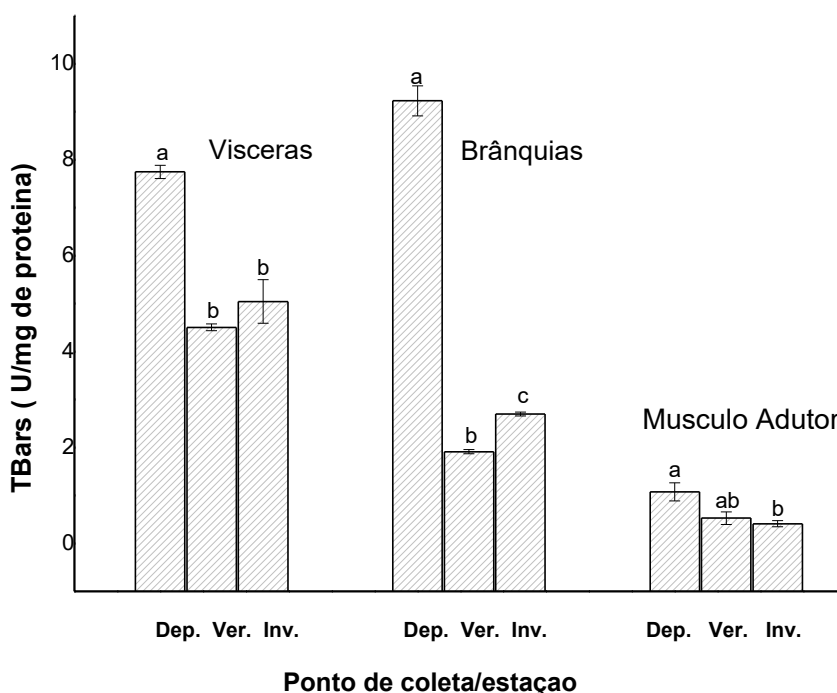
Figura 8. Razão (GSSG/GSH) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Compelxo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca (verão) e chuvosa (inverno).



Os valores estão expressos como medias. a, b, c = representam diferenças sazonais significativas entre as atividades mensuradas nos tecidos iguais, e o controle. ^{a,b,c} $p < 0,05$.

Diferenças estatísticas significativas foram observadas no teste de peroxidação lipídica (LPO) entre as estações seca e chuvosa para brânquias, sendo a maior produção de MDA nesse tecido durante o período chuvoso. Semelhança entre o nível de LPO foi observada nos tecidos, vísceras e músculo adutor quando comparada as duas estações. Comparando a LPO das ostras do estuário e depuradas os três tecidos apresentaram nível de LPO significativamente mais baixo (Fig. 9).

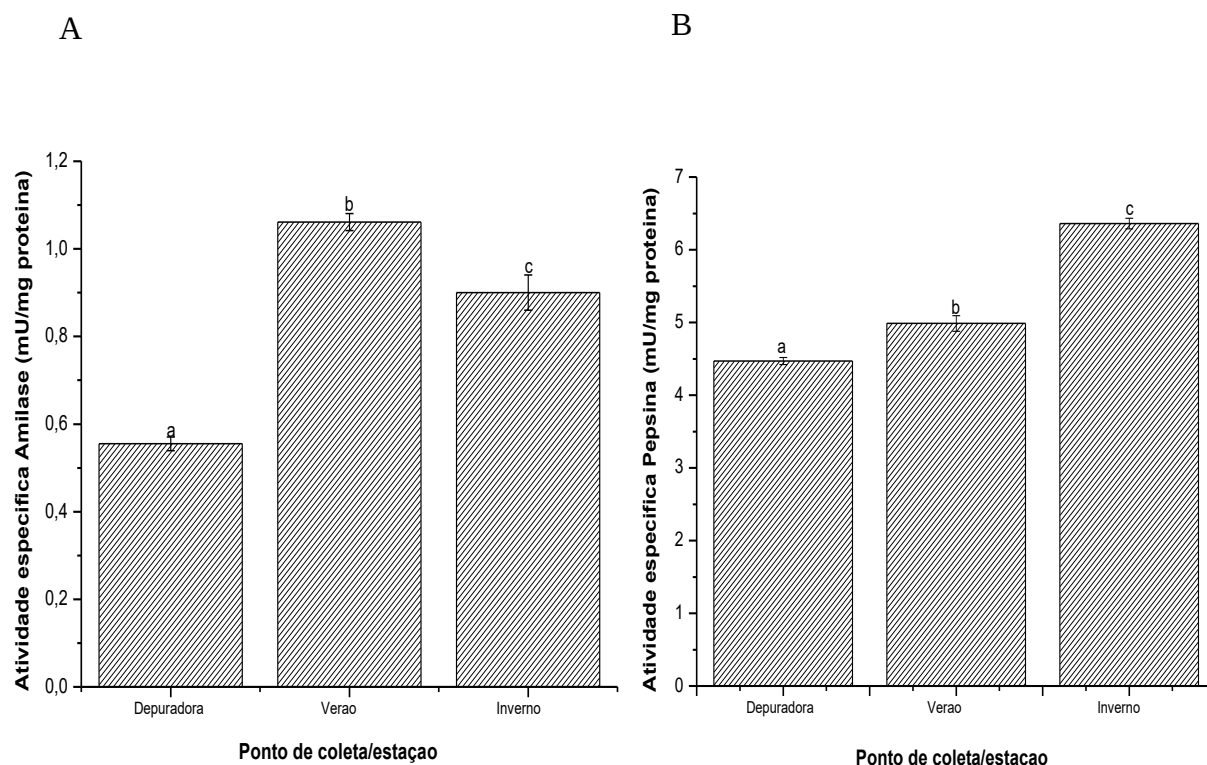
Figura 9. Lipoperoxidação (LPO - Tbars) em vísceras, brânquias e músculo adutor posterior de espécimes de ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Compelxo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca (verão) e chuvosa (inverno).



Os valores estão expressos como medias. a,b c = representam diferenças sazonais significativas entre as atividades mensuradas nos tecidos iguais, e o controle. ^{a,b,c} $p < 0,05$.

Alterações sazonais e diferenças estatísticas significantes foram observadas nas enzimas digestivas amilase e pepsina, no tecido visceral de ostra *Crassostrea sp.* do estuário Canal de Santa Cruz. A atividade amilolítica nas ostras do estuário foi significativamente maior na estação seca que na estação chuvosa, porém as atividades da amilase das duas estações, quando comparadas com as atividades das ostras depuradas foi significativamente maior (Fig. 10 A). No entanto, uma resposta sazonal contrária foi evidenciada na atividade da pepsina em vísceras de ostra do estuário onde a atividade de pepsina foi significativamente maior em ostras da estação chuvosa que na estação seca. Contudo, as atividades de pepsina das ostras do estuário foram significativamente maior que as ostras depuradas (Fig. 10 B).

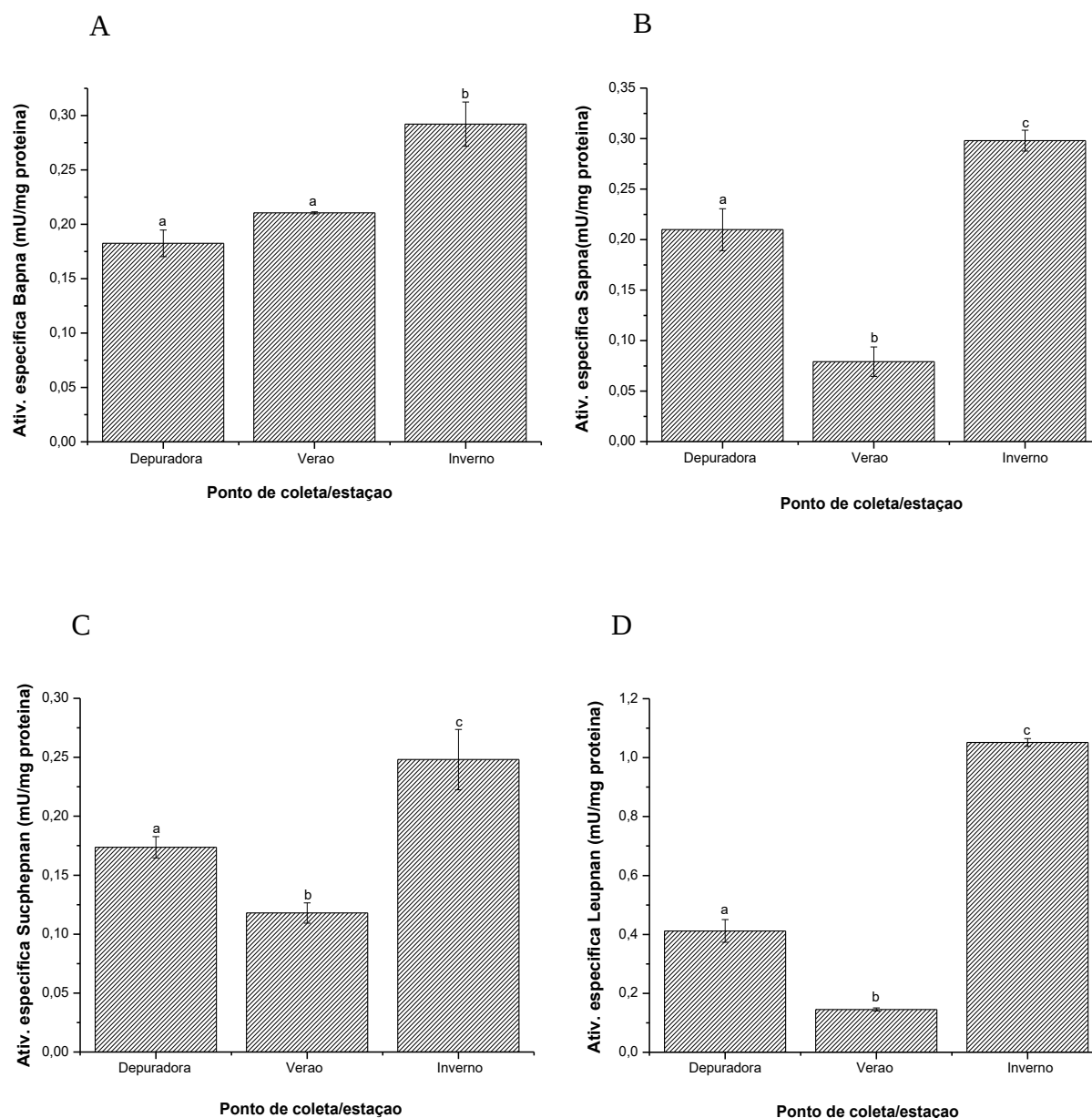
Figura 10. Atividade da enzima digestiva Amilase (a) e Pepsina (b) no tecido visceral espécimes de ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca (verão) e chuvosa (inverno).



Os valores estão expressos como médias. a, b c = representam diferenças sazonais significativas entre as atividades mensuradas nos tecidos iguais, e o controle. ^{a,b,c} $p < 0,05$.

Evidências de atividades das enzimas digestivas tripsina, quimotripsina e leucinoaminopeptidase foi observada no tecido visceral de ostras estuarina e depuradas, utilizando os substratos específicos bapna, sapna, sucphepnan e leupnan respectivamente (Fig. 11). As atividades de proteases em vísceras de ostras do estuário mostraram variação sazonal, tendo valores estatísticos significativamente maiores na estação seca para os quatro substratos utilizados. Comparando as atividades dos substratos sapna, sucphepnan e leupnam em vísceras de ostras do estuário com as depuradas, observamos que houve diferença significativa entre elas, sendo a maior atividade na estação chuvosa que na estação seca. Para o substrato bapna também foi evidenciado que a atividade das enzimas em vísceras da estação chuvosa foi significativamente maior que as ostras depuradas, enquanto a atividade da estação seca não mostrou diferença significativa.

Figura 11. Atividade em presença dos substratos A - Bapna (específico para tripsina), B e C - Sapna e Sucpheapnan (específico para quimotripsina), D - Leupnan (específico para leucino aminopeptidase) no tecido visceral espécimes de ostra *Crassostrea sp.* depuradas (Coruripe/AL), e espécimes coletados no Complexo Estuarino Canal de Santa Cruz, PE nas estações seca (verão) e chuvosa (inverno).



Os valores estão expressos como medias. a, b c = representam diferenças sazonais significativas entre as atividades mensuradas nos tecidos iguais, e o controle. ^{a,b,c} $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Estudos de monitoramento da poluição ambiental utilizando biomarcadores bioquímicos em bivalves como ostras e mexilhões têm sido largamente descrito na literatura (Cheung et al, 2002; Roméo et al, 2003). Entretanto, poucos estudos têm-se centrado nas respostas de biomarcadores localizados, simultaneamente, nos diferentes tecidos biológicos do organismo aquático, na correlação de suas respostas conjuntas com a poluição sazonal no estuário e na indicação do tecido que melhor responde às

mudanças sazonais naquele ecossistema. Essas variações sazonais entre os biomarcadores, além daquelas correlacionadas com a poluição, foram observadas no presente estudo.

O monitoramento químico de água e sedimento têm sido o foco em todo o mundo nas últimas décadas, com a detecção e avaliação de bioacumulação de contaminantes (por exemplo, Joyeux et al, 2004; Ueno et al., 2005). O número de estudos de biomonitoramento para avaliar os efeitos de contaminantes em organismos aquáticos têm aumentado recentemente (Lionetto et al, 2003; Ricciardi et al., 2006 ; Zanette et al, 2006). A ostra do mangue *C. rhizophorae* é considerada um bioindicador potencial em áreas estuarinas brasileiras devido à sua distribuição geográfica ao longo da costa, importância como um recurso alimentar humano e forte capacidade de se concentrar poluentes, como metais traço, devido ao seu hábito alimentar filtrante (Silva et al., 2006). *C. rhizophorae* foi anteriormente considerada como uma espécie sensível para a detecção de efeitos neurotóxicos (Alves et al., 2002).

No presente estudo as atividades de AChE em vísceras e brânquias de ostras coletadas no estuário Canal de Santa Cruz foram significativamente menor que nas ostras depuradas, o que sugere que os níveis de compostos anticolinesterásicos são altos no estuário avaliado. Inferimos também que as concentrações desses agentes anticolinesterásicos é alterada sazonalmente, pois seus efeitos de inibição enzimática se apresentaram maior na estação chuvosa para brânquias e seca para vísceras, sendo esses tecidos sensíveis a variação sazonal desse xenobióticos anticolinesterásico. A diminuição na atividade da AChE de brânquias no inverno foi acompanhada do aumento das concentrações dos metais chumbo, cádmio na água e cobre no tecido. No presente estudo, ensaio *in vitro* evidenciou inibição de 100% a atividade de AChE em *Crassostrea sp.* exposta ao Cu^{2+} , Cd^{2+} na concentração de 0,1 mM. Vários relatos na literatura reportam inibição *in vitro* de cobre em espécies aquáticas tais como de 53% para *P. managuensis*, de 23% para o pirarucu, *Arapaima gigas*, de 35% para o tambaqui, *Colossoma macropomum*, de 23% para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, de 78% para o poraquê, *Electrophorus electricus* e de 53% para o tucunaré *Cichla ocellaris* (Assis, 2011; Oliveira et al., 2012; Silva et al., 2013; Araújo et al., 2016). Segundo (Jemec et al. 2007) alterações na atividade da AChE, quando exposta a concentrações de cobre, está relacionada a capacidade do metal em substituir o cofator da enzima, resultando na incapacidade de sua interação com o substrato, resultando em inibição significativa.

Atividades baixas de AChE no músculo adutor de *Crassostrea sp.* coletadas no estuário Canal de Santa Cruz, também foi relatado por Valdez Domingos et al, (2007). O declínio da atividade AChE descrito para vários metais pesados pode ser interpretado como um resultado secundário de alterações conformacionais na enzima, devido a metais se ligarem com um grande número de grupos funcionais sulfidrílo e como um efeito direto derivado da sua capacidade para se ligarem covalentemente a serina no sítio ativo da AChE (Szabo e Nemcsók, 1992). Comparando as estações seca e chuvosa foi possível observar que a atividade da AChE do músculo adutor apresentou menor atividade na estação seca, porém em relação as ostras depuradas não houve diferença significativa. A atividade de BChE foi menor

na estação chuvosa para os três tecidos, corroborando a ideia de que há diferença sazonal na resposta dessa enzima biomarcadora (BChE) em relação as concentrações dos compostos anticolinesterásicos que sugerimos ser maior na estação chuvosa. Devido às atividades das colinesterases terem sido menores na estação chuvosa (Fig. 1), mesmo sem a análise química ter sido realizada, este resultado sugere a ocorrência de níveis mais elevados de agentes colinesterásico, que normalmente são inibidores potentes destas enzimas. A atividade da AChE pode ser inibida por poluentes, tais como organofosforados e carbamatos (Oliveira Ribeiro e Silva de Assis; 2005), mas outras substâncias, como metais (Rabitto et al, 2005), hepatotoxinas de cianobactérias (Monserrat et al, 2000) e detergentes são susceptíveis de interferir na atividade, necessitando cautela na interpretação dos resultados da atividade deste biomarcador *in situ*. Assim, a baixa atividade da AChE encontrada nas ostras coletadas no complexo estuarino pode estar associada também às maiores concentrações de alguns metais traços nestes animais. Cabe ressaltar também que existe a possibilidade de que outros fatores físico – químicos como pH, salinidade e condutividade possam também ter afetado a atividade das enzimas analisadas nas ostras mantidas no complexo estuarino.

Embora a atividade da colinesterase seja mais elevada em vertebrados do que invertebrados (Bocquene' et al., 1990), os presentes resultados podem ser atribuídos às diferenças na sensibilidade no metabolismo entre grupos de animais. O aumento da atividade de AChE no músculo adutor de ostras do estuário no inverno pode estar relacionada a uma consequência da exposição a longo prazo a contaminantes no ambiente. Este efeito, que significa a tolerância do organismo aos contaminantes, foi anteriormente relatado por outras enzimas como as ATPases, tanto para vertebrados (Webb et al, 2001), e invertebrados (Harris e Santos, 2000; Bianchini et al., 2005; Comoglio et al., 2005). O aumento da síntese e atividade de ChE foi observada em peixes e invertebrados cronicamente expostas a níveis sub-letais de metais e os pesticidas (Bianchini et al, 2005; Comoglio et al, 2005). Em conformidade, correlações positivas significativas foram observadas entre as concentrações de atividades de AChE e BChE nas brânquias e músculo de (Roche et al., 2002), e mercúrio induzindo o aumento da expressão de AChE E BChE no mexilhão glândula digestiva (*M. galloprovincialis*) (Burlando et al., 2004).

Por serem organismos sésseis, após o fechamento as ostras estuarinas certamente estão cronicamente expostas a diversos contaminantes na área estudada, explicando a inibição das atividades da AChE e BChE entre estações no estuário, e entre o estuário e ostras depuradas medidos neste estudo (Fig. 1). A presença de coliformes a 45° (>1100 NMP/ml) presentes na análise microbiológica da água do estuário nas duas estações, seca e chuvosa, sugere que o estuário de Santa Cruz recebe descarga de efluentes domésticos, podendo ter contribuído para o efeito inibitório das ChEs (AChE e BChE). Esse mesmo comportamento foi observado por Peres et al., (2004), onde efluentes domésticos não tratados mostraram induzir inibição de ChE na plana *Clam scrobicularia* (Peres et al., 2004).

Estudos relacionados à atividade de colinesterases, geralmente, mostram inibição enzimática em espécimes de bivalves coletados em áreas impactadas, como descrito por *Dreissena polymorpha* tecidos

moles e hemolinfa (Galloway et al, 2002; Owen et al, 2002; Binelli et al, 2006; Ricciardi et al., 2006). Inibição da colinesterase também foi descrita em tecidos visceral total de *Mytilus galloprovincialis* coletadas em áreas costeiras italianas sob influência industrial e urbana (Lionetto et al., 2003), e no músculo adutor da *Amblema Plicata* expostos a clorpirifós (96 h) (Doran et al., 2001).

Observou-se de maneira geral, que a atividade da colinesterase apresentou mais elevada no verão do que no inverno, corroborando os resultados relatados por Bocquené e Galgani (1990) e Ricciardi et al. (2006) que observaram incrementos na atividade da colinesterase em bivalves nas estações mais quentes do ano; bem como a tendência de atividade metabólica mais intensa no verão demonstrada em *Crassostrea gigas* por Mão (2006) e *Mytilus galloprovincialis* por Bochetti (2006). Além disso, é durante o verão que ocorre um maior tráfego de barcos e a presença de turistas contribuem para um grande aumento na geração de efluentes domésticos, incrementando a contaminação dos estuários (Valdez Domingos et al. 2007).

A ocorrência de efeitos sazonais (diferenças entre inverno e verão), nos três tecidos de ostras coletadas no estuário Canal de Santa Cruz provavelmente pode ser relacionado à diferenças de pH, que foi mais alto no inverno (Tabela 1). Diferenças no pH pode ser devido a diferentes taxas de precipitação. Os dados de agências estatais disponíveis on-line na internet (www.apac.pe.gov.br) indicam os meses de inverno de junho - agosto como aqueles com as maiores taxas de precipitação, nos 10 dias anteriores à coleta das ostras do complexo estuarino Canal de Santa Cruz. Diferentes taxas de precipitação podem afetar não só valores de pH nos estuários, mas também a disponibilidade de contaminantes, maior turbulência na água e rotatividade de sedimentos (Fent, 1996). A variabilidade dos parâmetros abióticos e disponibilidade de contaminantes pode, assim, ser responsáveis pelo aumento ou diminuição da atividade de AChE e BChE nos tecidos visceral, branquial e musculo adutor do estuário, tanto entre as estações, como em relação as ostras depuradas (Tabela 1 e 2). Outro fator importante que pode explicar o aumento dos níveis de pH no canal de Santa Cruz é a presença de indústrias as margens dos rios que desaguam e liberam seus efluentes no estuário.

O rio Botafogo é o principal rio que desemboca no Canal de Santa Cruz e segundo Meyer et al. (1998), até 1991 este rio recebeu grande aporte de mercúrio proveniente de uma fábrica de soda cáustica na região. Em 2003, ainda foram detectados altos níveis de mercúrio nas ostras desta região (Cavalcanti, 2003). Atualmente, ainda existem fábricas de soda cáustica operando na região do canal de Santa Cruz, também há fábricas de cloro, papel e de plantações de cana-de-açúcar. Além do aporte de efluentes industriais e agrícolas, análises microbiológicas da água desse estuário, realizadas no presente estudo, revelou altos níveis de coliformes termotolerantes, no verão e inverno, sendo isso um indício que esgotos urbanos estejam chegando ao Canal de Santa Cruz e, conseqüentemente alterando alguns parâmetros físicos- químicos, por exemplo o pH.

Informação sobre os efeitos do pH em bivalves ainda não foi bem elucidado. Porém, o aumento dos níveis de pH é relatado em peixes, estando associado ao inchaço dos eritrócitos, à redução na contagem total de eritrócitos e ao teor de hemoglobina total, de carpas (Das et al., 2006).

A atividade da CAT em vísceras foi semelhante entre as ostras coletadas no estuário na estação seca e chuvosa, e entre estação seca e ostras depuradas. Contudo, a atividade da CAT no inverno foi menor que nas ostras depuradas, época em que o índice pluviométrico foi maior nos dias que antecederam à coleta da ostra no complexo estuarino. Esse fato pode ter contribuído para o maior aporte de contaminantes como metais pesados que de acordo com a literatura demonstram efeitos severos sobre a eficiência catalítica dessa enzima (Fig. 3) (Bayne, 1990). Atividade diminuída da CAT sugere que esse estuário está impactado quimicamente por atividades humanas, que pode provocar uma inibição de CAT ou uma menor expressão dessa enzima nessa espécie de molusco bivalve estudada, quando comparado com bivalves da mesma espécie depurados. Estudos sugerem que a atividade de CAT é um biomarcador importante de contaminação, apesar da interferência de parâmetros físico-químicos (Sheenan e Power, 1996)

A resposta antagônica de aumento e diminuição da atividade da CAT observada em vísceras de ostras coletadas na estação seca e chuvosa, na região estuarina pode estar relacionada a maior concentração de alguns metais detectados nos tecidos moles destes animais e na água estuarina, respectivamente (Tab. 2 e 3), e outros fatores físico-químicos, e contaminantes biológicos que oscilaram entre as estações. Segundo Bayne (1990), a CAT é uma hemoproteína que possui o grupo heme em sua estrutura catalítica. Certos metais possuem alta afinidade por enzimas envolvidas na síntese do grupo heme da CAT, o que pode causar uma inibição da síntese do grupo heme e comprometer a eficiência catalítica desta enzima observada no presente estudo.

Nas brânquias de ostras coletadas no estuário foi observado que a atividade da CAT foi maior na estação seca, comportamento inverso foi detectado quando comparamos a atividade de CAT de brânquias das duas estações com brânquias de ostras depuradas, sendo o valor de CAT nas duas estações menor que nas ostras depuradas. Em relação a resposta sazonal diferente entre vísceras e brânquias podemos inferir que tecidos diferentes tem respostas específicas para os diversos poluentes. A brânquia é o primeiro tecido a ter contato com os agentes xenobióticos, o que pode ativar uma resposta rápida nessa enzima detoxificadora. Por outro lado, as respostas obtidas em estudos *in situ*, como as do presente trabalho, podem ser vistas como resultado da interação de fatores biológicos e fatores ambientais. Estas interações podem estar promovendo efeitos sinérgico ou antagônico sobre as respostas bioquímicas dos organismos, o que exige cautela na interpretação dos resultados.

Comumente, o aumento de atividade da CAT indica a ativação do sistema de defesa antioxidante, de modo a manter a homeostase celular redox contra compostos pró-oxidantes e, assim, evitar o estresse oxidativo, (Clemente et al, 2010). O estresse oxidativo pode levar a danos de biomoléculas importantes, tais como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, e por isso tem importantes consequências

deletérias para a integridade, funcionamento e sobrevivência da célula (Livingstone et al, 1990). A atividade da CAT obtida no músculo adutor de ostra do complexo estuarino não apresentou diferença sazonal, nem entre as duas estações e ostras depuradas.

O trabalho de Vidal et al. (2002) relata que a espécie de bivalve *Corbicula fluminea* apresenta redução de parâmetros como: catalase peroxidação de lipídeos e NADH citocromo c redutase em pH alcalino (8 a 9); indicando que a alcalinização da água pode aumentar a suscetibilidade de bivalves a ação de contaminantes aquáticos.

No presente estudo, foram observadas diferenças sazonais nos níveis de SOD nas vísceras e brânquias do complexo estuarino, com os níveis mais altos observados na estação chuvosa. Estes resultados estão de acordo com os estudos de (Luna Acosta et al, 2010) que revelaram diferenças sazonais significativas nos níveis da enzima detoxificadora GPx na glândula digestiva, com os níveis mais baixos observados na estação seca. Resultados semelhantes foram encontrados na atividade da GPx em *P. viridis* do Mar Arábico (Verlecar et al., 2008). A estação chuvosa é um período em que o estresse oxidativo é conhecido por ser elevado em bivalves (Manduzio et al., 2004). O autor ainda sugere que estudos de biomonitoramento sobre o estresse oxidativo no mexilhão azul, *Mytilus edulis*, deve preferencialmente ser realizado nas brânquias em vez de na glândula digestiva. Portanto, atividades alta de SOD em vísceras e brânquias na estação chuvosa pode ser uma consequência do estresse oxidativo elevado. Diminuição da atividade da SOD no músculo e nas vísceras foi observada na estação seca quando comparadas com as ostras depuradas. No entanto, valores semelhantes de atividade de SOD foram encontrados no músculo adutor de ostra do estuário coletadas na estação seca e chuvosa, e entre coletas da estação chuvosa e ostras depuradas.

Esses resultados corroboram com a ausência de diferenças sazonais de SOD encontradas em brânquias e glândulas digestivas de ostras do pacífico *Crassostrea gigas* expostas a contaminantes *in situ*. Segundo os autores, este comportamento sugere que modulações antioxidantes diferem entre as espécies e que é necessário estudar os níveis basais no organismo de interesse antes de comparar as respostas de biomarcadores entre os locais contaminados e de referência (Luna Acosta, et al 2010).

As maiores atividades das enzimas SOD e CAT encontradas nos tecidos estudados relaciona-se com o trabalho em conjunto de ambas na neutralização de EROs: primeiro a SOD transforma ânions superóxido em peróxido de hidrogênio e a CAT, por sua vez, age logo após degradando o peróxido de hidrogênio em H_2O_2 e O^{2-} (Halliwell ; Gutteridge, 2007). Dessa forma, tanto a atividade da SOD, como a da CAT tendem a ser maiores em ostras expostas a metais, além de diversos organofosforados, pois esses compostos podem provocar desbalanço na produção de EROs e promover situações de estresse oxidativo (Van der Oost et al., 2003; Valavanidis et al., 2006). Assim, a indução da atividade da SOD e da CAT em vísceras e brânquias pode estar correlacionada com a maior concentração de metais, matéria orgânica, entre outros poluentes disperso na coluna d'água do estuário estudado.

Os níveis de GSSG variaram sazonalmente em vísceras e brânquias de ostras do complexo estuarino, sendo observado valores maiores de GSSG na estação seca para vísceras e maiores na estação chuvosa para brânquias. Segundo Kosower e Kosower (1978), altos níveis de GSSG representa um biomarcador de estresse oxidativo. Altos teores de GSSG são relativamente comuns em peixes (Rodríguez-Ariza et al., 1993b) e moluscos (Wilhelm Filho et al., 2001b), mas contrasta com a pequena quantidade de GSSG normalmente encontrada em mamíferos. A alta proporção de GSSG encontradas nas vísceras na estação seca, e nas brânquias de ostras do estuário é outro indicativo de que o organismo está enfrentando uma condição de estresse oxidativo agudo por estar inserido num ambiente poluído. Estudo realizado por Torres et al (2002), também mostraram níveis altos de GSSG nas glândulas digestivas do mexilhão *Mytella guyanensis* e consequentemente alto nível de estresse oxidativo nos locais onde foram extraídos.

No presente estudo, quando comparamos os níveis de GSSG do estuário nas duas estações com as ostras depuradas percebemos que os níveis foram maiores que as ostras depuradas nas vísceras, e menor nas brânquias e músculo, neste tecido também foi observado níveis de GSSG semelhantes na estação seca e chuvosa. As diferenças existentes nos níveis de GSSG e dos outros biomarcadores citados, entre as ostras do complexo estuarino e as ostras depuradas demonstram que o ecossistema estudado se encontra altamente impactado.

Neste trabalho diferenças sazonais foram observadas nos níveis de GSH em brânquias e músculo adutor de *Crassostrea sp.* As respostas relacionadas com a poluição nos níveis baixos de GSH foram observadas na estação seca para brânquias e na estação chuvosa para músculo adutor. Em relação a ostra depurada, foi observado um decréscimo no nível de GSH em brânquias na estação seca e em músculo adutor nas duas estações. Enquanto os níveis de GSH foram semelhantes em vísceras coletadas no na estação seca, chuvosa e ostras depuradas. Essa diminuição nos níveis de GSH observadas nas brânquias e vísceras, sugere que radicais livres produzidos em ostra *Crassostrea sp.* devido à presença xenobióticos no complexo estuarino Canal de Santa Cruz, estão sendo neutralizados por esse antioxidante. Esse comportamento é esperado pois segundo Wilhelm Filho et al., 2001a; em situações de exposição crônica a ambientes poluídos o consumo de oxigênio aumenta e o esgotamento de GSH é, portanto, observado. O estresse oxidativo se faz presente devido ao aumento da taxa metabólica, como consequência das alterações das atividades normais (Wilhelm Filho et al., 2001b). Face ao papel da GSH na proteção contra o estresse oxidativo e detoxificação de xenobióticos, a disponibilidade desta na forma reduzida é um fator chave para a manutenção da saúde. Quanto menor o conteúdo em glutathione numa célula, menor a probabilidade de sobrevivência dessa célula (Forman, 2009).

A glutathione participa em inúmeros processos metabólicos no organismo. O conteúdo em glutathione no organismo é um forte indicador do respectivo estado fisiológico (Tapiero, 2003), onde a sua depleção pode ocasionar danos celulares irreversíveis (Forman, 2009). GSH é comumente encontrada nessa sua forma ativa, convertendo-se em GSSG (glutathione oxidada/glutathione dissulfeto)

durante sua atuação frente a metabolização de peróxido de hidrogênio, em conjunto com a CAT e SOD, metabolização de xenobióticos, como cofator de glutathionas S- transferase e na desativação de radicais livres que provocam estresse oxidativo.

A razão GSH/GSSG em vísceras de ostras do complexo estuarino foi menor na estação seca que na estação chuvosa, enquanto a razão GSH/GSSG desse mesmo tecido em ambas estações apresentou – se menor que nas ostras depuradas. Comportamento contrário foi observado no músculo adutor de ostras coletadas no estuário, onde a razão GSH/GSSG entre as estações foi menor na estação chuvosa. Comparando a razão GSH/GSSG entre as estações seca e chuvosa e depuradora foi maior nas estações. Semelhança na razão de GSH/GSSG em vísceras coletadas na estação seca, chuvosa e ostras depuradas foram observadas. Segundo Henry Okigami, 2009, nos tecidos saudáveis cerca de 90% da glutathione existente encontra-se na forma reduzida (GSH) que é sua forma biologicamente ativa. Em condições de estresse oxidativo, a GSH converte-se em GSSG, o que leva a uma diminuição da razão GSH/GSSG (Rodrigues Neto, 2010). O par redox GSH/GSSG poderá ser um importante indicador do estado redox celular (Ballatori, 2009) e, alterações neste par redox demonstram estar relacionadas com a proliferação celular, diferenciação e/ou apoptose (Park, 2010). Sendo assim podemos inferir que a diminuição na razão GSH/GSSG de vísceras e músculo adutor de ostras coletadas no estuário em relação a ostras depuradas seja um indicativo de resposta ao estresse oxidativo provocado pela presença de poluentes geradores de impacto ambiental no complexo estuarino.

Níveis aumentados de malonaldeído (MDA) indicam que peroxidação lipídica (LPO) foi encontrada em brânquias de ostras do estuário coletadas na estação chuvosa, nesse mesmo tecido níveis de glutathione oxidada (GSSG) também foram aumentados sugerindo ocorrência de estresse oxidativo no organismo estudado. Níveis semelhantes de MDA foram encontrados em vísceras e músculo adutor na estação seca e chuvosa, e entre estação seca e depuradora deste mesmo tecido. Tal semelhança nos níveis de MDA em vísceras e músculo adutor pode ser relacionado a alta atividade da SOD e BChE, e seu papel protetor frente aos agentes xenobióticos que provocam estresse oxidativo e consequentemente peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica afeta funções importantes da membrana, nesse caso espera-se que as células ativem mecanismos de defesa eficientes para controlá-lo, especialmente em ostras continuamente exposta. No entanto, níveis inalterados de peroxidação lipídica não significam necessariamente a ausência de estresse oxidativo, pois segundo Brito (2012) esse estresse pode acontecer e localizar-se em organelas celulares específicos e está envolvido na morte celular dos organismos exposto a essa condição. Os níveis de MDA em vísceras e brânquias da estação seca e chuvosa foi menor que o das ostras depuradas, enquanto no músculo apenas durante a estação chuvosa foi visto uma diminuição nos níveis de MDA quando comparados com ostras depuradas. Essa resposta pode estar relacionada com a ativação dos componentes antioxidantes, aumento de GSH em brânquias, aumento na razão GSH/GSSG em vísceras e músculo adutor na estação chuvosa, e aumento da SOD em brânquias

na estação seca, que estão envolvidos na proteção contra danos a componentes celulares mediados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio EROs/ERNs.

Atividade aumentada de amilase e pepsina, na estação seca e chuvosa, foi observada no tecido visceral de ostra do estuário quando comparadas com ostras depuradas, enquanto resposta sazonal diferenciadas foi encontrada para esse tecido, sendo a maior atividade na estação seca para amilase, e maior na estação chuvosa para pepsina. Esses resultados sugerem que devido as ostras terem hábito alimentar filtrador, partículas ricas em matéria orgânica por exemplo carboidrato e proteína, suspensas na água possa ter ativado nível maior dessas enzimas digestivas específicas, afim de acelerar o processo de digestibilidade desse nutriente. Esse aumento na atividade dessas duas enzimas digestivas e a presença comprovada de coliformes fecais na análise bacteriológica, pode ser indícios de que o estuário tem recebido um aporte grande de poluentes orgânicos. A diferença sazonal observada na atividade específica da amilase e pepsina, indicam que menores atividades obtidas no inverno para amilase e no verão para pepsina estão correlacionadas com possíveis poluentes inibidores dessas enzimas presentes no estuário nestas estações. Nesse ecossistema, quantidades elevadas de restos vegetais, animais e microrganismos juntamente com os efluentes domésticos, constituem uma carga capaz de fornecer compostos potencialmente inibidores, como compostos de Kunitz e de Bowman-Birk, alcaloides, anticorpos, fatores antinutricionais, fármacos, dentre outros. Concomitantemente, pesticidas, metais pesados e compostos organoestânicos presentes em sedimentos também podem inibir essas enzimas mediante danos irreversíveis nas células secretoras dos tecidos digestivos (Casida e Quistad, 2005; Silva et al., 2011).

Segundo Neumann (1970), quando alguns desses compostos organoestânicos adentram os ambientes aquáticos, podem se degradar facilmente na água, porém, quando atingem os sedimentos, permanecem imobilizados, levando muito mais tempo para se tornarem biologicamente inativos.

O decréscimo encontrado nas atividades de amilase e pepsina na estação chuvosa e na estação seca respectivamente, e o aumento dessas enzimas em relação as ostras depuradas, sugere que essa enzima pode ser utilizada como um biomarcador eficaz no monitoramento do complexo estuarino Canal de Santa Cruz, pois indicam a presença de outras substancias poluidoras, no ambiente estudado, e não apenas pesticidas e cianotoxinas que podem interagir com sitio catalítico dessas enzimas inibindo ou ativando a mesma.

Comparando o comportamento das atividades específicas da tripsina, quimotripsina e leucinoaminopeptidase, utilizando os respectivos substratos seletivos, observamos que houve uma diminuição nas atividades dessas enzimas em vísceras coletadas na estação seca em relação a estação chuvosa. A atividade da quimotripsina usando os dois substratos específicos, sapna e sucphphan, e da leucinoaminopeptidase também foram menores na estação chuvosa quando comparadas individualmente com as atividades das ostras depuradas. Resultados semelhante também foi reportado por (Assis et al, 2014) onde observaram decréscimo estatisticamente significativo na atividade das enzimas digestivas

pepsina, tripsina e amilase do peixe Tilápia do Nilo coletado em um riacho contaminado por efluentes doméstico e de laboratórios.

As respostas dessas enzimas corroboram com os obtidos para a pepsina e amilase, as quais apresentaram oscilações sazonais em suas atividades, sendo esse um indicativo de que poluentes com capacidade de inibir a atividade dessas enzimas digestivas estão presentes no estuário e tem gerado impacto severos ao status de conservação do mesmo. Sugerimos também que esse impacto pode estar correlacionado ao insucesso no desenvolvimento de cultivo no estuário e crescimento natural do molusco bivalve em estudo no estuário monitorado. Inferimos, portanto, que substâncias inibidoras de tripsina, quimotripsina e leucinoaminopeptidase estão presentes em maior concentração na estação seca, levando em consideração as atividades da estação seca e chuvosa. Porém, resultado antagônico foi observado nas atividades das três enzimas na estação chuvosa, e apenas para bapna na estação seca em relação a depuradora, onde houve um aumento das atividades enzimáticas, sugerindo que um mecanismo de compensação /ativação ocorreu devido a presença de poluentes atuando também sitio ativo dessas enzimas. Esses efeitos de inibição primários de pesticidas, anatoxinas e alguns metais pesados não se restringem as colinesterases: cerca de 50 esterases podem ser inibidas, entre elas algumas enzimas digestivas como a tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase (Kam et al., 1979; Fischer, 1988; Casida e Quistad, 2004 e 2005). Porém, os efeitos de tais poluentes sobre outras enzimas digestivas como a pepsina, amilase (Assis et al, 2014) e aminopeptidase, ainda não estão disponíveis na literatura.

Como mencionado anteriormente, diversos compostos orgânicos e inorgânicos podem ter contribuído na inibição dessas enzimas digestivas, sugerindo que o impacto causado pela ação antropogênica no Canal de Santa Cruz ocorre tanto na estação seca como na estação chuvoso e esse impacto é refletido a longo prazo negativamente nas respostas fisiológica da ostra *Crassostrea sp.* Inferimos que as oscilações e respostas antagônicas na estação chuvosa e seca dos biomarcadores, enzimáticos e não enzimático, utilizados no presente estudo correlacionam-se com os níveis acima do permitido pelo CONAMA de Pb e Cu, presença de coliformes fecais, diferença de pH entre outros parâmetros físico-químicos observados na água.

As interpretações de dados de campo são necessariamente muito complexo como um grande número de factores pode interagir de uma forma não controlada (Roche et al, 2002; Zanette et al, 2006). No entanto, apesar da interferência sazonal e fisiológica sobre a biotransformação, atividade de enzimas antioxidantes, enzimas digestivas e antioxidante não enzimáticos, estes biomarcadores ainda representam importantes ferramentas para ecotoxicologia, pois segundo (Zanette et al., 2006), o uso de múltiplos biomarcadores pode ser útil na caracterização adequada de uma determinada área ao longo do tempo, permitindo o seu biomonitoramento.

Como mencionado anteriormente, as mudanças sazonais nos biomarcadores têm sido associados com alterações no estado fisiológico de ostras (por exemplo, crescimento e reprodução) ou alterações nos parâmetros físico-químicos da água (Sheehan e Power, 1999). No entanto, os dados do presente

estudo sugerem que eventos de curta duração, tais como um aumento da precipitação direta antes da coleta de animais, bem como a sazonalidade, podem ser fatores importantes a influenciar nas respostas de biomarcadores em ostras.

5. CONCLUSÃO

A utilização de múltiplos biomarcadores utilizando a ostra nativa *Crassostrea sp.* foi adequado para avaliar as diferenças sazonais encontradas no estuário Canal de Santa Cruz que sofre impacto e interferência no seu status de conservação. O gradiente de poluição inicialmente suposto foi confirmado pelas respostas dos biomarcadores avaliados e pelas análises físico-químicas e microbiológicas da água e dos tecidos moles de *Crassostrea sp.* Baseado na variação das atividades nas enzimas colinesterases (AChE/BChE), CAT, SOD e enzimas digestivas, nos níveis de agente antioxidantes GSH, GSSG, GSH/GSSG e peroxidação lipídica (nível de MDA), bem como níveis de íons Cu e Pb, na presença de coliformes fecais na água estuarina sugerimos que esse ecossistema está recebendo aporte de poluentes orgânicos e inorgânico o que compromete a biodiversidade local, podendo ser classificado com um ambiente impactado por ação antropogênica direta. Os resultados também apontam para um risco a população humana, que utiliza a ostra *Crassostrea sp.*, nossa espécie sentinela, como fonte alimentar. Assim, contínuo programa de monitoramento de contaminação ambiental deve ser estabelecido nesse estuário para elucidar respostas antagônicas de alguns biomarcadores, a fonte de poluentes e avaliar os efeitos biológico e riscos a longo prazo para a biota e população humana que vivem próximas ao estuário.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

Amaral, M. Soto, R. Cunha, I. Marigomez and A. Rodrigues, 2006. Environ. Pollut., 142, 103–108.

Andrea Luna Acosta, Paco Bustamante, Joachim Godefroy, Ingrid Fruitier-Arnaudin, H_él_ene Thomas-Guyon, 2010. Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed in situ. Environmental Science and Pollution Research - International, 17 (4), pp. 999-1008.

Bainy, ACD, 1990. Assimilação de cádmio e chumbo no sangue e tecidos de *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae) e seu efeito sobre a alfa1aminolevulinato desidratase eritrocitária. Porto Alegre, 1990. Dissertação de mestrado. Departamento de Bioquímica, instituto de biociências, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

Benitez-Trinidad, A.B; Bernal-Hernández, Y.Y; Moreno-Hernández ,C.L; Medina-Díaz, I.M, Robledo-Marengo, M.L; Barrón-Vivanco ,B.S; Domínguez-Ojeda , D.; Romero-Bañuelos, C.A; Girón-Pérez , M.I; Rojas-García , A.E, 2014. Acetylcholinesterase inhibition and micronucleus frequency in oysters (*Crassostrea corteziensis*) exposed to chlorpyrifos. Research report. 11: 247-256.

Bernal-Hernández YY, Medina-Díaz IM, Robledo-Marengo ML, Velázquez-Fernández JB, Girón-Pérez MI, Ortega-Cervantes L, *et al*, 2010. Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. *Ecotoxicology* 19: 819-25.

Bianchini, A., Playle, R.C., Wood, C.M., Walsh, P.J., 2005. Mechanism of acute silver toxicity in marine invertebrates. *Aquat. Toxicol.* 72, 67–82.

Binelli, A., Ricciardi, F., Riva, C., Provini, A., 2006. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere.* v. 62, n. 4, p. 510-519.

Bocquene', G., Galgani, F., Truquet, P., 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, v. 30, p. 75-89.

Boisson, F., Cotret, O., & Fowler, S. W, 1998. Bioaccumulation and retention of lead in the mussel *Mytilus galloprovincialis* following uptake from seawater. *The Science of the Total Environment*, 222, 55–61.

Bonacci, S., Brownie, M. A., Dissanayake, A., Hagger, J. A., Corsi, I., Focardi, S., Galloway, T.S., 2004. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. *Marine Pollution Bulletin.* v.49, n. 5-6, p. 445- 455.

Burgeot, T., Bocquéné, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R.M., De La Parra, L. M.G., Pfohl-Leskowicz, A., Raoux, C., Galgani, F., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 131, 125–141.

C. A. Oliveira Ribeiro and H. C. Silva de Assis, 2005. Acetylcholinesterase, in *Recent Trends in the Acetylcholinesterase System*, Amsterdam Netherland, pp. 103–124.

Cantillo, A. Y., 1998. Comparison of results of mussel watch programs of the United States and France with worldwide Mussel Watch studies. *Marine Pollution Bulletin*, 36, 712–717.

Casida, J.E.; QUISTAD, G.B. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research in Toxicology*, v. 17, p. 983-998, 2004.

CASIDA, J.E.; Quistad, G.B., 2005 Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chemico-Biological Interactions*, v. 157–158, p. 277–283.

Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Richardson, B.J., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 181–191.

- Comoglio, L., Amin, O., Roque, A., Betancourt-Lozano, M., Anguas, D., Haro, B.M., 2005. Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 62, 66–74.
- Cuculescu, M., Hyde, D., Bowler, K., 1995. Temperature acclimation of marine crabs: changes in plasma membrane fluidity and lipid composition. *J. Therm. Biol.* 20, 207–222.
- Cunha Bastos J.; Lima J.S.; Castro Faria M.V., 1991. Brain acetylcholinesterase as an *in vitro* detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. *Water Research*, v. 25, p. 835-840.
- Das, P.C., Ayyappan, S., Jena, J.K., 2006. Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. *Aquaculture* 256, 80–87.
- De la Torre, F. R., Ferrari, L., Salibián, A., 2005. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*. v. 59, n. 4, p. 577-583.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Taylor and Francis, London, pp. 523–561.
- Doran, W. J., Cope, G. W., Rada, R.G., Sandheinrich, M. B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in the threeridge mussel (*Amblema plicata*) by chlorpyrifos: implications for biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 49, p. 91-98.
- F. Ramade, 1998. in *Dictionnaire Encyclopédique Des Sciences De L'Eau*, Ediscience International, Paris, 2nd edn.
- Fent, K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26, 1–117.
- FISCHER, G. Trends in protease inhibition. *Natural Product Reports*, v. 5, p. 465-495, 1988.
- Fukuda, A., Nakamura, Y., Ohigashi, H., Osawa, T., Uchida, K., 1997. Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 505–509.
- Galgani, F.; Bocquené, G. In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bulletin environment contamination toxicology*, 45:243-249, 1990.
- Galloway, T.S., Millward, N., Browne, M.A., Depledge, M.H., 2002. Rapid assessment of organophosphorus/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 61, 169–180.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, London, 936pp.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylene orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 271–280.
- I. S. Rabitto, J. R. M. A. Costa, H. C. Silva de Assis, M. A. F. Randi, F. M. Akaishi, E. Pelletier and C. A. Oliveira Ribeiro, 2005. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 60, 147–156.

Brito, I. A.; Freire, C.A.; Yamamoto, F.Y.; Assis, H.C.S.; Souza-Bastos, L.R.; Cestari, M.M.; Ghisi, N.C.; Prodocimo, V.; Neto, F.F.; Oliveira Ribeiro, A.A., 2012. Environ. Monit., Inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*), 14, 615–625.

Jagoe, C.H., Shaw-Allen, P.L., Brundage, S., 1996. Gill Na⁺, K⁺- ATPase activity in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from three reservoirs with different levels of mercury contamination. Aquat. Toxicol. 36, 161–176.

Joyeux, J., Filho, E.A.C., Jesus, H.C., 2004. Trace metal contamination in estuarine fishes from Vitoria Bay, ES, Brazil. Braz. Arch. Biol. Technol. 47, 765–774.

KAM, C.M.; NISHINO, N.; POWERS, J.C., 1979. Inhibition of thermolysin and carboxypeptidase A by phosphoramidates. Biochemistry, v. 18, p. 3032-3038.

Kappus, H., 1986. Overview of enzyme systems involved in bio-reduction of drugs and in redox cycling. Biochem. Pharmacol. 35.

Kosower, N.S., Kosower, E.M., 1978. The glutathione status of cells. International Review of Cytology 54, 109–160.

L. Guilhermino, A. M. V. M. Soares, A. P., 1998. Carvalho and M. C. Lopes, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 60(1), 52– 59.

Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Pascariello, M.F., Marinosci, L., Schettino, T., 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. Mar. Pollut. Bull. 46, 324–330.

Magni, P.; De Falco, G.; Falugi, C.; Franzoni, M.; Monteverde, M.; Perrone, E. et al., 2006. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). Environ. Pollut., 142: 65-72, 2006.

Manduzio, H.; Monsinjon, T.; Galap, C.; Leboulenger, F.; Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: Major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. Aquat Tox 70:83-93.

MARCO, M.-P.; BARCELÓ, D., 1996. Environmental applications of analytical biosensors. Measuring Science Technology, v. 7, p. 1547–1562.

Medeiros, C., Kjerfve, B., 1993. Hydrology of a Tropical Estuarine System: Itamaracá, Brazil. Estuar. Coast. Shelf Sci. 36, 495–515.

Meyer, U., Hagen, W., Medeiros, C., 1998. Mercury in a northeastern Brazilian mangrove area, a case study: potential of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* as bioindicator for mercury. Mar. Biol. 131, 113–121.

Monserrat, J M, Yunes, J S, Bianchini, A., 2000. Inhibition of cholinesterase of aquatic species by extracts of cyanobacteria (*Anabaena spiroides*). In: THIRD SETAC WORLD CONGRESS, Brighton. Brighton:Society of environmental Toxicology and Chemistry.

- Monserrat, J.M., Geracitano, L.A., Pinho, G.L.L., Vinagre, T.M., Faleiros, M., Alciati, J.C., Bianchini, A., 2003. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylene orange complex formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 177–183.
- Munteanu, V., Munteanu, G., 2006. Biomonitoring of mercury pollution: A case study from the Dniester River. *Ecological Indicators*. *In Press*.
- Nigro, M., Falleni, A., Del Barga, I., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G., 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*. v. 77, n. 4, p. 339–347.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, G., 2001. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary seasonality and its consequences. *Sci. Total Environ.* 281, 237–246.
- O'Connor, T. P. (1998). Mussel Watch results from 1986 to 1996. *Marine Pollution Bulletin*, 37, 14–19.
- Oliveira Ribeiro, C.A., Belger, L., Pelletier, É., Rouleau, C., 2002. Histopathological evidence of pesticide exposure. *Mar. Biol.* 44, 1010–1017.
- Owen, R., Buxton, L., Sarkis, S., Toasperm, M., Knap, A., Depledge, M., 2002. An evaluation of hemolymph cholinesterase activities in the tropical scallop, *Euvola (Pecten) zizac*, for the rapid assessment of pesticide exposure. *Mar. Biol.* 44, 1010–1017.
- Peña-llopis, S.; Ferrando, M.D.; Peña, J.B., 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by *N*-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, v. 65, p. 337–360.
- Péqueux, A., Bianchini, A., Gilles, R., 1996. Mercury and osmoregulation in euryhaline crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113C, 149–155.
- Pérez, E., Blasco, J., Sole, M., 2004. Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Ca´diz bay (SW Spain). *Mar. Environ. Res.* 58, 275–279.
- Power, A. and Sheenan, D., 1996. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.*, 114(2), 99–103.
- R. Company, A. Serafim, M. J. Bebianno, R. Cosson, B. Shillito; A. Fialamedione, 2004. *Mar. Environ. Res.*, 58, 377–381.
- Rainbow, P. S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 183–192.
- Rao, J.V., 2006. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Chemosphere*, v. 65, p. 1814–1820.
- Readman, J.W., Liong Wee Kwong, L., Mee, L.D., Bartocci, J., Nilve, G., Rodriguez-Solano, J.A., Gonzalez-Farias, F., 1992. Persistent organophosphorous pesticides in tropical marine environments. *Marine Pollution Bulletin*. v. 24, p. 398–402.
- Regoli, F., Nigro, M., Chiantore, M., Winston, G.W., 2002. Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Sci. Total Environ.* 289.

- Ricciardi, F., Binelli, A., Provenzi, A., 2006. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 63, 406–412.
- Riedel, F. G., Abbe, R. G., & Sanders, J. G. 1998. Temporal and spatial variations of trace metals concentrations in oysters from Patuxent river, Maryland. *Estuaries*, 21, 423–434.
- Roche, H., Buet, A., Ramade, F., 2002. Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in eels from the Camargue biosphere reserve. *Ecotoxicology* 11, 155–164.
- Rodríguez-Ariza, A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J., 1993b. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 2568–2573.
- Rodrigues Neto, A. S. S., 2010. Glutathione :Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas. Porto. Dissertação de mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.
- rodríguez-fuentes, G.; Gold-Bouchot, G., 2000. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition *in vitro*. A case study in two Mexican lagoons. *Marine Environmental Research*, v. 50, p. 357–360.
- Roméu, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Girard, J.P., 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.* 122, 369–378.
- Schulz R, Leiss M. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream invertebrate dynamics. *Aquat. Toxicol.* 46: 155-76, 1999.
- Scott, G.R.; Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, v. 68, p. 369–392.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol., C* 123, 193–199.
- Sies, H., Stahl, W., 1992. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 669.
- Silva, C.A.R., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2003. Biomonitoring of trace metal contamination in mangrove-lined Brazilian coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae*: comparative study of regions affected by oil, salt pond and shrimp farming activities. *Hydrobiologia* 501, 199–206.
- Silva, C.A.R., Smith, B.D., Rainbow, P.S., 2006. Comparative biomarkers of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Mar. Environ. Res.* 61, 439–455.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715–1733.
- Sturm, A.; da Silva de Assis, H.C.; Hansen, P.D., 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, v. 47, p. 389–398.
- Sureda, A.; Box, A.; Enseñat, M.; Alou, E.; Tauler, P.; Deudero, S.; Pons, A., 2006. Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental cadaverine. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 144C, p. 191–196.

- Ueno, D., Wattanbe, M., Subramanian, A., Tanaka, H., Fillmann, G., Lam, P.K.S., Zheng, G.J., Muchtar, M., Razak, H., Prudente, M., Chung, K., Tanabe, S., 2005. Global pollution monitoring of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), furans (PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (coplanar PCBs) using skipjack tuna as a bioindicator. *Environ. Pollut.* 136, 303–313.
- Valbonesi, P., Sartor, G., Fabbri, R., 2003. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *The Science of Total Environment*. v. 312, p. 79-88.
- Valdez Domingos, F.; Azevedo, M.; Silva, M.; Randi, M.; Freire, C.; Silva de Assis, H.; Oliveira Ribeiro, C., 2007 Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. *Env Res* 105:350-363.
- Ventura, E. C., Gaelzer, L. R., Zanette, J., Marques, M. R. F., Bainy, A. C. D., 2002. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three estuaries of Rio de Janeiro coast. *Marine Environmental Research*. v. 54, p. 775-779.
- Verlecar, X.; Jena, K.; Chainy, G., 2008 Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuarine Coastal Shelf Sci* 76:745-752.
- Viarengo, A., & Nott, J. A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostase in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104, 355–372.
- Viarengo, A., Burlando, B., Giordana, A., Bolognesi, C., & Gabrielides, G. P., 2000. Networking and expert system analysis: Next frontier in biomonitoring. *Marine Environmental Research*, 49, 483–486.
- Vidal, M.; Basseres, A.; Narbonne, J., 2002. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 132, 93-104.
- Wallaert, C., Babin, P.J., 1993. Circannual variation in the fatty acid composition of high-density lipoprotein phospholipids during acclimatization in trout. *Biochim. Biophys. Acta* 1210, 23–26.
- WATSON, W.P.; MUTTI, A., 2004 Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects. *Biomarkers*, v. 9, p. 211-242.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.A., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L., 2001a. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses in the cichlid fish *acar_a* (*Geophagus brasiliensis*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34 (5), 719– 726.
- Wilhelm Filho, D., Tribess, T.A., G_aspari, C., Claudio, F.D., Torres, M.A., Magalhães, A.R.M., 2001b. Seasonal changes in antioxidant.
- Zanette, J.; Monserrat, J.M.; Bianchini, A., 2006. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 143C, p. 187-95.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A utilização de múltiplos biomarcadores fornece um diagnóstico mais confiável.
- Existe contaminantes no complexo estuarino Canal de Santa Cruz que induzem efeitos genotóxicos no molusco bivalve *Crassostrea sp.* O impacto genotóxico foi confirmado pela detecção de microlesões no DNA e pela alta frequência de macrolesões (MN) em células da hemolinfa. A sensibilidade da resposta genética das ostras ao Ensaio Cometa e Ensaio Micronúcleo indicam que o complexo estuarino Canal de Santa Cruz encontra-se impactado pela ação antropogênica. Portanto, o molusco bivalve *Crassostrea sp.* demonstrou ser um excelente bioindicador de poluição do mangue, mostrando-se sensível e fiel aos efeitos de possíveis xenobióticos genotóxicos presentes no estuário.
- A AChE de brânquias da *Crassostrea sp.* mostrou ser um potencial biomarcador para o carbamato carbaril. E a AChE de vísceras para o carbamato carbofuran. Sendo esta enzima, considerada uma ferramenta útil no monitoramento de toxicidade ambiental. Os dados apresentados sobre a caracterização da atividade da AChE em *Crassostrea sp.* são sem precedentes e contribuirá na compreensão da dinâmica da AChE nesta espécie.
- A utilização de múltiplos biomarcadores bioquímicos, enzimáticos e não enzimáticos, da ostra nativa *Crassostrea sp.* foi adequado para avaliar as diferenças sazonais encontradas no estuário Canal de Santa Cruz. O gradiente de poluição, que impacta esse estuário e interfere no seu status de conservação, foi confirmado entre as estações pelas respostas dos biomarcadores avaliados.
- As análises realizadas no presente estudo apontam para presença de poluentes orgânicos e inorgânico o que compromete a saúde ambiental e biodiversidade local, podendo esse estuário ser classificado com um ambiente impactado por ação antropogênica direta. Assim, contínuo programa de monitoramento de contaminação ambiental deve ser estabelecido nesse estuário para elucidar respostas antagônicas de alguns biomarcadores, a fonte de poluentes e avaliar os efeitos biológico e riscos a longo prazo para a biota e população humana que vivem próximas ao estuário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, M. L., Torres, R. A., Sponchiado, G., Motta, T. S., Oliveira, C. M. R., Carvalho-Filho, M. A., & Correia, M. T. S. 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, and Soil Pollution*, 211, 61–68, 2010.
- AHMAD, I.; MARIA, V. L.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Modulatory role of copper on α -naphthoflavone-induced DNA damage in European eel (*Anguilla Anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 71: 886-812, 2008.
- AL-SABTI K, Metcalfe C. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*. 343:121-135,1995.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, J. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, n. 372, p. 1331 – 1341, 2002.
- ALMEIDA, J. R.; OLIVEIRA, C.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. *Ecotoxicology*, v. 19, p. 1369–1381, 2010.
- ALMEIDA, P., Fátima, A., Huber, P.C. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, pp.1170-1170, 2008.
- ALVES, S.R.C., Severino, P.C, Ibbotsom, D.P., Silva, A.Z.X., Lopes, F.R.A.S., Sáenz, L.A., Baily, A.C.D. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Marine Environmental Research*. v. 54, p. 241-245. 2002.
- AMADO, L. L., da Rosa, C. E., Leite, A. M., Moraes, L., Pires, W. V., Leães Pinho, G. L., Martins, C. M. G., Robaldo, R. B., Nery, L. E. M., Monserrat, J. M. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*. v. 52, n. 2, p. 199-206. 2006a.
- AMOOZADEH, E. et al. Marine organisms as heavy metal bioindicators in the Persian Gulf and the Gulf of Oman. *Environ Sci Pollut Res Int*, v. 21, p. 2386-95, 2014.
- ANDERSON, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Elsevier- Chemico-Biological Interactions*, 111-112, pp. 1-14, 1998.
- ASSIS, C.R.D., Bezerra, R.S., Carvalho Jr., L.B. Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. In: Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides in Modern World – Book 5*. Intech, Rijeka, Croatia, 2011.
- ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., OLIVEIRA, V.M., FRANÇA, R.C.P., SANTOS, J.F., MARCUSCHI, M., CARVALHO, E.V.M., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR, L.B. Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. *Fish Physiol Biochem.*, 2014.
- ASSIS, C.R.D., Castro, P.F., Amaral, I.P.G., Maciel Carvalho, E.V.M., Carvalho Jr., L.B., Bezerra, R.S. 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* 29, 2243–2248, 2010.
- ATSDR. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Case studies in Environmental Medicine cholinesterase inhibitors: including pesticides and chemical warfare nerve agents. Course WB1102. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.html>. Atlanta, 153 pp., 2007.
- AYLLÓN, F. & GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research*, 467: 177-186, 2000.
- BAINY, A.C.D.; ALMEIDA, E.A.; MÜLLER, I.C.; VENTURA, E.C.; MEDEIROS, I.D. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Marine Environmental Research*. v. 50, p. 411-416, 2000.
- BALLATORI N., Hammond C.L., Krance S.M., Marchan R. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology *Elsevier, Aspects of Medicine*, pp.3-10, 2008.

- BALLATORI, N., *et alii*. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 390, pp. 191-214, 2009.
- BANERJEE, B. D.; SETH, V.; AHMED, R. S. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev. Environ. Health*, v. 16, n. 1, p. 1-40, 2001.
- BARROS, D.; Brabieri, E. Analysis of occurrence of metals: Ni, Zn, Cu, Pb and Cd in oysters (*Crassostrea brasiliensis*) and sediment collected in the Cananeia Estuary-SP (Brazil). *O Mundo da Saúde*, São Paulo - 2012;36(4):635-642, 2012.
- BASHA, P.S.; RANI, A.U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 56, p. 218-221, 2003.
- BARSIENE, J. *et al.* Environmental genotoxicity and cytotoxicity levels in fish from the North Sea offshore region and Atlantic coastal waters. *Mar Pollut Bull*, v. 68, p. 106-16, 2013.
- BARSIENE J. Andreikênaitė L, Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels exposed to crude oil from the North Sea. *Ekologija* 53: 9-15, 2007.
- BARSIENE, J. *et al.* Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. *Environ. Toxicol.* 19, 365-371, 2004.
- BEAUVAIS, S.L.; COLE, K.J.; ATCHISON, G.J.; COFFEY, M. Factors affecting brain cholinesterase activity in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 135, p. 249-264, 2002.
- BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. *Bioquímica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1104 p, 2004.
- BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism*, v. 49, p. 3-8, 2000.
- BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v. 74, n. 4, p. 826-33, 2011.
- BINELLI, A., RICCIARDI, F., Riva, C., Provini, A. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*. v. 62, n. 4, p. 510-519. 2006.
- BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, VOL.7 N.6, 2012.
- BOLOGNESI, C.; Hayashi, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205-213, 2011.
- BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; ROGGERI, P.; FABBRI, R. & VIARENGO, A. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Env. Mol. Mutag.*, 33: 287 - 292, 1999.
- BOLOGNESI, C., Perrone, E., Roggeri, P. & Sciutto, A. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of spill: Haven case study. *Mar. Environ. Res* 65, S287-S291, 2006.
- BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES; J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazon.*, 36: 357-364, 2006.
- BURGEOT, T.; BOCQUENÈ, G; PORTE, C.; DIMEET, J.; SANTELLA, R.M.; GARCIA DE LA PARRA, L.M.; PFHOL-LESZKOWICS, A.; RAOUX, C.; GALGANI, F. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*. v. 131, p. 125-141, 1996.
- BURGEOT, T., HIS, E.; GALGANI, F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Research*, 342, 125-140, 1995.
- CANCIO, I.; ORBEA, A.; VOLK, A.; DARIUSH FAHIMI, H.; CAJARAVILLE, M.P. Induction of peroxisomal oxidases in mussels: Comparative effects of lubricant oil and Benzo(a)pyrene structure and function in *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 149, p. 61-73, 1997.
- CARMOUZE, J. P. *O Metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas*. Edgard blücher. São Paulo: FAPESP, 1994.
- CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 47: 2123-2136, 1990.
- CASARETT, L. J.; KLASSEN, L.; DOULLS, P. *Toxicology: the basic science of poisons*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 768 p., 1996.

- CASASBELLAS, M.A.C. Depuración de Moluscos, Xunta de Galicia, v. 18, 60p., 1991.
- CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chemico-Biological Interactions*, v. 157–158, p. 277–283, 2005.
- CASTILLO-YAÑEZ, F. J., PACHECO-AGUILAR, R., GARCÍA-CARREÑO, F. L., NAVARRETE-DEL TORO, M. A., LÓPEZ, M. A. Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). *Food Chemistry [S.I.]*, v. 99, p. 252 - 259, 2006.
- CAVALCANTI, L. B. *Caracterização do Canal de Santa Cruz (Pernambuco-Brasil) em função dos parâmetros físico-químicos e pigmentos fotossintéticos*. Tese (livre docente). Recife: Univ. Federal de Pernambuco-UFPE, Dept. de Oceanografia, 1976.
- CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S.; Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, v.74, p.264-271, 2005.
- CHRISTOFOLETTI, C.A., DAVID, J.A.O. & FONTANETTI, C.S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. *Genet. Mol. Biol.*, 32: 155-158, 2009.
- CLAXTON, L.D.; HOUK, V. S.; HUGHS, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research*, v.410, p.237-243, 1998.
- COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza on line*, p. 37-42, 2009.
- COIMBRA, R.S.C.; SANTOS, C.R.S.; SARAIVA, V.B.; OLIVEIRA, M.M. Biomarcadores como ferramentas na avaliação da qualidade do pescado contaminado com metais traço. *Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego, Campos dos Goytacazes/RJ*, v. 7 n. 1, p. 153-172, jan. / jun. 2013.
- CONAMA, C. N. do M. A. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. *Ministério do Meio Ambiente*, 2005.
- CONDEPE, I. de Desenvolvimento de Pernambuco; CPRH, C. P. de Controle da P. A. *Estudo para controle ambiental nas áreas estuarinas de Pernambuco - Canal de Santa Cruz*. Recife: CONDEPE, 1982.
- COUNTRYMAN, P. I., & Heddle, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, 41, 321–332, 1976.
- DAILIANIS, S.; Domouhtsidou, G.P.; Raftopoulou, E.; Kaloyianni, M.; Dimitriadis, V.K. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, v. 56, p. 443–470, 2003.
- DEBENEST, T; GAGNÉ, F; BURGEOT, T; Blaise, C; PELLERIN, J. DNA integrity assessment in hemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) in the Saguenay Fjord (Québec, Canada). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 621-629, 2013.
- DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADA, M.; INOUE, Y.; KINAE, N.; Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutation Research*, v.627, p.178–185, 2007.
- DIXON, D.R., PRUSKY, A.M., DIXON, L.R.J.; JHA, A.N. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17, 495–507, 2002.
- DIXON, T. J.; TAGGART, J. B.; GEORGE, S. G. Application of real time PCR determination to assess interanimal variabilities in CYP1A induction in the European flounder (*Platichthys flesus*). *Mar. Environ. Res.*, 54: 267-270, 2002.
- EFFRONT, J.; PRESCOTT, S. C.; VENABLE, C. S. Biochemical catalysts in life and industry: proteolytic enzymes. Kessinger Publishing: 151 - 289, 2007.
- EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S. R. B.; AGNEZ-LIMA, L. F.; Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v.30, p.435-441, 2007.

- EL-BASSYOUNI, H. T., ABDEL MAKSOUD, S. A., SALEM, F. A., BADR EL-DEEN, REEM, ABDEL AZIZ, H., THOMAS, M. M. Evidence of oxidative stress in peroxisomal disorders. *Singapore Med J* 53(9): 608-614, 2012.
- ERGENE, S.; CAVAŞ, T.; CELIK, A.; KÖLELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A.; Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, v.16, p.385–391, 2007.
- FARMEN, E.; HARMAN, C.; HYLLAND, K.; TOLLEFSEN, K.-E. Produced water extracts from North Sea oil production platforms result in cellular oxidative stress in a rainbow trout in vitro bioassay. *Marine Pollution Bulletin*, v. 60, p. 1092–1098, 2010.
- FERREIRA, A. G., SANTOS MACHADO, A. L., ZALMON, I. R. Temporal and spatial variation on heavy metal concentrations in the bivalve *Perna perna* (Linnaeus, 1758) on the Northern Coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 47, n. 2, p. 319- 327, 2004.
- FERRER, A. 2003. Metal poisoning. *Anales Sis. San. Navarra* 26 (1), 141-153.
- FIGUEIREDO, J. A. DE ET AL. Hidrologia e biomassa fitoplanctônica nas barras orange e catuama (Canal de Santa Cruz), em itamaracá - pe: Variação nictemeral. *Arq. Cin. Mar*, Fortaleza, n. 39, p. 5–17, 2006.
- FLORES-MONTES, M. *Variação nictemeral do fitoplâncton e parâmetros hidrológicos no Canal de Santa Cruz, Itamaracá - PE*. Dissertação (mestrado em oceanografia). Recife: Univ. Federal de Pernambuco - UFPE, Centro de Tecnologia e Geociências-CTG. Pós-graduação em Oceanografia, 1996.
- FOUNTAIN, M.T., HOPKIN, S.P. A comparative study of the effects of metal contamination on Collembola in the field and in the laboratory. *Ecotoxicology*. 13(6), 573-87, 2004.
- FRACÁCIO, R.; RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; LIMA, D.; NASCIMENTO, A.P.; RODRIGUES, M.H. Abordagem ecotoxicológica. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; SILVA, J.S.V.; MARINELLI, C.E.; ABDON, M.M. (Eds.). *A bacia hidrográfica do Rio do Monjolinho*. São Carlos: Rima Editora, p. 104-113, 2000.
- FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, v. 681, p. 80–92, 2009.
- GAO, Z.; XU, H.; CHEN, X.; CHEN, H. Antioxidant status and mineral contents in tissues of rutin and baicalin fed rats. *Life Science*, v. 73, p. 1599-1607, 2003.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J.; BAYOUMI, A. E.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; MOTAS, M.; REGUERA, R. M.; ORDÓÑEZ, C.; BALAÑA-FOUCE, R.; ORDÓÑEZ, D. Alterations of the glutathione–redox balance induced by metals in CHO-K1 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 132, p. 365–373, 2002.
- GHANTA, S.; CHATTOPADHYAY, S. Glutathione as a signaling molecule - another challenge to pathogens. *Plant Signaling & Behavior*, v. 6, p. 783-788, 2011.
- Ghazala., Mahboob, S., Ahmad, L., Sultana, S., AlGhanim, K., Al-Misned, F., Ahmad, Z. Fish Cholinesterases as Biomarkers of Sublethal Effects of Organophosphorus and Carbamates in Tissues of *Labeo Rohita*. *J Biochem Molecular Toxicology* DOI 10.1002/jbt., 2014.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GOLD-BOUCHOT, G.; SIMÁ-ALVAREZ, R.; ZAPATA-PÉREZ, O.; GÜEMEZ-RICALDE, J. Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the american oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, México. *Marine Pollution Bulletin*. v. 31, n. 4-12, p. 439-445. 1995.
- GONÇALVES, A. S. Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado tabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos. 207 p. Tese (Doutorado em Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55: 352-358, 2003b.
- GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Liver phase I and phase II enzymatic induction and genotoxic responses of β -naphthoflavone water-exposed sea bass. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 52: 62-68, 2002.
- GROSICKA-MACIĄG, E.; KURPIOS-PIEC, D.; GRZELA, T.; CZECZOT, H.; SKRZYCKI, M.; SZUMIŁO, M.; RAHDEN-STARON, I. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against disulfiram-

- induced oxidative stress and apoptosis in V79 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 248, p. 210–216, 2010.
- HANZALOVA, K.; ROSSNER JR, P.; SRAM, R. J. Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter. *Mutation Research*, v. 696, p. 114–121, 2010.
- HART, K. A.; PIMENTEL, D. Environmental and economic costs of pesticide use. In: *Enciclopedia of Pest Management*. Pimentel D. ed.; Marcel Dekker: New York, NY, 237-239, 2002.
- HERMES-LIMA, M., WILLMORE, W.G., STOREY, K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylene orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 271–280, 1995.
- HÖRNBERG, A.; TUNEMALM, A.; EKSTRÖM, F. Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with organophosphorus compounds suggest that the acyl pocket modulates the aging reaction by precluding the formation of the trigonal bipyramidal transition state. *Biochemistry*, New York, v. 46, n. 16, p. 4815-4825, Feb. 2007.
- HOSHINA, M; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutation Research.*, v. 656, p. 44-48, 2008.
- INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE EXPLORATION OF THE SEA (ICES). Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants. Tromsø, 2003.
- IVANINA, A.V.; HABINCK, E.; SOKOLOVA, I.M. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 148:72-79, 2008.
- IWASAKI, Y.; SAITO, Y.; NAKANO, Y.; MOCHIZUKI, K.; SAKATA, O.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 3309-3317, 2009.
- KARLSEN, S.; HOUGH, E.; OLSEN, R. L. Structure and proposed amino-acid sequence of a pepsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54: 32 – 46, 1998.
- KENNISH, M. J. Ecology of estuaries: anthropogenic effects. Boca Raton: CRC Press. 494p., 1991.
- KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Biochemistry*, v. 81, p. 4343-4347, 1984.
- KLAUNIG, J.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 44, p. 239–267, 2004.
- KLEIN, B., LE MOULLAC, G., SELLOS, D., VAN WORMHOUDT, A. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vanammei* (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. *Journal Biochemistry Cell Biology*, 28, p. 551-563, 1996.
- KLOBUCAR, G. I. V.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D.; Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*, v.64, p.15-23, 2003.
- KOMKLAO, S., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., KISHIMURA, H., SIMPSON, B. K. Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry*, 100, p. 1580-1589, 2007.
- KRISHNAMURTHI, K.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. The Genotoxicity of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Containing Sludge Samples. *Métodos Toxicol Mech.*, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2007.
- LEMAIRE, P.; LIVINGSTONE, D.R. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends Comparat. Biochem. Physiol.* 1119-1120, 1993.
- LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, v. 48, p. 46–53, 2009.
- LIMA, E. A. M. Avaliação da qualidade dos sedimentos e prognóstico geoquímico ambiental da zona estuarina do rio Botafogo, Pernambuco. Tese (doutorado em geociências). Recife: UFPE, Pós-graduação em Geociências, 2008.
- LIN, T.; YANG, M.S. Benzo[a]pyrene-induced elevation of GSH level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human HepG2 cells. *Toxicology*, v. 235, p.1-10, 2007.

- LIRA, L. Geologia do Canal de Santa Cruz e praia submarino adjacente a Ilha de Itamaracá - Pernambuco, Brasil. Dissertação (mestrado em geociências. Porto Alegre: Univ. Federal do Rio Grande do Sul-UFGS, Inst. de Geociências, 1975.
- LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 42, p. 656–666, 2001.
- LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30, pp. 42-59, 2009.
- MAI, H. et al. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar Pollut Bull*, v. 64, p. 2663-70, 2012.
- MANSOURI, B.; EBRAHIMPOUR, M.; BABAEI, H. Bioaccumulation and elimination of nickel in the organs of black fish (*Capoeta fusca*). *Toxicology and Industrial Health*, v. 28, n. 4, p. 361-368, 2012. <http://dx.doi.org/10.1177/0748233711412425>.
- MARIA, V. L.; CORREIA, A. C.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. liver EROD induction and genotoxic responses after retene exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 61: 230-238, 2005.
- MARINHO, L. H. DOS S. ET AL. Estudo de avaliação ambiental: projeto de dragagem para a área do circuito náutico do litoral norte do Estado de Pernambuco. Emlurbe. Recife: Governo do Estado de Pernambuco, 2002.
- MARQUES SM, ANTUNES SC, NUNES B, GONÇALVES F, PEREIRA R. Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pelophylax perezi*) inhabiting a deactivated uranium mine. *Ecotoxicology* 20:1315–1327., 2011.
- MASELLA, R.; BENEDETTO, R.; VARI, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C.; Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, v. 16, n.10, p. 577-586, 2005.
- MATOS, K.S. Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano / Karina Silvia Matos. – Lavras: UFLA, 2012. 148 p. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.
- MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium - a review. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 18, n. 1, p. 77-85, 2005.
- MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, v. 244, p. 60409–60455, 1969.
- MEDEIROS, C.; KEJERFEVE, B. Hydrology of a tropical estuarine system: Itamaracá, Brazil. *Estuarine*, n. 36, p. 496–515, 1993.
- MILLER, B. G.; WOLFENDEN, R. Catalytic Proficiency: The Unusual Case of OMP Decarboxylase. *Annual Reviews in Biochemistry*, v. 71, p. 847–885, 2002.
- MIRANDA, L. B.; CASTRO, B. M.; KJERFVE, B. *Princípios de oceanografia física de estuários*. São Paulo: edusp., 2002.
- MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, 399: 135-147, 1998.
- MOLLER-MADSEN, B. Localization of mercury in CNS of the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103, 303-323, 1990.
- MONSERRAT, J. M., MARTÍNEZ, P. E., GERACITANO, L. A., AMADO, L. L., MARTINS, C. M. G., PINHO, G. L. L., CHAVES, I. S., FERREIRA-CRAVO, M., VENTURA-LIMA, J., & BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146, 221–234, 2007.
- MONSERRAT, J.M., GERACITANO, L.A., PINHO, G.L.L., VINAGRE, T.M., FALEIROS, M., ALCIATI, J.C., BIANCHINI, A. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 177–183, 2003.
- MUNIZ, J. F.; MCCAULEY, L.; SCHERER, J.; LASAREV, M.; KOSHY, M.; KOW, Y. W.; NAZAR-STEWART, V.; KISBY, G. E. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilot study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 227, p. 97–107, 2008.
- MUTCH, E.; BLAIN, P. G.; WILLIAMS, F. M. Interindividual variations in enzymes controlling organophosphate toxicity in man. *Human & Experimental Toxicology*. v. 11, p. 109-116, 1992.

- MYERS, G., DAVIDSON, P. W., COX, C., SHAMLAYE, C., CERNICHIARI, E., CLARKSON, T. W. Twenty-seven years studying the human neurotoxicity of methylmercury exposure. *Environ. Res.* 83, 275-285, 2000.
- NARBONNE, J.F.; DAUBÈZE, M.; CLÉRANDÉAU, C.; GARRIGUES, P. Scale of classification based on biochemical markers mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers*. v. 4, n. 6, p. 415-424, 1999.
- NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, London, v. 9, n. 6, p. 732- 737, June 1999.
- NASCI, C., NESTO, N., MONTEDURO, R. A., DA ROS, L. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy), *Marine Environmental Research*. v. 54, n. 3-5, p. 811-816. 2002.
- NDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: A comparative study of river Yasmuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schnn.). *The Science of the Total Environment*. v. 309, p. 105-115, 2003.
- NETO, A.S.S.R. Glutathione: Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas. Dissertação de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa, 2010
- NIGRO, M., FALLEN, A., DEL BARGA, I., SCARCELLI, V., LUCCHESI, P., REGOLI, F., FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*. v. 77, n. 4, p. 339-347. 2006.
- NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S.R., eds. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*, New York: Hemisphere, p. 335-373, 1985.
- NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S.; DATTA, A.G. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hoogly Estuary (India): seasonality and its consequences. *The Science of the Total Environment*. v. 281, p. 237-246, 2001a.
- NOAA (NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION.) Technical Memorandum International Mussel Watch. Initial Implementation. Final Phase Report. Maryland U.S.A, 63 p. 1995.
- NUNES, B., BARBOSA, A.R., ANTUNES, S.C., GONÇALVES, F., 2014. Combination effects of anticholinesterases 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.
- NUNES, M. V.; TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. *Revista de Saúde Pública*, v. 3, p. 372-383, 1998.
- NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S. K. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 7, p. 3298-3312, 2010.
- OBERHOLSTER, P. J.; BOTHA, A.-M.; CLOETE, T. E.; Biological and chemical evaluation of sewage water pollution in the Rietvlei nature reserve wetland area, South Africa. *Environmental Pollution*, p.1-9, 2008.
- OBREGON, A. D. C. 3-Alcoxi 4-hidroxi pirrolidin-2-onas, enoilcarbamatos e 3-dialcoxi fosforiloxi trialometilados: síntese e potencial inibitório sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase. 2006. 114 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- OECD, Test No. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay, 2014, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224179>.
- OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, v. 567, p. 109 -149, 2004.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., VOLLAIRE, Y., SANCHEZ-CHARDI, A., ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*. v. 74, n. 1, p. 53-69. 2005.
- PAIXAO, J. F. et al. Integrated assessment of mangrove sediments in the Camamu Bay (Bahia, Brazil). *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 74, p. 403-15, 2011.

- PAMPLONA, J. H. Avaliação dos Efeitos Tóxicos da Dipirona Sódica em Peixe *Rhamdia Quelen*: Estudo Bioquímico, Hematológico e Histopatológico. Mestrado em Farmacologia. 70 p. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Curitiba, 2009.
- PARK, E.; PARK, K. Induction of oxidative stress in human Chang liver cells by octachlorostyrene, the persistent and bioaccumulative toxicant. *Toxicology in Vitro*, v. 22, p. 367–375, 2008.
- PARK, W.H., YOU, B.R. Gallic acid induced lung cancer cell death is related to glutathione; depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicology in Vitro*, 24(5), pp. 1356-1362, 2010.
- PATOČKA, J. ET AL. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *Journal of Applied Biomedicine*, Hradec Králové, v. 3, p. 91-99, May 2005.
- PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L.L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, v. 32, n. 2, p. 225-231, 1996.
- PERILLO, G. M. E. Definition and geomorfologic classification of estuaries. in: Perillo, g. m. e., picollo, m. c., and pino-quivira (eds.). *Geomorfology of estuaries.*, Berlin, n. 1, p. 17–49, 1995.
- PHILLIPS, D.J.H.; RAINBOW, P.S. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Elsevier Science Publishers, Barking, 1993.
- PINHEIRO, M. A. et al. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environ Monit Assess*, v. 185, p. 8273-8285, 2013.
- POLARD, T., JEAN, S., MERLINA, G., LAPLANCHE, C., PINELLI, E., & GAUTHIER, L. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 144–149, 2011.
- PRITCHARD, D. W. Estuarine circulation patterns. *Proc, Am. Soc. Civ. Eng.*, n. 81, p. 1–11, 1955.
- QUEIROZ, C.; JÚNIOR, N.S. Cultivo de ostras. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Ed. ACARESC. 25p., 1990.
- QUINN, D.M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, v. 87, p. 955-979, 1987.
- RADTKE, R. The mummichog: a fish for all reasons. *Sea Frontiers*. v.5, p. 145-149. 1979 .
- RAINBOW P.S; PHILLIPS, D.J.H.; DEPLEDGE, M.H. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates: a need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Mar Pollut Bull* 21:321–324, 1990.
- RANK, J. & JENSEN, K. Comet assay on gill and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mutat. Res.*, 54: 323-329, 2003.
- RAO, M. B.; TANKSALA, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, p. 597 – 635, 1998.
- REBELO, M.F., Amaraland, M.C.R., Pfeiffer, W.C. High Zn and Cd accumulation in the oyster *Crassostrea rhizophorae*, and its relevance as a sentinel species. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1341–1358, 2003.
- REGOLI, F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 50, 351–361, 2000.
- ROCHA, T. L. et al. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res*, v. 101, p. 29-37, 2014.
- ROSMAN, Y. et al. Carbamate poisoning: treatment recommendations in the setting of a mass casualties event. *American Journal of Emergency Medicine*, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 1117-1124, Jan. 2009.
- RUSSELL, R. J. Origins of estuaries. *Estuaries*, Washington, n. 83, p. 93–99, 1967.
- SAINZ, J. C., GARCÍA-CARREÑO, F. L., HERNÁNDEZ-CORTÉS, P. *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part (B)*, 138, p. 155-162, 2004.
- SÁNCHEZ-PAZ, A., GARCÍA-CARREÑO, F. L., MUHLIA-ALMAZÁN, A., HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N. Y., YEPIZ-PLASCENCIA. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 292, p. 1-17, 2003.

- SAQUIB, Q.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; SIDDIQUI, M. A.; ABOU-TARBOUSH, F. M.; AZAM, A.; MUSARRAT, J. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol In Vitro*, 2011.
- SARKAR, A. et al. Genotoxicity of cadmium chloride in the marine gastropod *Nerita chamaeleon* using comet assay and alkaline unwinding assay. *Environ Toxicol*, v. 30, p. 177-187, 2015.
- SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 995-1014, 2005.
- SCARPATO, R., MIGLIORE, L., ALFINITO-COGNETTI, G., & BARALE, R. Induction of micronucleus in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Marine Pollution Bulletin*, 21(2), 74-80, 1990.
- SCHERER, U., FUCHS, S., BEHRENDT, H., HILLENBRAND, T. Emissions of heavy metals into river basins of germany. *Water Sci. Technol.* 47 (7-8), 251-7, 2003.
- SCHLENK, D., HANDY, R., STEINERT, S., DEPLEDGE, H., BENSON, W. Biotransformation in fishes. In: DI GIULIO, R. T., HINTON, D.E. (Eds.). *The Toxicology of Fishes*, CRC Press, Boca Raton, FL, p.153-234, 2008a.
- SHAH, M. D.; IQBAL, M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol.*, v. 48, n. 12, p. 3345-53, 2010.
- SHAHIDI, F.; JANAK KAMIL, Y. V. A. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 12: 435 – 464, 2001.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. v. 215, n. 2, p. 213 - 219, 1993.
- SILVA, C. A. R., RAINBOW, P.S., SMITH, B.D. Biomonitoring of trace metal contamination in mangrove-lined Brazilian coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae*: comparative study of regions affected by oil, salt pond and shrimp farming activities. *Hydrobiologia* 501, 199–206, 2003.
- SILVA, C.A.R.; RAINBOW, P.S.; SMITH, B.D.; SANTOS, Z.L. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. *Water Research*. v. 35, n. 17, 4072-4078, 2001.
- SILVA, C. A. R., SMITH, B. D., RAINBOW, P. S. Comparative biomonitors of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Marine Environmental Research*. In press. 2006.
- SILVA DE ASSIS, H.C., SÁNCHEZ-CHARDI, A., REIS, R. C., NICARETTA, L., MENCINAUSKI, C., JAKOBI, S. C.G., SILVA, P. H., ZAMPRONIO, A. R., PELLETIER, E., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Subchronic toxic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 19, n. 1, p. 113-120. 2005.
- SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Eds). *Genética toxicológica*. Porto Alegre, Alcance, p.167-174, 2003.
- SILVA, K.C.C.; ASSIS, C. R. D.; OLIVEIRA, V. M.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. *Aquatic Toxicology*, Amsterdã, v. 126, p. 191-197, jan. 2013.
- SILVA, L. A. *Sedimentologia do Canal de Santa Cruz - Ilha de Itamaracá - PE*. Dissertação (mestrado em geociências). Recife: Univ. Federal de Pernambuco - UFPE, Centro de Tecnologia e Geociências-CTG. P'os-graduação em Geociências, 2004.
- SILVA, R. P. F.; OLIVEIRA, V. M.; BEZERRA, R. S. Proteases digestivas (pepsina, tripsina e quimotripsina) de *Oreochromis niloticus* sensíveis a íons metálicos. *O Biológico*, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 152-152, jul-dez. 2011.
- SIMPSON, B. K. Digestive Proteases from Marine Animals. In: HAARD, N. F.; SIMPSON, B. K. (eds.), *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker, New York, NY, p. 191 – 213, 2000.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, L. E. A simple technique for quantitation follow levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, v. 175, p. 184–191, 1988.

- SINGH, S. et al. Is atropine alone sufficient in acute severe organophosphorous poisoning: experience of a north-west indian hospital. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, Deisenhofen, v. 33, n. 11, p. 628-630, Nov. 1995.
- SIU, W.H.L.; CAO, J.; JACK, R.W.; WU, R.S.S.; RICHARDSON, B.J.; XUD, L.; LAMA, P.K.S. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna perna*). *Aquat. Toxicol.*, Amsterdam, v. 66, p. 381-392, 2004.
- SOBORG, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v. 128, n. 1/3, p. 215-228, Mar. 2002.
- STEGEMAN, J.J., BROUWER, M., Di GIULIO, R.T., FÖRLIN, L., FOWLER, B.A., SANDERS, B.M. & VAN HELD, P.A. Molecular responses to environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: *Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Eds. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P. & Bergman, H.L. Lewis Publishers. p. 235-335, 1992.
- STEWART, R. E MALLEY, D. Technical evaluation of molluscs as a biomonitoring tool for the canadian mining industry. *Aquatic Effects Technology Evaluation Program (AETE)*, p. 20, 1997.
- STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715–1733, 1996.
- SUNILA, I. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Annales Zoologica Fennici*. v. 24, p. 55-69. 1987.
- SVÄRDH, L. Tissue sampling from live blue mussels, *Mytilus edulis*. A field study from the Swedish west coast. *Journal of Sea Research*. v. 322, p. 1-5. 2003.
- TABREZ, S.; AHMAD, M. Oxidative stress-mediated genotoxicity of wastewaters collected from two different stations in northern India. *Mutation Research*, v. 726, p. 15– 20, 2011.
- TAPIERO, H., TEW, K.D. The importance of glutathione in human disease. *Elsevier, Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4), pp. 145-155, 2003.
- THURMAN, H. V. E TRUJILLO, A. P. *Essentials of oceanography*. New Jersey: Prentice Hall, 527 p. Kennish, M. J. *Ecology of estuaries: anthropogenic effects*. Boca Raton: CRC Press. 1991. 494p., 1999.
- TICE, R.R. The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, pp. 315-339. In: Phillips, D.H.; Venitt, S. (Eds.), *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific Publishers, Oxford. 1995.
- TIMBRELL, J.A *Principles of biochemical toxicology*. Ed. J.A. Timbrell. Taylor & Francis, Londres. 1991.
- TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de ambientes aquáticos. *O Biológico*, v. 64, 135-142, 2002.
- TSANGARIS, C.; VERGOLYAS, M.; FOUNTOULAKI, E.; GONCHARUK, V. V. Genotoxicity and oxidativ estress biomarkers in *Carassius gibelio* as endpoints for toxicity testing of Ukrainian polluted river waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 2240–2244, 2011.
- USDA. U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Toxicological Profile for DDT, DDE and DDD*. Toxicological Profile 35, Atlanta, 2002.
- V. HEUSER, V. ANDRADE, A. PERES, L. BRAGA, J. CHIES, Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells, *Cell Biol. Int.* 32 (2008) 1223–1229., [http:// dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.07.005](http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.07.005).
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 13, p. 57–149, 2003.
- VAN DER OOST, R., OPPERHUIZEN, A., SATUMALAY, K., HEIDA, H., VERMEULEN, N. P. E. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biotasediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquatic Toxicology*. v. 35, n. 1, p. 21-46. 1996.
- VAN STRAALLEN, N.M., VAN, MEERENDONK. J.H. Biological half-lives of lead in *Orchesella cincta* (L.) (Collembola). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38(2), 213-9, 1987.

- VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, p. 178–189, 2006.
- VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, v. 160, p. 1–40, 2006.
- VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S.; Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research*, v.631, p.36–43, 2007.
- VASCONCELOS-FILHO, A. L.; SILVA, K. C.; ACIOLI, F. D. Hábitos alimentares de *Sphoeroides testudineus* (linneuas,1758) (teleostei: Tetraodontidae), no canal de santa cruz - itamaracá-pe. *Trabalhos Oceanográficos*, Recife, n. 20, p. 145:157, 1998.
- VENIER, P.; MARON, S.; CANOVA, S. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussel exposed to bezon(a) pyrene. *Mutat. Res.* 390, 33–44, 1997.
- VENTURA-CAMARGO, B. C.; MALTEMPI, P. P. P; MARIN-MORALES, M. A. The use of the cytogenetic to identify mechanisms of action of an azo dye in *Allium cepa* meristematic cells. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, v. 1, n. 3, p. 1-12, 2011.
- VIARENGO, A.; CANESI, L. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*. v. 94, p. 225-243. 1991.
- VIARENGO, A.; CANESI, L.; PERTICA, L.; LIVINGSTONE, D.R. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 187–190, 1991.
- VIEIRA, R.H.S.F. Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado. São Paulo, Varela, 47p. 2004.
- VIRARENGO, A. ET AL. A biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN wreck on marine organisms in the Ligurian sea (Italy). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 607–616, 2007.
- WALKER, C.H. Biochemical biomarkers and potentiation of toxicity. *Biotherapy*. v.11, p. 113-117, 1998.
- WALKER, M. K.; HUFNAGLE, L. C. J. R; CLAYTON, M. K.; PETERSON, R. E. An egg injection method for assessing early life stage mortality of polychlorinated dibenzo-pdioxins, dibenzofurans, and biphenyls in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 22:15-38, 1992.
- WALLNER-KERSANACH, M., THEEDE, H., EVERSBERG, U., LOBO, S. Accumulation and Elimination of trace metals in a ransplantation experiment with *Crassostrea rhizophorae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 40–45, 2000.
- Wang. Y., Chen, C., Zhao, X., Wang. Q., Qian. Y., 2015. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 122 ,81–85, 2015.
- WATSON, W.P.; MUTTI, A. Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects. *Biomarkers*, v. 9, p. 211-242, 2004.
- WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research*, v.410, p. 223-236, 1998.
- WHO/UNEP/ILO/IPCS. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004. The WHO recommended classification of pesticides by hazard. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2006., v. 19, p. 22-37, 2004.
- WIRGIN, I.; WALDMAN, J. R. Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. *Mutat. Res.*, 399: 193-219, 1998.
- WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, v. 19, p. 137–161, 1991.
- Wrisberg, M.N., Bilbo, C.M. & Spliid, H. Induction of micronuclei in haemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23, 191–205, 1992.
- Zanette, J., Monserrat, J. M., Bianchini, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 143 C, p. 187-195. 2006.
- ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G.; Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *analytica chimica acta*, v.606, p.135–150, 2008.

ANEXOS



ENVIRONMENTAL RESEARCH

A Multidisciplinary Journal of Environmental Sciences, Ecology, and Public Health

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0013-9351

DESCRIPTION

Environmental Research publishes original reports describing studies of the adverse effects of environmental agents on humans and animals. The principal aim of the journal is to assess the impact of chemicals and microbiological pollutants on human health. Both *in vivo* and *in vitro* studies, focused on defining the etiology of environmentally induced illness and to increase understanding of the mechanisms by which environmental agents cause disease, are especially welcome. Investigations on the effects of global warming/climate change on the environment and public health, as well as those focused on the effects of anthropogenic activities on climate change are also of particular interest.

Although *Environmental Research* is opened to all subjects directly related with this field, areas of special interest include:

- Air, soil, and water pollutants and health
- Biomonitoring and adverse human health effects
- Environmental and occupational medicine
- Environmental epidemiology
- Environmental microbiology
- Environmental toxicology
- Environmental transport and fate of pollutants
- Global warming/climate change
- Nanomaterials in the environment and nanotoxicology
- Risk analysis, risk assessment and risk management, and public health
- Waste treatment and disposal
- Water and wastewater management, and sewage

IMPACT FACTOR

2014: 4.373 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

MEDLINE®

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

1

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

J.L. Domingo, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Catalonia, Spain

Associate Editors:

J. Dórea, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

N. Mai, Chinese Academy of Sciences (CAS), Guangzhou, China

A. Navas-Acien, John Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA **M.S. Wolff**, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, USA

Editor Emeritus:

P.J. Landrigan

Editorial Board Members:

J. Baumgartner, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

M. S. Bloom, State University of New York (SUNY) at Albany, Rensselaer, New York, USA

C. Borrego, Universidade de Aveiro, Glória, Aveiro, Portugal

J. Burger, Rutgers University, Piscataway, New Jersey, USA

P. Bustamante, Université de La Rochelle, La Rochelle, France **M.E. Cebrián**, Cinvestav, Mexico

D.F., Mexico

A. Covaci, University of Antwerp, Wilrijk, Belgium

M. Dusinska, Norwegian Institute for Air Research, Kjeller, Norway **K.L. Ebi**, ClimAdapt, Seattle, Washington, USA

S.M. Engel, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA

B. Eskenazi, University of California at Berkeley, Berkeley, California, USA **A.R. Flegal**, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA **S.J.S. Flora**, Ministry of Defence, Government of India, Gwalior, India

F. Forastiere, Lazio Regional Health Service, Rome, Italy **A.L. Frank**, University of Texas, Tyler, Texas, USA

M.S. Goldberg, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

P. Grandjean, University of Southern Denmark, Odense C, Denmark

M. Hatzopoulou, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

G. Hoek, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

M. Horvat, Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia

M. Ikeda, Kyoto Industrial Health Association, Kyoto, Japan

M. Jerrett, University of California at Berkeley, Berkeley, California, USA

K. Kannan, State University of New York (SUNY) at Albany, Albany, New York, USA

D. Kourtas, University of Thessaly, Larissa, Greece

D.-H. Lee, Kyungpook National University, Daegu, South Korea

R.J. Letcher, National Wildlife Research Center, Ottawa, Ontario, Canada

M.P. Longnecker, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), Research Triangle Park, North Carolina, USA

L.Q. Ma, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

D. Mergler, Université du Québec à Montréal (UQAM), Montreal, Quebec, Canada **J. Namieśnik**, Technical University of Gdansk, Gdansk, Poland

A. Navas-Acien, John Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA

X. Querol, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain **M. Sakamoto**, National Institute for Minamata Disease, Kumamoto, Japan

B. Shomar, Qatar Environment and Energy Research Institute (QEERI), Doha, Qatar **E.K. Silbergeld**, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA

C. Sonne, Aarhus University, Roskilde, Denmark

J. Sunyer, CREAL, Spain

A. Sweetman, Lancaster University, Lancaster, England, UK

L.M. Toms, Queensland University of Technology, Kelvin Grove, Queensland, Australia **S. Tong**, Queensland University of Technology, Kelvin Grove, Queensland, Australia **A.M. Tsatsakis**, University of Crete, Heraklion, Greece

M. Vahter, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden **B. van Bavel**, Örebro University, Örebro, Sweden

P. Villeneuve, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada

X. Wang

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

2

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

A Multidisciplinary Journal of Environmental Sciences, Ecology, and Public Health

Environmental Research: A Multidisciplinary Journal of Environmental Sciences, Ecology, and Public Health publishes original reports describing studies of the toxic effects of environmental agents and conditions in humans and animals, including both experimental subjects and ecosystems. The principal aims of the journal are to increase understanding of the etiology of preventable disease and environmental impairments, and to increase understanding of the mechanisms by which environmental agents cause disease and ecological effects. Human impact on the biosphere is considerable and, thus, an additional aim of the journal is to explore the means by which the adverse effects of anthropocentric activities can be minimized through new initiatives or changes in policy, at the local, regional, national, and international scales.

The study of environmental health is inherently multidisciplinary and international. Therefore, the journal welcomes relevant articles in epidemiology, risk analysis and policy, environmental medicine, exposure assessment, geosciences and environmental chemistry, and wildlife biology and eco-toxicology, and ecology. Reports that bridge one or more of these disciplines are particularly encouraged, as are studies employing biological markers of exposure and/or effect.

The focus of the journal generally excludes papers that report results of toxicology studies or industrial exposures, unless these papers have clear relevance to environmental topics. The journal does not generally consider reports of a specific site or source (such as an assessment of releases or environmental contamination) unless these reports present novel or generalizable information. However, short papers can be submitted to the Journal as a "Case Report" (see below). Papers reporting on studies of human subjects must provide written assurance that the research was reviewed and approved by an appropriate institutional review board (or ethics committee) for the protection of human subjects. *Environmental Research*, in common with international practice in science, requires that all authors must, in denoting measures, utilize the metric system and SI derived units (e.g., degrees Centigrade rather than Fahrenheit; [Click here](#)).

Reports from the Field

The Journal welcomes short articles on topics of interest to environmental researchers and practitioners. Appropriate "Reports from the Field" include articles on environmental conditions, new methods for detection or analysis, updates, and case reports of human or ecosystem exposures and effects. Articles from around the world are particularly encouraged.

"Reports from the Field" should not exceed 2000 words and need not be divided into sections, although subheadings may help the reader and are encouraged. Authors must provide a short abstract (less than 75 words) and no more than two figures or illustrations, no more than 2 tables, and no more than 15 references. These papers will be peer-reviewed.

Contact Details for Submission

Authors should submit their article via the Elsevier Editorial System (EES), at <http://ees.elsevier.com/er>. You will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. Use the following guidelines to prepare your article. For any further information please contact the Author Support Department at authorsupport@elsevier.com

BEFORE YOU BEGIN

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

3

Article Content

We are expecting articles of the highest scientific quality. Editorials on what the Journal is expecting in manuscripts are described in: "On multiple comparisons and on the design and interpretation of epidemiological studies of many associations" [Click here](#). Authors are also referred to the STROBE Statement [Click here](#).

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Policy and ethics

You are requested to provide information on funding sources supporting the work described in the manuscript. For all papers dealing with research or studies on human subjects or experimental animals, evidence must be provided of review and approval by an appropriately constituted committee for human subjects or animal research.

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>. This must be stated at an appropriate point in the article.

If this information is not provided upon submission, the paper will be returned without review.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Suggestion for Reviewers

Authors must suggest a minimum of 5 names of potential reviewers who should have no conflict of interests with their work or that of their co-authors, including not working at their institution. For each suggested reviewer, authors must include: Full name and title, professional affiliation, and professional email address (avoiding yahoo, hotmail, gmail, etc. addresses). Please make sure that the email addresses you provide us with are valid and up-to-date. Give also at least one reason why the author is recommending her/his name as possible reviewer.

Please note that the journal may not use your suggestions. However, your help is appreciated and may speed up the selection of appropriate reviewers.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

4

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

5

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission of Manuscripts

Authors are requested to submit their papers electronically by using online manuscript submission available at <http://ees.elsevier.com/er>. This site will guide authors stepwise through the submission process. Authors can upload their articles as Microsoft (MS) Word, WordPerfect, or LaTeX files. It is also possible to submit an article in PostScript or Adobe Acrobat PDF format, but if the article is accepted, the original source files will be needed. Zipped files containing individual files (letter to editor, manuscript, tables, figures) can also be downloaded and the online system will extract the files and allow them to be viewed and labeled. If you submit a word processing file, the system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article for the reviewing process. Authors, reviewers, and editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary. The manuscript will be edited according to the style of the journal, and authors must read the proofs carefully.

Online submissions require:

Cover Letter: Document (Word, WordPerfect, RTF, PDF, LaTeX) containing your cover letter to the Editors. The following statement should be included in the letter to the editor: "All of the authors have read and approved the paper and it has not been published previously nor is it being considered by any other peer-reviewed journal."

Response to Reviews (Resubmissions Only): Document (Word, WordPerfect, RTF, PDF, LaTeX) detailing your response to the reviewers' and editor's comments of a previously rejected manuscript that you are re-submitting.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

6

Manuscript: Single word processing (Word, WordPerfect, RTF) or LaTeX file consisting of the title page, abstract, manuscript text, and any figure/table legends. Manuscript file should include page numbers. Please do not include line numbering as this is automatically imposed by the editorial system.

Tables: Tables should be separate from the manuscript text, and can be uploaded individually or consolidated into a single file. The file description you input below when uploading your table must include the table number or range (e.g. Table 1, Tables 2-4).

Manuscripts must be written in English. There are no submission fees or page charges. Manuscripts are accepted for review with the understanding that no substantial portion of the study has been published or is under consideration for publication elsewhere and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out; further, that any person cited as a source of personal communication has approved such a citation. Written authorization may be required at the Editor's discretion. All papers reporting on studies involving human subjects must include documentation that the study was reviewed and approved, prior to its conduct, by an appropriate institutional review board for human subjects research. No exceptions will be made to this requirement. Manuscripts that do not meet the general criteria or standards for publication in *Environmental Research* will be immediately returned to the authors without detailed review.

Environmental Research does not publish proceedings or abstracts from scientific meetings. However, the journal welcomes submissions of papers from a specific meeting under the following conditions: 1) all papers must be peer-reviewed by the journal; 2) the decision of the editors for publishing papers is final; 3) proposals for publishing such papers must be submitted in advance of the meeting; 4) the proposers must undertake preliminary review and selection of papers for submission to the Journal; and 5) these papers must be submitted as a group or within a period of three months to ensure timely and coordinated publication.

Letters to the Editor

The journal encourages thoughtful and appropriate correspondence related to any published article. In such cases, the letter will be submitted to the corresponding author of the original article for response. Both the letter and the response will be published together.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

7

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

For original full-length and short communications:

Introduction should be as concise as possible, without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

For commentaries and articles related to environmental policy, alternate formats will be accepted but should include an Introduction describing the problem in terms that a general reader will understand. All statements of fact need to be referenced and papers that make use of newly acquired data must include a Materials and methods section as well as a Results and Discussion section.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

8

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Please note that the Journal's online editorial system (EES) now offers automatic line numbering.

Page 1 should contain the article title, the names and affiliations of all authors, and the name, telephone and fax numbers, e-mail address, and complete mailing address of the person to whom all correspondence should be sent.

Page 2 should contain an abstract and five descriptive keywords.

Page 3 provides information on funding sources supporting the work described in the manuscript. For all papers dealing with research or studies on human subjects or experimental animals, evidence must be provided of review and approval by an appropriately constituted committee for human subjects or animal research. **If this information is not provided upon submission, the paper will be returned without review.**

For original full-length and short communications:

Introduction should be as concise as possible, without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced or the study design to be understood fully.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

For commentaries and articles related to environmental policy, alternate formats will be accepted but should include an Introduction describing the problem in terms that a general reader will understand. All statements of fact need to be referenced and papers that make use of newly acquired data must include a Materials and methods section as well as a Results and Discussion section.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

9

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Abbreviations should follow the usage established by *Chemical Abstracts*. Please restrict the use of acronyms, especially non-standard ones, as much as possible.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Acknowledgments should be brief and should precede the references. In agreement with the Commission on Publication Ethics, authors must submit full information on sources of funding and other support for their work that is presented in their paper.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

10

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

11A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language](#) styles, such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/environmental-research>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

References should be cited in the text by the author's name and year of publication. References should be listed alphabetically in an unnumbered list at the end of the paper in the following style:

Baecklund, M., Pedersen, N.L., Bjorkman, L., Vahter, M., 1999. Variation in blood concentrations of cadmium and lead in the elderly. *Environ. Res.* 80, 222-230.

Letourneau, D.K., 1997. Plant-arthropod interactions in agroecosystems. In: Jackson, L.E.(Ed.), *Ecology in Agriculture*. Academic Press, San Diego, pp. 239-290.

Morgan, W.K.C., Seaton, A. (Eds.), 1995. *Occupational Lung Diseases*, 3rd ed. Saunders, Philadelphia, pp. 308-373.

References drawn from the worldwide web must include the date in which the material was accessed.

The names of journals should be abbreviated according to the latest available edition of *Index Medicus* or *Chemical Abstracts Service Source Index*. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. "Manuscript in preparation," "personal communication," and "unpublished observation" should be cited as such in the text.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/envres

12

Only articles that have been published or are in press should be included in the references. "Manuscript in preparation," "personal communication," and "unpublished observation" should be cited as such in the text.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and a full list of supported databases](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our [Support Center](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

[Track your submitted article](#)

[Track your accepted article](#)

You are also welcome to contact the [Elsevier Contact Center](#).



GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

- N. Original Research Papers (Regular Papers)
- O. Review Articles
- P. Short Communications
- Q. Letters to the Editor

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles can be divided into three types:

- *Regular reviews* covering subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. These should generally not exceed 12 printed pages (approx. 6000 words).
- *Mini-reviews*. These will be short reviews or overviews (not exceeding 2-3 printed pages, approx. 1000-1500 words) on topics of above-average emerging interest.
- *Commentaries*. This label will be given to mini-reviews which clearly contain the personal opinions of the author concerned. All types of review articles will be solicited by the Reviews Editor, Prof. M.N. Moore, Plymouth Marine Laboratory, Prospect Place, The Hoe, Plymouth,

PL1 3DH, UK. E-mail: mmm@pml.ac.uk. *Short Communications* will be restricted to papers describing short, complete studies. They should not exceed 3 printed pages, including figures and tables (approx. 1500 words), and should be written in a continuous style, without subdivisions of introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgements; they should always begin with a summary. A short communication, although brief, should be a complete and final publication, and figures and tables from the communication should not occur in a later paper.

Letters to the Editor should either offer comment on a paper published in the journal, or comment on any general matter providing that this is relevant to the scope of the journal. In the case of letters commenting on published papers, the author(s) of the latter will be given the opportunity to react to the letter and the two items will subsequently be published together in the journal.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association*

(Declaration of Helsinki) for animal experiments <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out,

and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder. AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2011 www.elsevier.com/locate/aqtox 4

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the

corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing

Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

42

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at AUTHOR

INFORMATION	PACK	4	Oct	2011	www.elsevier.com/locate/aqtox	5
-------------	------	---	-----	------	--	---

43

<http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language Services

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review.

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/aqtox/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Page charges

Aquatic Toxicology has no page charges.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

44

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts,

superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional

manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions

system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2011 www.elsevier.com/locate/aqtox 6 *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

45

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full

46

postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

H. **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

I. **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of no more than 400 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2011 www.elsevier.com/locate/aqtox 7

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

47

List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) the please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2011 www.elsevier.com/locate/aqtox 8 *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your**

accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

48

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of

49

the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

N. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

O. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

P. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

50

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York. AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2011
www.elsevier.com/locate/aqtox 9

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will

be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more

detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes.

52

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2011 www.elsevier.com/locate/aqtox 10

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with

PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list

53

your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional reprints can be ordered on a reprint order form which will be sent to the corresponding author of the accepted article by the publisher.

Author's Discount

Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on most Elsevier books, if ordered directly from Elsevier.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

54



**COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND
PHYSIOLOGY - PART C: TOXICOLOGY &
PHARMACOLOGY**
An International Journal

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 1532-0456

DESCRIPTION

Part C: Toxicology and Pharmacology. This journal is concerned with **chemical** and **drug action** at different levels of organization, biotransformation of **xenobiotics**, mechanisms of **toxicity**, including reactive oxygen species and carcinogenesis, **endocrine disruptors**, natural products chemistry, and **signal transduction** with a molecular approach to these fields.

Comparative Biochemistry & Physiology, with its four journals, receives editorial direction from all the major societies in the field ([European Society for Comparative Physiology and Biochemistry](#), the [Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry](#), the [Canadian Society of Zoologists \(CBP Section\)](#), the [Society for Experimental Biology](#), the [Society for Integrative and Comparative Biology](#) (formerly the American Society for Zoologists), the [Australian and New Zealand Society for Comparative Physiology and Biochemistry](#), the [South American Society for Comparative Physiology & Biochemistry](#), the [Russian Physiological Society](#), and the [Chinese Association for Physiological Sciences](#))

Part A: Molecular & Integrative Physiology

Part B: Biochemistry & Molecular Biology

Part D: Genomics & Proteomics

AUDIENCE

Physiologists, Toxicologists, Pharmacologists, Biologists, Veterinary and Medical Researchers.

IMPACT FACTOR

2014: 2.301 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc

1

ABSTRACTING AND INDEXING

Aqualine Abstracts
Current Contents/ASCA
Current Contents/BIOMED Database
Current Contents/Life Sciences
Current Contents/SciSearch Database
EMBASE
Reference Update
Scopus
EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

Martin Grosell, University of Miami, Miami, Florida, USA

Associate Editors:

Jordi Altimiras, Linköping University, Linköping, Sweden

Gary Anderson, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada **Nicholas Bernier**, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

David Buchwalter, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA **Paul Else**, University of Wollongong, Wollongong, New South Wales, Australia **Elena**

Fabbri, Università di Bologna, Ravenna, Italy

Peter Fields, Franklin & Marshall College, Lancaster, Pennsylvania, USA **Chris Martyniuk**, University of Florida, Gainesville, Florida, USA **Donald Mykles**,

Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA **Holly Shiels**, University of Manchester, Manchester, England, UK

Aldo Viarengo, Università degli Studi del Piemonte Orientale, Alessandria, Italy

International Editorial Board:

B.M. Barnes, University of Alaska Fairbanks, Fairbanks, Alaska, USA **M. Berenbrink**, University of Liverpool, Liverpool L69 3BX, UK

F. Bozinovic, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

K. Brix, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada **L.T. Buck**, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

B. Buckley, Portland State University, Oregon, Oregon, USA

K.G. Burnett, College of Charleston, Charleston, South Carolina, USA **L.E. Burnett**, Grice Marine Laboratory, Charleston, South Carolina, USA **N.R. Bury**, King's College London, London, UK

K. Campbell, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

J.M. Conlon, Ulster University, Coleraine, Co. Londonderry, Northern Ireland, UK

• **Cooper**, Curtin University, Perth, Western Australia, Australia

• **Crossley**, University of North Texas, Denton, Texas, USA

D. Currie, Mount Allison University, Sackville, New Brunswick, Canada **S.L. Edwards**, Appalachian State University, Boone, North Carolina, USA

K. Geiser, University of New England, Armidale, New South Wales, Australia

Q. Gillis, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

K.M. Gilmour, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada **C.N. Glover**, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand

K. Greenlee, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA **H. Guderley**, Université Laval, Ste. Foy, Quebec, Canada

R.P. Henry, Auburn University, Auburn, Alabama, USA

M. Hermes-Lima, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

J.W. Hicks, University of California at Irvine, Irvine, California, USA **P.P. Hwang**, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan

A.Y.K. Ip, National University of Singapore, Singapore, Singapore

C.J. Kennedy, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada **G. Krumschnabel**, Medizinische Universität Innsbruck, Innsbruck, Austria **G.H. Lavery**, University of Delaware, Newark, Delaware, USA

J.-S. Lee, Sungkyunkwan University (SKKU), Suwon, South Korea **H.B. Lillywhite**, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

V.I. Lushchak, Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine **D.L. MacLachy**, Wilfrid Laurier University, Waterloo, Ontario, Canada

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc

2

G.B. McClelland, McMaster University, Hamilton, Canada

M. D. McDonald, University of Miami, Miami, Florida, USA

C.A. Navas, Universidade de São Paulo (USP), Sao Paulo, Brazil **K.M. O'Brien**, University of Alaska

Fairbanks, Fairbanks, Alaska, USA **B. Pinshow**, Ben Gurion University of the Negev, Beer Sheva, Israel

H.-O. Pörtner, Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Bremerhaven, Germany **G. Pyle**, University of Lethbridge, Lethbridge, Alberta, Canada

J. Richards, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

B. Roberts, University of North Texas, Denton, Texas, USA **R.M. Robertson**, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada

N. Schulte, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada **P.J. Schwarzbaum**, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

C. Scott, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

G. Seebacher, The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia

Q. Segner, Universität Bern, Bern, Switzerland

R. Serebrovskaya, Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine

K.A. Sloman, University of the West of Scotland, (West) Paisley, Scotland, UK **B.C. Small**, University of Idaho, Moscow, Idaho, USA

J.E.G. Smits, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

J. Sokolova, University of North Carolina at Charlotte, Charlotte, North Carolina, USA **G.N. Somero**, Stanford University, Pacific Grove, California, USA

Q. Suzuki, Kochi University, Kochi, Japan

N. Takei, University of Tokyo, Chiba, Japan

A. Takemura, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

N. Van Der Kraak, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

L. Vieira, University of St. Andrews, St. Andrews, Scotland, UK

E. M. Vijayan, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada **S.Q. Wang**, Peking University, Beijing, China

D. Wang, Aarhus University, Århus C, Denmark

• **Warren**, Saint Louis University, St. Louis, Missouri, USA

• **Watabe**, Kitasato University, Kanagawa, Tokyo, Japan

• **Whitehead**, University of California, Davis, Davis, California, USA

P.C. Withers, University of Western Australia, Crawley, Western Australia, Australia

T. Zenteno-Savín, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur, Mexico

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc

3

GUIDE FOR AUTHORS

Please bookmark this URL: <http://www.elsevier.com/locate/cbpc>

The journal publishes original articles emphasizing comparative and environmental aspects of the physiology, biochemistry, molecular biology, pharmacology, toxicology and endocrinology of animals. Adaptation and evolution as organizing principles are encouraged. Studies on other organisms will be considered if approached in a comparative context.

Part A. Molecular and Integrative Physiology covers molecular, cellular, integrative, and ecological physiology. Topics include bioenergetics, circulation, development, excretion, ion regulation, endocrinology, neurobiology, nutrition, respiration, and thermal biology. Studies on regulatory mechanisms at any level or organization such as signal transduction and cellular interactions and control of behaviour are encouraged.

Part B. Biochemistry and Molecular Biology covers biochemical and molecular biological aspects of metabolism, enzymology, regulation, nutrition, signal transduction, promoters, gene structure and regulation, metabolite and cell constituents, macromolecular structures, adaptational mechanisms and evolutionary principles.

Part C. Toxicology and Pharmacology covers chemical and drug action at different levels of organization, biotransformation of xenobiotics, mechanisms of toxicity, including reactive oxygen species and carcinogenesis, endocrine disruptors, natural products chemistry, and signal transduction. A molecular approach to these fields is encouraged. Measured rather than nominal exposure concentrations of toxicants must be reported whenever possible. For water-borne exposures of aquatic organisms, reporting of detailed chemistry data for the exposure waters is encouraged. When reporting data obtained from bioassays (e.g., LC50 tests), raw data (i.e., the value of the measured biological response variable(s) for each treatment and each observation time) should be submitted as online supplementary material.

Part D. Genomics and Proteomics covers the broader comprehensive approaches to comparative biochemistry and physiology that can be generally termed as "-omics", e.g., genomics, functional genomics (transcriptomics), proteomics, metabolomics, and underlying bioinformatics. Papers dealing with fundamental aspects and hypotheses in comparative physiology and biochemistry are encouraged rather than studies whose main focus is purely technical or methodological.

Naturally, a certain degree of overlap exists between the different sections, and the final decision as to where a particular manuscript will be published after passing the rigorous review process lies with the editorial office.

Types of paper

The CBP journals publish original articles and review articles.

Review articles:

Before writing their manuscripts, authors of review articles should contact one of the editors who, after consultations with the other CBP editors and/or members of the CBP Editorial Board, will provide feedback on suitability of the topic. Reviews should be topical, and serve as critical appraisals of areas of research. They should provide an up-to-date analysis of concepts and point out future directions.

Contact details for submission

Manuscripts are to be submitted to the CBP Editorial Office electronically at <http://editorialexpress.com/cbp>.

After registration, authors are asked to upload their **complete** article (including tables and associated artwork) in a **single PDF file** to be used directly for the reviewing process. The file must include line numbers; file size should be below 20 mb. Additional files with supplemental information to be published as electronic material (sequences, etc) are permitted; file number is limited to 5, but multiple files can be combined (zip or RAR). Supporting manuscripts, i.e. concurrently under consideration with other journals or *in press* must be submitted as separate PDF files.

BEFORE YOU BEGIN

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc

4

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc

5

excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription

articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Manuscripts are to be submitted to the CBP Editorial Office electronically at <http://editorialexpress.com/cbp>. After registration, authors are asked to upload their **complete** article (including tables and associated artwork) in a **single PDF file** to be used directly for the reviewing process. The file must include line numbers; file size should be below 20 mb. Additional files with supplemental information to be published as electronic material (sequences, etc) are permitted; file number is limited to 5, but multiple files can be combined (zip or RAR). Supporting manuscripts, i.e. concurrently under consideration with other journals or *in press* must be submitted as separate PDF files.

Full instructions on how to use the online submission tool are available at the above web address or can be requested by e-mail from the CBP Editorial Office CBPjnl2@gmail.com. During the submission process, authors are asked to select an appropriate section of CBP and to provide names and address (including e-mail) of at least five researchers of recognized competence who may be considered as reviewers.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of five potential referees. Note that the editors retain the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

Initial submission must be as a single, complete PDF file. When using word-processing software, it is important that the file be saved in the native format of the word processor used (e.g. doc, docx, odt, etc). The text should be in single-column format and layout of the text should be kept as simple as possible. Authors should not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, bold face, italics, subscripts, superscripts etc. can be included. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, table and text

graphics will be required for publication, but are not needed during the review process. Most word-processing programmes (Word, Word-Perfect, OpenOffice, LibreOffice, etc.) possess built in PDF makers. Resulting PDF files should be checked very carefully, especially for transposition of mathematical and other symbols and non-standard characters. SI units must be used.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Statistics

Submissions are incomplete without detailed information on independent replication of experiments, statistical approaches and statistical analysis.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Essential title page information

If submitting a Review article, write "REVIEW" at the top of the title page.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc

8

Abstract

A concise and factual abstract of a maximum of 250 words is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be a single paragraph not exceeding 250 words.

Up to eight key words, which may or may not appear in the title, should be listed in alphabetical order after the abstract. Only these key words, together with the title, will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

DNA sequences and GenBank Accession numbers

Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors must check accession numbers very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc

9

In the final **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/half-tone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

As only one figure caption is used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc

10

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language](#) styles, such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

1. All publications cited in the text should be presented in alphabetical order in a list following the text of the manuscript.
2. In the text refer to the author's name and year of publication.
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". In this list names of first authors and all co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically.
5. The List of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. Names of all authors must be included. Do not use et al. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2000a, 2000b, etc. Follow the relevant examples below.

Axelsson, M., Farrell, A.P., 1993. Coronary blood flow in vivo in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Am. J. Physiol.* 264, R963 - 971.

Hiramatsu, N., Cheek, A.O., Sullivan, C.V., Matsubara, T., Hara, A., 2005. Vitellogenesis and endocrine disruption. In: Mommsen, T.P., Moon, T.W. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 6. Environmental Toxicology, Elsevier, Amsterdam, pp. 431-471.

Lushchak, V.I. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 153, 175-190.

Moyle, P.B., Cech, J.J., 2004. *Fishes. An introduction to ichthyology*. 5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/comparative-biochemistry-and-physiology-part-c> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Reference style (see sample manuscript link)

Name and year style in the text

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Note that any (consistent) reference style and format may be used: the Publisher will ensure that the correct style for this journal will be introduced for the proof stages, the final print version and the PDF files for electronic distribution.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and a full list of supported databases.](#)

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc

12

and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available.](#) Authors of this journal will automatically receive an

Interactive Phylogenetic Trees

You can enrich your online articles by providing phylogenetic tree data files (optional) in Newick or NeXML format, which will be visualized using the interactive tree viewer embedded within the online article. Using the viewer it will be possible to zoom into certain tree areas, change the tree layout, search within the tree, and collapse/expand tree nodes and branches. Submitted tree files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. Each tree must be contained in an individual data file before being uploaded separately to the online submission system, via the 'phylogenetic tree data' submission category. Newick files must have the extension .new or .nwk (note that a semicolon is needed to end the tree). Please do not enclose comments in Newick files and also delete any artificial line breaks within the tree data because these will stop the tree from showing. For NeXML, the file extension should be .xml. Please do not enclose comments in the file. Tree data submitted with other file extensions will not be processed. Please make sure that you validate your Newick/NeXML files prior to submission. [More information.](#)

Submission check list at a glance

The following list will be useful during the final checking of an article prior to uploading it to the journal's website <http://editorialexpress.com/cbpc>. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the single, complete PDF file contains:

One author designated as the corresponding author with complete contact details (email address, full postal address, phone and fax numbers) KeywordsLine numbersAll figuresAll figure captions All tables (including title, description, footnotes)References in proper format (in text and in reference section)

For successful electronic submission, authors also have to have to hand:

cover letter (pdf or word-processing format) for upload or cut-and-paste a list of 5 or more researchers (names, affiliations and e-mail address), with expertise in the areas covered in the manuscript and who might be considered as suitable referees for the manuscript

Further considerations:

Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' References are in the correct format for this journal All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web) Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white print If only colour in the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes.

For any other information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc

stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

[Track your submitted article](#)

[Track your accepted article](#)

You are also welcome to contact the [Elsevier Contact Center](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

AUTHOR INFORMATION PACK 4 May 2016

www.elsevier.com/locate/cbpc