

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



GLAUBER PEREIRA DE CARVALHO SANTOS

Caracterização de colinesterases de *Mytella charruana* e *Litopenaeus vennamei* visando seu uso como ferramenta de biomonitoramento em estuários.

RECIFE

2020

GLAUBER PEREIRA DE CARVALHO SANTOS

Caracterização de colinesterases de *Mytella charruana* e *Litopenaeus vennamei* visando seu uso como ferramenta de biomonitoramento em estuários.

Tese apresentada ao Programa de **Pós-Graduação em Ciências Biológicas**, da **Universidade Federal de Pernambuco**, como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor em **Ciências Biológicas**.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientador: Dr. Caio Rodrigo Dias de Assis

RECIFE

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Santos, Glauber Pereira de Carvalho

Caracterização de colinesterases de *Mytella charruana* e *Litopenaeus vennamei* visando seu uso como ferramenta de biomonitoramento em estuários / Glauber Pereira de Carvalho Santos – 2021.

194 f.: il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientador: Caio Rodrigo Dias de Assis

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021. Inclui referências e anexos.

1. Estuários 2. Metais 3. Enzimas I. Bezerra, Ranilson de Souza (orient.) II. Assis, Caio Rodrigo Dias de (coorient.) III. Título

574.526365

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-163

GLAUBER PEREIRA DE CARVALHO SANTOS

Caracterização de colinesterases de *Mytella charruana* e *Litopenaeus vennamei* visando seu uso como ferramenta de biomonitoramento em estuários.

Aprovada em: 19/11/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra – Orientador
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira - Membro interno
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Alfredo de Oliveira Galvez - Membro externo
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFPE

Prof Dra. Juliana Ferreira dos Santos - Membro externo
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFPE

Dr. Tiago Barbosa Cahú - Membro externo
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

*A minha filha,
Maria Flor Soares de Carvalho,
esposa e família.*

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, pela constante oportunidade de aprendizado ao longo da pedagogia do meu espírito; Gratidão especial a minha esposa Ane Soares e a minha filha Maria Flor Soares de Carvalho, que me deram todo apoio necessário, compreenderam sempre a necessidade de ausência em alguns momentos e foram sempre incentivo; Gratidão aos meus pais, irmãos e familiares pelo apoio e incentivo; Gratidão a Josy e João Soares pelo apoio; Gratidão ao orientador Prof. Dr Ranilson Bezerra, pelo incentivo ao ingresso no Doutorado, mesmo sabendo das minhas limitações de tempo, pela indicação do co-orientador e o apoio no período; Gratidão ao co-orientador Dr. Caio Dias, que se tornou um amigo, pela sua dedicação, participação em todas as coletas de campo, apoio nas análises, ensinamentos e dedicado a este trabalho, meu muitíssimo obrigado; Gratidão ao Laboratório de Enzimologia (LABENZ) e equipe, que direta ou indiretamente contribuíram com a realização das análises; Gratidão ao Professor Dr. Gilvan Yogui por todo o apoio e ensinamentos na realização das análises de organoclorados no Laboratório Organomar do Departamento de Oceanografia; Gratidão a Profa. Dra Betânia Oliveira, ao Prof. Dr Alfredo Galvez, a Prof. Dra Juliana Santos e ao Dr Thiago Caú pela participação na banca examinadora e contribuições para melhoria do trabalho; a Prof. Dra Kelma Souza pelas contribuições na fase de qualificação; Gratidão a Adenilda e equipe da Secretaria da Pós Graduação pelo apoio nos trâmites administrativos ao longo do doutoramento; Gratidão ao Instituto de Tecnologia de Pernambuco, ao corpo Diretivo, aos amigos itepianos pelo apoio e incentivo ao longo do doutoramento; Gratidão a Felipe Albuquerque pelo apoio nas imagens e Paulo Silva, em revisões de texto; Gratidão a Dra Adélia Araújo Gerente do Labtox e ao Dr Henrique Marinho, pelo apoio nas análises de agrotóxicos realizadas no ITEP; Gratidão aos técnicos do Laboratório de Química Analítica do ITEP no apoio nas análises de metais; Gratidão ao Produtor Felipe Ferreira da Aquacultura Campo Novo por sempre abrir as portas da sua empresa para realização de pesquisas e pelo camarão utilizado na pesquisa; Gratidão aos pescadores de sururu e produtores de camarão da Ilha de Deus, Fábio e Quinho, pelo apoio na disponibilização de amostras de camarão e no apoio para as coletas de sururu.

RESUMO

O molusco bivalve *Mytella charruana* e o camarão *Litopenaeus vannamei* são espécies de importância comercial que podem acumular poluentes em seus tecidos devido ao seu comportamento sésil e bentônico, respectivamente, no sedimento. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a poluição do Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC) por metais ($n = 10$) em sedimentos e em tecidos de *L. vannamei* e *M. charruana*, além de Bifenilas Policloradas - PCBs ($n = 182$), pesticidas organoclorados e outros pesticidas ($n = 400$) em tecidos de *M. charruana*. A atividade das enzimas colinesterases (ChEs) de ambas as espécies foi caracterizada e os efeitos de pesticidas (organofosforados, carbamatos, benzoilureia e análogo do hormônio juvenil - JHA) e metais pesados investigados. Essas enzimas também foram testadas como potenciais ferramentas de biomonitoramento no SERC (*M. charruana*) e na carcinicultura (*L. vannamei*). Os resultados indicaram para as áreas de pesca do molusco, maiores concentrações de metais ($p < 0,05$) no sedimento e tecidos de *M. charruana* durante a estação seca. Dos 209 PCBs avaliados, 55 estavam acima do limite superior analítico de quantificação (LoQ) e predominou hexaclorobifelina. O metabólito pp'-DDE dominou a composição dos DDTs e os pesticidas clordanos e cipermetrina foram encontrados em *M. charruana* do SERC, porém sem riscos para segurança alimentar. A variabilidade sazonal não influenciou significativamente a acetilcolinesterase (AChE) de *Mytella charruana*. A caracterização de ChEs, de acordo com substratos específicos e inibidores seletivos, indicou predomínio da AChE em *M. charruana*, enquanto nos olhos, músculo e hepatopâncreas de *L. vannamei*, predominaram respectivamente AChE, AChE e butirilcolinesterase (BChE). Os valores de IC_{50} relacionados ao efeito *in vitro* dos agrotóxicos sobre a enzima, apresentaram maior poder inibitório do temefós ($0,53 \mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido do aldicarbe ($1,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e diflubenzuron ($1,85 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Os íons metálicos inibiram a AChE de *M. charruana* na seguinte ordem: $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Em relação ao *L. vannamei*, a AChE dos olhos foi mais sensível ao carbofurano ($1,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$), enquanto a enzima do músculo foi fortemente inibida pelo aldicarbe ($5,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e a BChE do hepatopâncreas altamente sensível ao aldicarbe ($0,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$). O efeito inibitório dos íons metálicos sobre *L. vannamei* seguiu a ordem: $\text{As}^{3+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ (olho AChE); $\text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cu}^{2+} \approx \text{Zn}^{2+}$ (AChE muscular) e $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (BChE hepatopâncreas). A AChE (músculo) e BChE (hepatopâncreas) de *L. vannamei* foram igualmente afetadas por possível carga anticolinesterásica presente nos locais de coleta. Os resultados apontam essas enzimas como biomarcadores promissores da exposição aos agentes anticolinesterásicos avaliados, ferramentas que podem ser utilizadas no biomonitoramento em estuários frente à avaliação de efeitos de contaminantes às espécies.

Palavras-chave: Metais. PCBs. Pesticidas. Acetilcolinesterase. *Mytella charruana*. *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

The bivalve mollusk *Mytella charruana* and the shrimp *Litopenaeus vannamei* are species of commercial importance that can accumulate pollutants in their tissues due to their sessile and benthic behavior, respectively, in the sediment. Therefore, this study aimed to evaluate the pollution of the Capibaribe River Estuarine System (CRES) by metals (n = 10) in sediments and tissues of *L. vannamei* and *M. charruana*, in addition to PCBs (n = 182), organochlorine pesticides and other pesticides (n = 400) in tissues of *M. charruana*. The activity of cholinesterase enzymes (ChEs) from both species was also characterized and the effects of pesticides (organophosphates, carbamates, benzoylurea and juvenile hormone analogue - JHA) and heavy metals were investigated. These enzymes were also tested as potential tool for biomonitoring in CRES (*M. charruana*) and in shrimp farming (*L. vannamei*). The results indicated for the mollusc fishing areas higher concentrations of metals ($p < 0.05$) in the sediment and tissues of *M. charruana* in the dry season. Of the 209 PCBs evaluated, 55 were above the upper analytical limit of quantification (LoQ), with a predominance of hexachlorobifeline. The metabolite pp'-DDE dominated the composition of DDTs and the pesticides chlordans and cypermethrin were found in *M. charruana* of SERC, but without risks for food security. Seasonal variability did not influence significantly acetylcholinesterase (AChE). The characterization of ChEs, according to specific substrates and selective inhibitors, indicated a predominance of AChE in *M. charruana*, whereas in the eyes, muscle and hepatopancreas of *L. vannamei*, AChE, AChE and butyrylcholinesterase (BChE) predominated, respectively. IC_{50} values related to the in vitro effect of pesticides on the enzyme, showed greater inhibitory power for temephos ($0.53 \mu\text{mol.L}^{-1}$), followed by aldicarb ($1.05 \mu\text{mol.L}^{-1}$) and diflubenzuron ($1, 85 \mu\text{mol, L}^{-1}$). The metal ions inhibited the AChE of *M. charruana* in the following order: $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. In relation to *L. vannamei*, AChE in the eyes was more sensitive to carbofuran ($1.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$), while the muscle enzyme was strongly inhibited by aldicarb ($5.2 \mu\text{mol.L}^{-1}$) and BChE hepatopancreas highly sensitive to aldicarb ($0.9 \mu\text{mol.L}^{-1}$). The inhibitory effect of metal ions on *L. vannamei* followed the order: $\text{As}^{3+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ (AChE eye); $\text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cu}^{2+} \approx \text{Zn}^{2+}$ (muscle AChE) and $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (BChE hepatopancreas). The AChE (muscle) and BChE (hepatopancreas) of *L. vannamei* were also affected by a possible anticholinesterase load present in the collection sites. The results point to these enzymes as promising biomarkers of exposure to the evaluated anticholinesterase agents.

Keywords: Metals. PCBs. Pesticides. Acetylcholinesterase. *Mytella charruana*. *Litopenaeus vannamei*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Vias para transferência de contaminantes aos organismos.....24

Figura 2 - Exemplar de *Mytella charruana*.....28

Figura 3 - Anatomia do camarão peneídeo.....30

Figura 4 - Dispersão de Poluentes Orgânicos Persistentes no ambiente.....39

Capítulo I - Análise da concentração de metais, bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas e atividade da acetilcolinesterase (AChE) de *Mytella charruana* como ferramenta de biomonitoramento no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe, Pernambuco, Brasil.

Figura 1 - Locais de coleta de *Mytella charruana* no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe.....63

Figura 2 - Grupos homólogos de PCBs em tecidos de *Mytella charruana* capturados no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC), nordeste do Brasil..... 72

Figura 3 - Comparação entre as médias totais de atividade AChE de *Mytella charruana* nos bancos de pesca de M. charruana Palácio (PL), Croa (CP) e Ponte (PP) no período sazonal.....74

Figura 4 - Valores percentuais da concentração de metais enquadradas nas faixas $\geq$ ERL e $\leq$ ERM e $\geq$ TEL e $\leq$ PEL em período seco (a) e chuvoso (b) no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC).....75

Figura 5 - Concentrações (ng g⁻¹ peso seco) dos sete congêneres do International Council for the Exploration of the Sea (ICES7) em tecidos de *Mytella charruana* no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe e estação controle em Barra de Camaragibe (BC).....85

Figura 6 - Proporção de DDT e seus metabólitos encontrados em tecidos do mexilhão *Mytella charruana* capturados no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC), nordeste do Brasil, e na mistura técnica comercializada no Brasil

(segundo	D'Amato	et	al.,
2002).....			86

Capítulo II - Acetylcholinesterase from the charru mussel *Mytella charruana*: kinetic characterization, physicochemical properties and potential as in vitro biomarker in environmental monitoring of mollusk extraction areas

Figure 1 - Sampling sites of <i>Mytella charruana</i> in the Barra de Camaragibe estuarine area.....	106
Figure 2 - K_m and V_{max} values for ChEs of <i>Mytella charruana</i> using the substrates ASCh (a) and PSCh (b). Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.....	110
Figure 3 - Optimum pH (a), optimum temperature (b) and thermal stability (c) of <i>Mytella charruana</i> ChE. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.....	112
Figure 4 - Effect of selective inhibitors on <i>M. charruana</i> ChE. (a) – BW284c51; (b) – Iso-OMPA; (c) – Eserine; (d) – Neostigmine. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.....	113
Figure 5 - Effect of carbamate pesticides (a - aldicarb; b – carbofuran; c - carbaryl) on the AChE activity of <i>M. charruana</i> . Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.....	117
Figure 6 - Effect of organophosphorus pesticides (a - chlorpyrifos; b – methylparathion; c – dichlorvos; d – diazinon; e - temephos) on the AChE activity of <i>M. charruana</i> . Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.....	118
Figure 7 - Effect of benzoylureas, pyrethroid and JHA pesticides (a - diflubenzuron; b – novaluron; c – cypermethrin; d - pyriproxyfen) on the AChE activity of <i>M. charruana</i> . Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$	119

Figure 8 - Effect of metals (a – Hg²⁺; b – Pb²⁺; c – Cd²⁺; d – Al³⁺; e – Cu²⁺; f – Zn²⁺) on the AChE activity of *M. charruana*. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean ± SD.....123

Capítulo III - Characterization of acetylcholinesterase of the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and its use as a biomarker in environmental monitoring in commercial shrimp farms

Figure 1 - Collection sites of *Litopenaeus vannamei* in the estuarine areas of Capibaribe (A) and Formoso (B) rivers139

Figure 2 - Activity of *L. vannamei* ChEs from three tissues (eye, muscle and hepatopancreas) using the substrates acetylthiocholine (ASCh), propionylthiocholine (PSCh) and butyrylthiocholine (BSCh). Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean ± SD.....144

Figure 3 - Optimum pH of *L. vannamei* ChEs from three tissues: (A) eyes; (B) muscle; (C) hepatopancreas. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean ± SD.....147

Figure 4 - Optimal temperatures of *L. vannamei* ChEs from three tissues: (A) eyes; (B) muscle; (C) hepatopancreas. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean ± SD.....148

Figure 5 - Effect of selective inhibitors on *L. vannamei* eye ChE activity. (A) – BW284c51; (B) – Iso-OMPA; (C) – Eserine. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean ± SD.....149

Figure 6 - Effect of selective inhibitors on *L. vannamei* muscle ChE activity. (A) - BW284c51; (B) – Iso-OMPA; (C) – Eserine. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean ± SD.....150

Figure 7 - Effect of selective inhibitors on *L. vannamei* hepatopancreas ChE activity. (A) – BW284c51; (B) – Iso-OMPA; (C) – Eserine. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean ± SD.....151

- Figure 8** - Effect of carbamate pesticides on *L. vannamei* ChEs activities from three tissues. (A) – Eye; (B) – Muscle; (C) – Hepatopancreas. Pesticides in the following order (left to right): aldicarb, carbaryl and carbofuran (Excepting for hepatopancreas: aldicarb, carbofuran); Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.....155
- Figure 9** - Effect of organophosphorus pesticides on *L. vannamei* ChEs activities from three tissues. (A) – Eye; (B) – Muscle; (C) – Hepatopancreas. Pesticides in the following order (left to right): chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, methyl-parathion and temephos (dichlorvos not assayed for hepatopancreas); Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.....156
- Figure 10** - Effect of benzoylureas and JHA pesticides on *L. vannamei* ChEs activities from three tissues. (A) – Eye; (B) – Muscle; (C) – Hepatopancreas. Pesticides in the following order (left to right): diflubenzuron, novaluron and pyriproxyfen (excepting for hepatopancreas: diflubenzuron and pyriproxyfen); Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.....157
- Figure 11** - Effect of metal ions on *L. vannamei* ChEs activities from three tissues. (A) – Eye; (B) – Muscle; (C) - Hepatopancreas. Metal ions in the following order (left to right): As^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} (excepting for eyes: absence of Zn^{2+} and hepatopancreas: absence of Cd^{2+}); Assays were performed in quadruplicate.....161
- Figure 12** - Comparison between ChE activities of three tissues of *L. vannamei* from two collection sites (estuarine complexes of Capibaribe and Formoso rivers: CERC and CERF, respectively). Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.....162

LISTA DE TABELAS

Capítulo I - Análise da concentração de metais, bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas e atividade da acetilcolinesterase (AChE) de *Mytella charruana* como ferramenta de biomonitoramento no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe, Pernambuco, Brasil.

- Tabela 1** - Variações do oxigênio dissolvido, pH, salinidade e temperatura (média $\pm$ DP) no SERC ao longo do período seco e chuvoso nos bancos de pesca (BP) de *Mytella charruana*.....68
- Tabela 2** - Concentrações de metais em mg kg⁻¹ (mínimo, máximo, média $\pm$ desvio padrão – DP) em amostras de sedimento de três bancos de pesca de *Mytella charruana* no SERC em períodos sazonais, frente a valores de Diretriz de Qualidade de Sedimentos (DQS) e amostras controle (*background*) de Barra de Camaragibe, Alagoas.....69
- Tabela 3** - Análise comparativa das concentrações de metais em mg kg⁻¹ (média $\pm$ DP) no sedimento de bancos de pesca de *Mytella charruana* no no SERC nos períodos seco e chuvoso, frente aos valores da Diretriz de Qualidade do Sedimento (DQS).....70
- Tabela 4** - Concentração mínima, máxima e média ($\pm$ DP) em mg kg⁻¹ de metais (peso úmido) em tecidos de *Mytella charruana* no SERC nos períodos seco e chuvoso.....70
- Tabela 5** - Média e desvio padrão das concentrações de metais em mg kg⁻¹ (peso úmido) de metais em tecidos de *Mytella charruana* de três bancos de pesca do SERC em cada período sazonal.....71
- Tabela 6** - Concentrações em peso seco (ng g⁻¹) de compostos organoclorados (PCBs, DDTs e CHLs) em tecidos de *Mytella charruana* de bancos de pesca no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe e controle em Barra de Camaragibe (BC).....72
- Tabela 7** - Comparação entre as atividades da enzima AChE de *Mytella charruana* (mU mg⁻¹) nos bancos de pesca do SERC e estação controle em Barra de Camaragibe (AL).....73

Tabela 8 - Concentrações médias de metais no sedimento de bancos de pesca de <i>Mytella charruana</i> do SERC (mg kg ⁻¹) e de outros estuários em diferentes regiões.....	76
--	----

Tabela 9 - Concentrações médias de metais em tecidos de <i>Mytella charruana</i> em bancos de pesca do SERC (mg kg ⁻¹) e em mexilhões de outros estuários em diferentes regiões.....	78
---	----

Tabela 10 - Variação da concentração de PCBs em amostras de mexilhões (ng g ⁻¹ de peso seco) em diferentes partes do globo.....	82
---	----

Capítulo II - Acetylcholinesterase from the charru mussel *Mytella charruana*: kinetic characterization, physicochemical properties and potential as in vitro biomarker in environmental monitoring of mollusk extraction areas.

Table 1 - Kinetic parameters (km and Vmax), km ratios and Vmax ratios of ChE specific substrates activities in different tissues of some mollusks specie.....	111
--	-----

Table 2 - Comparison between the IC ₅₀ values estimated for M. charruana and C. rhizophorae AChE in the presence of selective inhibitors.....	114
---	-----

Table 3 - Comparison between estimates of IC ₅₀ of M. charruana and C. rhizophorae AChE in the presence of organophosphorus, carbamate, benzoylurea, pyrethroid and JHA pesticides.....	119
---	-----

Table 4 - Inhibition parameters related to ions that exert significant inhibitory effect on some fish species.....	122
---	-----

Capítulo III - Characterization of acetylcholinesterase of the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and its use as a biomarker in environmental monitoring in commercial shrimp farms

Table 1 - Hydrobiological variables of <i>L. vannamei</i> shrimp ponds located at the estuarine complex of Capibaribe river (CERC), an urban area subjected to domestic effluents, and estuarine complex of Formoso river (CERF), a rural area with less pollution by domestic effluents.....	143
--	-----

Table 2 - Kinetic parameters (k_m and V_{max}), k_m ratios and V_{max} ratios of ChE specific substrates activities in different tissues of penaeid shrimp.....	145
Table 3 - Comparison between estimates of IC_{20} and IC_{50} of <i>L.vannamei</i> ChEs from three tissues of in the presence of organophosphorus, carbamate, benzoylurea, pyrethroid and JHA pesticides.....	152
Table 4 - Comparison between estimates of IC_{20} and IC_{50} of <i>L.vannamei</i> ChEs from three tissues of in the presence of organophosphorus, carbamate, benzoylurea, pyrethroid and JHA pesticides.....	158
Tabela 5 - Inhibition parameters related to ions that exert significant inhibitory effect on ChEs of three tissues of <i>L.vannamei</i>	160
Tabela 6. Metal concentrations ($mg.kg^{-1}$) in sediment from <i>L. vannamei</i> cultivation nurseries at the complex of Capibaribe river (CERC) and estuarine complex of Formoso river (CERF).....	164
Tabela 7 - Metal concentrations ($mg.kg^{-1}$) in <i>L. vannamei</i> shrimp from the complex of Capibaribe river (CERC) and estuarine complex of Formoso river (CERF).....	164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase

ACh – Acetilcolina

ASCh - Acetiltiocolina

BChE – Butirilcolinesterase

CPRH – Agência Estadual de Meio Ambiente

CBs – Carbamatos

ChEs - Colinesterases

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

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

DDTs - Diclorodifeniltricloroetano

GG – Cromatografia gasosa

ICP/OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma

ITEP – Instituto de Tecnologia de Pernambuco

OFs – Organofosforados

ORGANOMAR - Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Marinhos

Iso- OMPA - Tetraisopropil pirofosforamida

IC₅₀ – Concentração que inibi 50% da atividade enzimática

LABTOX – Laboratório de Agrotóxicos e Contaminantes

LABENZ – Laboratório de Enzimologia

PCBs – Bifenilas policloradas

PSCh – Propioniltiocolina

K_i - Constante de inibição

K_m- Constante de Michaelis-Menten

Tris - Tris-hidróximetil-aminometano

SERC – Sistema Estuarino do Rio Capibaribe

TEF - Fator de Equivalência Tóxica

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

UFRPE – Universidade Federal Rural de Peernambuco

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

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Geral.....	21
2.2	Específicos.....	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1	Características gerais dos estuários.....	22
3.2	Biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.....	24
3.2.1	Moluscos como organismo biomonitor.....	26
3.2.1.1	SURURU (<i>MYTELLA CHARRUANA</i>).....	27
3.3.2	Camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> como organismo biomonitor.....	30
3.2.3	Biomarcadores enzimáticos.....	32
3.2.4	Enzima colinesterase.....	34
3.2.4.1	Inibidores das AChE.....	35
3.3	Contaminantes químicos em estuários.....	38
3.3.1	Poluentes Orgânicos Persistentes.....	38
3.3.2	Pesticidas organoclorados e outros pesticidas.....	40
3.3.3	Bifenilas policloradas - PCBs.....	46
3.4.	Metais traços.....	49
3.4.1	Metais em sedimento.....	51
3.4.2	Metais em bivalves.....	52
3.4.3	Metais em camarões peneídeos.....	55
4	RESULTADOS.....	58
4.1	Análise da concentração de metais, bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas e atividade da acetilcolinesterase (AChE) de <i>Mytella charruana</i> como ferramenta de biomonitoramento no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe, Pernambuco, Brasil.....	58
4.2	Acetylcholinesterase from the charru mussel <i>Mytella charruana</i>: kinetic characterization, physicochemical properties and potential as <i>in vitro</i> biomarker in environmental monitoring of mollusk extraction areas.....	102

4.3	Characterization of acetylcholinesterase of the Pacific whiteleg shrimp Litopenaeus vannamei and its use as a biomarker in environmental monitoring in commercial shrimp farms.....	133
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	169
	REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	170
	ANEXOS.....	192

1 INTRODUÇÃO

A poluição marinha é um grande problema mundial e tem causado efeitos negativos sobre os ecossistemas (KRISHNAKUMAR et al., 2018). Os estuários, por exemplo, são ambientes marinhos que fornecem serviços ecossistêmicos e ecológicos importantes, no entanto, foram tradicionalmente utilizados como áreas de tratamento de dejetos de cidades costeiras (ODUM e BARRET, 2013).

As características hidrodinâmicas desses ecossistemas permitem constante renovação por meio da entrada de águas marinhas em seu interior (PRITCHARD, 1955), que permitem renovação e consequente melhoria da qualidade da água em ambientes eutrofizados que recebem dos afluentes e tributários da bacia hidrográfica que deságuam no estuário (FAN et al., 2020). No entanto, a crescente expansão e desenvolvimento dos centros urbanos, ampliação de atividades portuárias, industriais e lançamento de esgotos domésticos nestes ambientes, tem ocasionado aumento dos níveis de contaminação por emissões de origem antrópica (XAVIER et al., 2017).

Os metais traços ocorrem naturalmente no ambiente marinho e muitos deles, em baixas concentrações, são essenciais à vida marinha. No entanto, mercúrio (Hg), cádmio (Cd), arsênio (As), chumbo (Pb), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Cromo (Cr) e níquel (Ni) são consideradas substâncias perigosas (ATSDR, 2012), que podem ser incorporadas no sedimento e material particulado que interagem diretamente com a água e são transferidos ao longo da cadeia trófica (BARLETTA et al., 2019), ocasionando efeitos adversos aos organismos (LONG et al, 1996).

Outras substâncias, como os Poluentes orgânicos persistentes (POPs) que incluem as bifenilas policloradas (PCBs) e pesticidas organoclorados (OCPs), possuem natureza lipofílica, se acumulam em tecidos biológicos e pode ser biomagnificado na cadeia alimentar (YOGUI et al., 2018). Estas substâncias já foram amplamente utilizadas no Brasil e sua meia-vida pode ser superior a uma década (SERICANO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2007).

Dentre os grupos de animais utilizados no monitoramento biológico, os moluscos bivalves são invertebrados abundantes nos ecossistemas marinhos e estuarinos, possuem ampla distribuição geográfica e características (sésseis e de hábito alimentar por filtração de partículas) que os tornam capazes de refletir os níveis de contaminantes presentes na água e no sedimento (SOUZA et al., 2018; SAAD et al,

2019). São assim considerados eficientes indicadores de contaminação no ambiente (VAEZZADEH et al, 2017).

Em Pernambuco, o estuário do Rio Capibaribe é um dos sistemas hídricos mais importantes do estado, formado pelo rio Capibaribe, Bacia Portuária e Bacia do Pina, que recebe contribuições do rio Jordão, Jequiá e braço sul do Capibaribe (CPRH, 2018). A captura do molusco bivalve *Mytella charruana* conhecido como sururu e o cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*, são atividades importantes no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC) para socioeconomia da Região Metropolitana do Recife, em especial, para comunidades de pescadores artesanais que habitam em seu entorno (FEITOSA et al., 2009; BENTO, 2012).

Estudos realizados no SERC constataram a presença de metais pesados (BRAYNER et al., 2003; XAVIER et al., 2017; REGIS et al., 2018) e Poluentes Orgânicos Persistentes no sedimento (YOGUI et al., 2018) e em moluscos bivalves (SERICANO et al., 1995; SILVA et al., 2010; ARAUJO, 2018). O efeito adverso de um agente tóxico sobre um determinado organismo aquático pode inibir a atividade de enzimas como a acetilcolinesterase (AChE), uma serino hidrolase de função essencial na transmissão do impulso nervoso que degrada a acetilcolina em colina e ácido acético na lacuna sináptica das sinapses colinérgicas e junções neuromusculares (VIDAL et al., 2016; LOPES et al., 2019).

As enzimas colinesterases (ChEs) têm sido prospectadas como biomarcadores da exposição a esses compostos em vários estudos devido à sua sensibilidade e especificidade, principalmente em organismos aquáticos (BOCQUENÉ et al., 1990; SOUZA et al., 2018). Assim, atividades enzimáticas são inibidas por metais pesados e pesticidas organofosforados (OPs) e carbamatos (CBs), substâncias que ocasionam severos danos fisiológicos em organismos marinhos (Rickwood e Galloway, 2004; Tsangaris et al., 2010).

Dessa forma, o presente trabalho visou contribuir com informações no tocante à presença de poluentes químicos persistentes no sedimento e organismos aquáticos de importância comercial no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe, bem como, sobre o uso de enzimas colinesterases como biomarcador de exposição à contaminantes em programas de biomonitoramento no SERC.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar o biomonitoramento no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe por meio de marcadores enzimáticos de *Mytella charruana* e *Litopenaeus vannamei* e a contaminação no estuário por metais, bifenilas policloradas e pesticidas utilizando estes organismos de importância comercial como bioindicador.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a contaminação de metais traços (Al, As, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb, Ni, Mn e Zn) em sedimento e em sururu *M. charruana* e a concentração de PCBs, pesticidas organoclorados e outros pesticidas em *Mytella charruana* dos três principais bancos de pesca do molusco no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe, em períodos seco e chuvoso.
- Avaliar a concentração de metais traços (Al, As, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb, Ni, Mn e Zn) em sedimento e em camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em viveiros da Ilha de Deus às margens do SERC na Região Metropolitana de Recife, no período chuvoso;
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos e cinéticos da enzima ChEs de tecidos de *M. charruana* e *L. vannamei* e avaliar o efeito das concentrações de poluentes anticolinesterásicos sobre estes organismos de importância comercial no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe e em cultivos de camarão;
- Correlacionar a concentração dos poluentes com a atividade da enzima AChE em *M. charruana* em período sazonal e em *L. vannamei* no período chuvoso;
- Avaliar o potencial da AChE como biomarcador ambiental em programas de monitoramento ambiental no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características gerais dos estuários

Dentre os ecossistemas inseridos no bioma costeiro destacam-se os estuários (do latim *aestus*, “maré”; *aestuo*, espuma que flutua), que segundo a clássica definição de Pritchard (1967), “são corpos de água costeira, semifechados, de livre conexão com o mar aberto e dentro dos quais, a água marinha é gradativamente diluída pela água doce proveniente da drenagem terrestre”. Este ecossistema atua como importante regulador físico e químico, motivo de terem sido tradicionalmente utilizados como áreas de tratamento de esgotos de algumas cidades costeiras (ODUM e BARRETT, 2013).

Os ecossistemas de manguezais e áreas úmidas fornecem até 21 serviços ecológicos e 45 produtos naturais (RONNBÄCK, 1999), que incluem a proteção contra inundações e prevenção de erosão, além disso, os habitats dos manguezais têm um papel promotor da biodiversidade (HOGARTH, 2007). Os manguezais também são geradores de benefícios econômicos para populações humanas adjacentes, devido às atividades de turismo e pesca (BAYEN, 2012; FRANCO-DIAS et al. 2012).

Estes ecossistemas ecótonos, por serem regiões de transição com elevada produtividade biológica e cadeias alimentares, possuem importância fundamental para a manutenção da biodiversidade aquática, apresentando diversidade de fauna, flora e muitos nichos de animais herbívoros, carnívoros e detritívoros. Em razão destas características, são regiões com alto potencial de exploração por meio do extrativismo, principalmente de espécies de peixes, moluscos e crustáceos (TUNDISI e TUNDISI, 2008; LEE et al., 2014).

Alongi (2002) estimou em 181 bilhões de dólares (US\$) o valor global do habitat dos manguezais, enquanto o valor estimado para o hectare do manguezal variou de 475 US\$/ha (RÖNNBÄCK, 1999) a 10.000 US\$/ha (ALONGI, 2002), porém, apenas 6,9 % das áreas de manguezais estão protegidas (GIRI et al., 2011). Os ecossistemas tropicais de manguezais se recuperam lentamente de danos e desastres, entre 20 e 50 anos (THORHAUG, 1989), e os sintomas do estresse podem se estender por anos (SNEDAKER et al., 1996).

No Brasil a ocupação das zonas costeiras teve início com a chegada dos primeiros colonizadores europeus, que encontraram nestas áreas, condições apropriadas para o abrigo das embarcações e alimento farto, dando início à instalação dos primeiros

núcleos populacionais (SCHAEFFER-NOVELLI, 1989). No entanto, a transformação desses núcleos em cidades e importantes centros econômicos e de trocas de produtos (portos), passou a gerar os primeiros efeitos inerentes ao desenvolvimento, a exemplo do aporte de esgotos domésticos, resíduos da agricultura, efluentes industriais e degradação dos manguezais que integram estes ecossistemas, os quais estão sendo reduzidos mundialmente em taxas entre 0,16 e 0,39 % ao ano (ALONGI, 2015; HAMILTON e CASEY, 2016).

Odum (1988) destacou que esses ambientes são geralmente produtivos e abundantes em nutrientes, abrigando diversas espécies da fauna e flora marinha. Os aspectos que explicam a razão da elevada produtividade dos estuários são o fluxo das marés e o aporte de nutrientes provenientes da drenagem terrestre, importantes na sustentação de altas taxas de produção primária, cujo conhecimento sobre essa produção dá uma visão geral sobre a relação trófica e o fluxo de energia existente no ecossistema (NASCIMENTO et al., 2000; SANTOS et al., 2002).

Os ecossistemas estuarinos recebem aporte de muitos rios e riachos que contribuem com a rede hídrica das bacias hidrográficas que nele deságuam. Em geral os estuários são armadilhas eficientes de nutrientes, em parte por causa de características físicas e em parte pelas propriedades biológicas que aumenta a capacidade do ecossistema em absorver nutrientes dos dejetos, desde que a matéria orgânica tenha sido reduzida por tratamento secundário, motivo pelo qual os estuários foram tradicionalmente usados como áreas de tratamento gratuito de esgotos de algumas cidades costeiras (ODUM e BARRET, 2013).

As possíveis fontes de esgotos no ambiente marinho podem ser pontuais ou não pontuais, incluindo efluentes municipais e industriais, drenagens urbanas e agrícolas, materiais dragados e lodo de esgotos domésticos. Assim, os efeitos da eutrofização em um estuário podem ser minimizados pela diluição com as águas costeiras por meio das marés, variando de acordo com os mecanismos de circulação e fisiografia do ecossistema (CETESB, 1996). Os esgotos se apresentam como um dos maiores problemas de poluição marinha a nível global, tanto pelo volume de material poluente despejado quanto pelos problemas de saúde pública que causam (WEBER, 1992). Contribuições desses efluentes aos estuários têm causado problemas de eutrofização e redução dos teores de oxigênio dissolvido em suas águas, especialmente nos ecossistemas que estão próximos aos centros urbanos e recebem contribuições diversas (NETO et al., 2008).

Um dos serviços ecológicos mais importantes dos ecossistemas de mangue é filtrar e remover contaminantes para melhorar a qualidade da água dos ecossistemas (LEE, 2009), no entanto, o impacto de produtos químicos terrestres pode reduzir a sobrevivência e a ambiência nesses ecossistemas (DUKE et al., 2005; LEE, 2009), ocasionando efeitos tóxicos aos organismos associados por meio de substâncias não nutricionais (PETERS et al., 1997).

3.2. Biomonitoramento de ecossistemas aquáticos

Poluentes provenientes de despejos urbanos, atividades agrícolas e industriais em meio aquático podem ser detectados e quantificados através de técnicas de monitoramento (CHAPMAN et al, 1992; HARDING, 1992). Dependendo do tipo de contaminante, da sua propriedade física e química e das condições do meio, o mesmo pode manter-se em solução na água, ser adsorvido no sedimento ou absorvidos pelos organismos (Lewis et al., 2011; Figura 1).

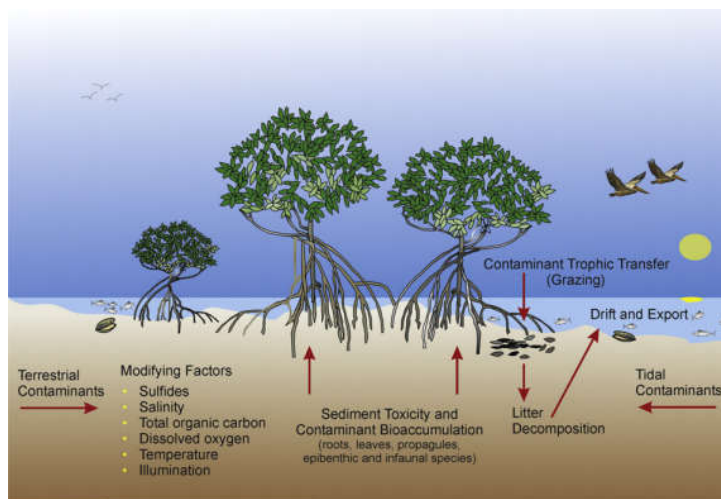


Figura 1. Vias de transferência de contaminantes aos organismos. Fonte: Lewis et al (2011).

O monitoramento da poluição marinha consiste na obtenção de uma série de dados da concentração de poluentes através de amostragens temporais, em diferentes compartimentos dos ecossistemas, seja na água, no sedimento ou na biota. O sedimento, por exemplo, possui a vantagem, em relação às outras matrizes, da ocorrência de metais em maiores concentrações e menor variabilidade temporal quando comparado à água e biota. No entanto, alguns aspectos influenciam neste compartimento de acordo com o

ambiente, sendo os mais importantes a granulometria e o carbono orgânico (NETO et al., 2008).

A deposição dos sedimentos nos estuários é decorrente do fluxo a partir dos rios, da circulação das águas costeiras e da distribuição de correntes no interior do estuário, dominando sedimentos arenosos próximos à costa e finos e argilosos com elevado teor de matéria orgânica no interior do estuário. Muitos são caracterizados por alta concentração de material em suspensão e baixa penetração de luz, cujo gradiente depende da circulação, da velocidade de sedimentação das partículas, da descarga de material pelos rios e das diferenças mecânicas entre a força da maré e vazão dos rios (TUNDISI e TUNDISI, 2008).

Em função da contaminação de ecossistemas marinhos e estuarinos estão sendo utilizadas, com frequência, técnicas de monitoramento biológico, que se caracterizam pelo uso de organismos para detectar a presença de poluentes químicos na coluna d'água, na água intersticial do sedimento e no sedimento (SALAMA et al., 2020). Os organismos podem acumular poluentes em seus tecidos ao longo do tempo (bioacumulação) através da água, do sedimento ou dos alimentos ingeridos, possibilitando ainda a análise do efeito biológico destes poluentes na espécie-alvo, correlacionando-o aos níveis de exposição (Kumar et al., 2015).

A bioacumulação é um bom indicador integrador das exposições químicas de organismos como bivalves em águas poluídas (LUOMA e RAINBOW, 2005). Os organismos bioindicadores são utilizados para quantificar a presença de contaminantes no ambiente através da bioacumulação nos seus tecidos, podendo indicar a variação temporal e espacial destes contaminantes aos quais estão expostos, bem como a concentração no meio e diferentes graus de mudança ecológica através de respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas (LI et al., 2010). Os efeitos biológicos aos organismos, oriundos da exposição aos contaminantes, compreendem respostas específicas e estão agrupadas sob a denominação de biomarcadores (RAINBOW, 1995).

No entanto, estes contaminantes podem passar de um nível trófico para outro, exibindo concentrações crescentes à medida que passa para níveis mais elevados, processo denominado de biomagnificação (Buratini e Brandelli, 2006).

3.2.1 Moluscos como organismos biomonitores

Biomonitores têm sido definidos como espécies que acumulam traços poluentes em seus tecidos, respondendo essencialmente à fração no meio que é de relevância ecotoxicológica direta, ou seja, as formas químicas biodisponíveis (RUELAS-INZUNZA e PÁEZ-OSUNA, 2000). A utilização de organismos indicadores vem sendo desenvolvida desde a década de 1930, em ensaios de campo e laboratório. Estas pesquisas visam à determinação dos efeitos sobre espécies sensíveis causados pela presença de poluentes em corpos d'água e em efluentes domésticos e industriais (DAMATO, 2001).

A utilização de espécies indicadoras pode ter diferentes propósitos, que incluem monitoramento no ponto de lançamento de efluentes, espécies residentes que são usadas como indicadores numa área de interesse potencial, espécies cuja presença indica provável poluição química e espécies utilizadas para ordenar a toxicidade relativa de substâncias químicas (DAMATO, op. cit.). Dentre os grupos de animais utilizados no monitoramento biológico destacam-se as comunidades de macroinvertebrados bentônicos. Os moluscos são o segundo grupo mais abundante de invertebrados em ecossistemas estuarinos e podem ser indicadores úteis da saúde destes ambientes, além de serem amplamente utilizados em programas de monitoramento ambiental (YUAN et al, 2010; SAAD et al., 2019).

Os moluscos bivalves filtradores têm sido empregados como organismos sentinela em estudos de monitoramento da contaminação química e da qualidade ambiental desde meados da década de 1970 (IMW, 1995). Foi nesta época que o Mussel Watch foi inicialmente proposto como um programa internacional de monitoramento marinho empregando a análise de mexilhões (ou espécies similares) como organismos sentinela da contaminação (GOLDBERG, 1975).

No biomonitoramento, a concentração de poluentes em organismos marinhos é analisada, e as respostas biológicas dos organismos são medidas para avaliar mudanças na qualidade ambiental causada por contaminantes tóxicos (KRISHNAKUMAR et al., 2018). Os moluscos têm grande importância ecológica e sua abundância e diversidade pode ser diretamente impactada por alterações nos ambientes estuarinos (PRINTRAKOON et al., 2008; SALMO et al., 2017). Diversos fatores contribuem para a utilização de moluscos na determinação dos efeitos da poluição, uma vez que possuem hábito de escavação, são detritívoros e sua alimentação por filtração de partículas em

suspensão possibilita a estes organismos absorverem e acumularem compostos químicos (ZARONI et al., 2001).

Geralmente, bivalves se alimentam de partículas em suspensão ou depositadas no sedimento, incluindo algas microscópicas, bactérias e detritos através do processo de alimentação por filtração. Eles filtram grandes quantidades da água por meio do sifão de inalação que passa pelas brânquias e é expelida pelo sifão exalante (JORGENSEN et al., 1990).

Saad et al (2019) sugerem que poluentes podem estar afetando moluscos inseridos na infauna, indicando que estudos específicos são necessários para explorar os poluentes presentes nestes sedimentos e suas concentrações, bem como os níveis de tolerância de diferentes espécies aos poluentes, visando à identificação de biomarcadores de contaminação sub-letal para uma melhor compreensão dos efeitos da poluição.

Fatores como temperatura, salinidade, luminosidade, disponibilidade de alimento e quantidade de silte e argila na água podem influenciar o seu crescimento, cujo estado nutricional inadequado pode levar a altas concentrações de metais em seus tecidos (NETO et al, 2008).

O grau de acumulação, retenção e eliminação de poluentes em organismos varia de acordo com a espécie e os diferentes filos. Moluscos bivalves, por exemplo, bioacumulam os poluentes tanto a partir da fração dissolvida quanto da particulada e não apresentam mecanismos de regulação corporal (PULLEN & RAINBOW, 1991; RAINBOW & PHILLIPS, 1993). O sistema imunológico dos moluscos bivalves é modulado por estressores ambientais e isso aumenta a suscetibilidade à infecção (Pipe e Coles, 1995). David e Fontanetti (2008) avaliando a exposição do *Mytella falcata* de estuários com diferentes graus de contaminação por poluentes, observaram alterações fisiológicas dos animais como tentativa de impedir a entrada destes poluentes.

3.2.1.1 Sururu *Mytella charruana*

O sururu *Mytella charruana* (d'Orbigny, 1846) é um molusco bivalve pertencente à família dos mitilídeos, típico de regiões estuarinas, de ocorrência registrada no México, Guiana, Equador, Venezuela, Suriname, Brasil, Uruguai e Argentina (Yuan et al, 2016) . O espécime apresenta em sua área externa tamanho médio de 3,0 cm a 5,0 cm de comprimento, 1,5 cm a 2,0 cm de largura e 1,0 cm a 1,5

cm de altura (Narchi e Galvão-Bueno, 1983). São organismos filtradores susceptíveis em absorver toxinas, poluentes químicos e biológicos, inclusive metais pesados e microrganismos presentes na água (Figura 2).



Figura 2. Exemplar de *Mytella charruana*. Imagem: Museu Nacional.

De acordo com Mediadona et al (2017) esta espécie tem uma concha simétrica, lisa e brilhante de cor predominantemente castanha escura a preta com um padrão ondulado escuro. A escultura de linhas finas concêntricas ou anéis semicirculares é visível e possui duas valvas semelhantes, unidas por uma dobradiça sem dentes na parte anterior.

O *Mytella charruana* pode ser encontrado em sedimentos lamosos, areno argilosos ou franco-argilosos de estuários e lagoas costeiras e toleram salinidades variando 2,0 e 40,0 (YAN et al., 2010) e temperaturas da água entre 6 °C e 31°C (BRODSKY et al., 2009), porém com maiores sobrevivências observadas em escala de laboratório nas temperaturas entre 20 °C e 31 °C (YUAN et al., 2016). Estes bivalves vivem enterrados desde a superfície até cerca de 10 cm de profundidade, presos às partículas de lodo, areia, pedaços de conchas e até fixados a troncos e galhos submersos. Já foram encontrados reunidos em grupos de mais de quatro indivíduos com os bissos emaranhados e formando populações abundantes em bancos com densidade populacional que variava entre 5 mil e 20 mil indivíduos/m² (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1998; NISHIDA et al., 2006).

Sua alimentação é composta por material em suspensão e matéria orgânica proveniente de detritos de macroalgas e fitoplâncton, em especial as diatomáceas e

microalgas de esqueletos silicosos (ESKINA-LEÇA, 1969; ARAUJO, 2018). Estudo realizado por Stenyakina et al. (2009) observaram que a indisponibilidade de alimentos pode desencadear a reversão sexual em indivíduos adultos de *Mytella charruana*, predominando a reversão para o sexo masculino. As proporções de sexo em populações de bivalves são geralmente próximas a 1:1, mas pode haver predominância de um dos sexos a depender do habitat e condições ambientais (MORTON, 1991).

No SERC, Maciel (2011) observou que o *M. charruana* se reproduz praticamente todos os meses, com ciclo reprodutivo contínuo e assincrônico, registrando indivíduos (n = 248) com tamanhos médios de 33,8 mm de comprimento e 15,55 de largura. De acordo com Stenyakina et al. (2009) os indivíduos entre 10,0 e 15,0 mm de comprimento

Os estuários costeiros apresentam densos bancos de moluscos bivalves com uma produtividade primária elevada e têm sido uma importante fonte de alimentos desde a pré-história (LEES, 2000). Estes animais são parte importante de uma dieta saudável, pois contêm alta qualidade de proteína e outros nutrientes, além de fácil digestão e de fácil processamento (MURCHIE et al., 2005).

O consumo de frutos do mar é cada vez mais estimulado como alternativa alimentar saudável, tanto por seu valor protéico como por seu baixo teor de gordura (NISHIDA et al., 2004). Considerado um importante alimento, são ricos em sais minerais, aminoácidos e vitaminas e consumidos como reforço alimentar, estando cada vez mais frequente nas dietas de comunidades costeiras do Brasil, apresentando-se às vezes como única fonte de proteína em comunidades de baixa renda (BOFFI, 1979; LEAL, 2008).

Na Região Metropolitana do Recife, a pesca de sururu em 2001 foi de 81 toneladas, representando 5% do desembarque total de pescados e 45 % da pesca de moluscos no período (HAZIN et al, 2004). De acordo com Cidreira Neto e Rodrigues (2018), dados fornecidos pelos pescadores de sururu *Mytella charruana* da comunidade da Ilha de Deus, uma das principais comunidades tradicionais de pescadores do SERC, são beneficiados aproximadamente 1 tonelada/dia do bivalve em período de alta temporada da pesca. De acordo com a FAO (2020), 664 milhões de toneladas de moluscos bivalves marinhos foram capturados em 2018, destacando ainda que a produção aquícola de bivalves (17,3 milhões de toneladas) tem um impacto ambiental positivo e oferece importantes benefícios nutricionais.

No Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC) o sururu *Mytella charruana* e o marisco *Anomalocardia flexuosa* são espécies alvo na captura diária de moluscos por dezenas de famílias de pescadores artesanais da região metropolitana de Recife, Pernambuco. No entanto, estudo realizado no SERC por Araújo G.F. (2018) comparando as concentrações de Poluentes Orgânicos Persistentes nas duas espécies, registrou maiores concentrações de poluentes para a espécie *Mytella charruana*, sugerindo melhor capacidade de seleção de partículas de alimento como provável causa da maior contaminação observada, o que motivou a escolha desta espécie no presente estudo.

3.2.2 Camarão *Litopenaeus vannamei* como organismo biomonitor

A indústria da carcinicultura marinha continua em expansão em todo o mundo e um grande número de espécies de crustáceos de importância comercial é encontrado dentro da ordem Decapoda (WILDER, 2019). O camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), é uma espécie originária da costa ocidental do Oceano Pacífico, da Província de Sonora no México até o sul de Tumbes no Norte do Peru (BRIGGS et al., 2004; GAINZA e ROMERO, 2020).

A produção da indústria do camarão em países da América Latina, como Brasil, desempenha papel relevante no contexto econômico da aquicultura na região (FAO, 2012). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o camarão *Litopenaeus vannamei* foi a espécie mais cultivada no mundo, atingindo uma produção de 4.966,2 milhões de toneladas em 2018, representando 53% do cultivo de crustáceos (FAO, 2020). No Brasil o *L. vannamei* foi introduzido na década de 1980 (GESTEIRA E PAIVA, 2003) e a produção em 2020 foi estimada em 90 mil toneladas pela Aliança Global da Aquicultura (GAA, 2020) e de 120 mil toneladas pela Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC, 2020). Os sistemas de cultivo no Brasil variam de extensivos a superintensivos e a região nordeste é responsável por mais de 90% da produção.

A anatomia externa do *L. vannamei* é caracterizada pela presença de um rostro duro no cefalotórax, que abriga a maioria dos órgãos internos, como coração, órgão linfóide, hepatopâncreas e estômago, enquanto o músculo se concentra no abdômen (Figura 3). Na região da cabeça, as antênulas e antenas executam funções sensoriais e na

região do tórax, os maxilípedes são destinados à alimentação, pereiópodes para locomoção e pleópodos para natação (ROSENBERRY, 2005).

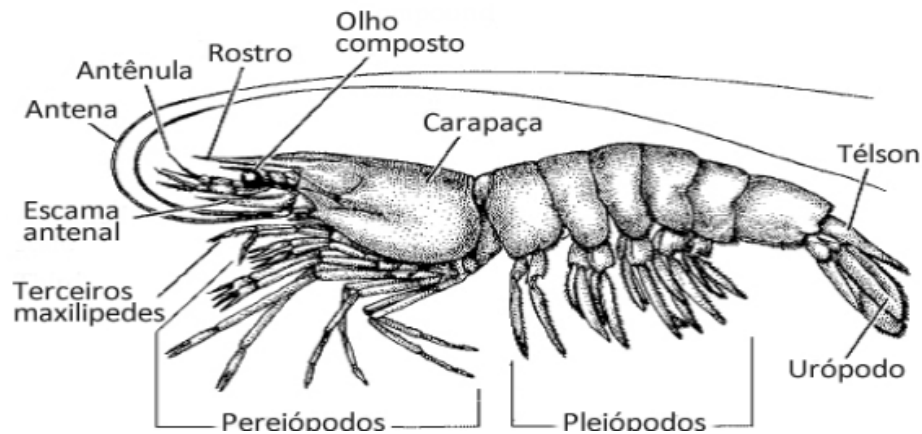


Figura 3. Anatomia do camarão peneídeo. Fonte: Gonçalves (2020).

Dependendo do ambiente de cultivo, o crustáceo pode ser exposto a condições ambientais desfavoráveis para o seu desenvolvimento e crescimento, a exemplo de significativas alterações hidrobiológicas e presença de contaminantes, o que exige cuidados e manejo adequado por parte do produtor (SANTOS et al., 2018). Parâmetros de qualidade de água em níveis ideais à espécie são relevantes para um bom desempenho zootécnico no cultivo. Estudos apontam níveis ideais de temperatura na faixa de 28 a 32 ° C, pH de 7,0 a 8,0, oxigênio dissolvido de 5,0 a 9,0 mg/L (VAN WYK e SCARPA, 1999) e salinidades entre 26 a 30 (FELIX et al., 2020).

As fazendas de cultivo de camarão estão localizadas em áreas estuarinas e, quando submetidas a efluentes domésticos e industriais, podem acumular poluentes (PAEZ-OSUNA e TRON-MAYEN, 1996). Os metais pesados que se acumularam em organismos aquáticos geralmente se originam de águas residuais lançadas em áreas costeiras e marinhas (ZABEL, 1993). A exposição direta a poluentes afeta a regulação biológica da pressão osmótica e da respiração dos organismos aquáticos (BANBANG et al., 1995). Além disso, os metais pesados também influenciam no crescimento dos crustáceos, levando à alteração da estrutura celular e redução da atividade da resposta imune, resultando em morte (NOOKALA et al., 2014). A resposta fisiológica dos organismos muda após a alteração do ambiente externo. Os crustáceos são

especialmente sensíveis à mudanças e estas quando excedem a carga biológica do organismo, mortalidades podem ser observadas (WU et al., 2017).

Efeitos adversos aos organismos cultivados podem ocorrer em áreas contaminadas. Dentre as estratégias dos crustáceis para eliminar excesso de metais, a ecdise é considerada uma importante etapa de desintoxicação, devido à sua eficiência no bombeamento de elementos metálicos através da membrana epitelial até o exoesqueleto (KETELES e FLEEGER, 2001). Muitos estudos têm buscado o monitoramento direto e a detecção da distribuição de metais pesados em águas costeiras, estuários e tecidos de animais aquáticos cultivados (TUROCZY et al., 2001), devido à toxicidade para os camarões, visto que, a exemplo do mercúrio, podem afetar a capacidade de osmorregulação que é fundamental para os organismos estuarinos (AMAND et al., 1999).

Além disso, algumas investigações foram dedicadas ao desenvolvimento e avaliação de certos parâmetros biológicos como marcadores ou indicadores específicos que refletem a existência ou quantidade de metais pesados (PEDERSON et al., 1997). Essas mortalidades são muitas vezes devido a aumento da suscetibilidade a infecções relacionadas a fatores de estresse, como a presença de outros agentes patogênicos ou condições ambientais adversas (RAMOS-CARREÑO et al., 2014).

3.2.3 Biomarcadores Enzimáticos

Os biomarcadores são importantes ferramentas de avaliação de efeitos biológicos dos poluentes, que podem ser utilizados para avaliar a exposição do animal a diferentes compostos, dando respostas em diferentes níveis de organização biológica: bioquímicos, fisiológicos, organismo e população (LAM e GRAY, 2003). Podem ser medidas em tecidos, fluidos corpóreos, ou em níveis organizacionais mais altos, fornecendo evidências de exposição e ou efeitos adversos da poluição química, por meio de métodos bioquímicos, fitoquímicos ou imunoquímicos (CARVAVILLE et al., 2000) e permitem identificar a presença de contaminantes no ambiente antes desses elementos atingirem níveis organizacionais mais altos (MONSERRAT et al., 2008).

Uma ampla gama de indicadores biológicos foram desenvolvidos para detectar e avaliar a exposição e os efeitos de contaminantes em níveis subletais, com uso de biomarcadores em programas de biomonitoramento (STEFANO et al., 2008). Devido à natureza das respostas avaliadas, considera-se que os biomarcadores podem antecipar

possíveis mudanças em nível de população, comunidade ou ecossistemas, sinalizando assim a necessidade de que medidas preventivas venham a ser adotadas a fim de que impactos adversos e irreversíveis para o ambiente sejam evitados. Assim, os biomarcadores podem ser definidos como indicadores de efeitos biológicos de curto prazo (CARVAVILLE et al, 2000).

O uso de biomarcadores em invertebrados tem sido alvo de estudos que comprovaram sua eficácia na avaliação de efeitos da poluição sobre estes organismos (Sardi et al., 2016). Os bivalves costumam ser escolhidos como espécies bioindicadoras para monitoramento de poluição e biomarcador de medições devido ao seu estilo de vida sedentário e acúmulo de poluentes (ANDRAL et al., 2005; CHEGGOUR et al., 2005), primeiros sinais de alerta sobre o estado de saúde dos bivalves expostos a contaminantes tóxicos, porque um efeito tóxico ou uma resposta aparente será verificada no nível molecular ou celular antes que seja perceptível nos níveis biológicos mais altos (KRISHNAKUMAR et al., 2018).

Pesquisas sobre o desenvolvimento e aplicação de ferramentas precisas de monitoramento, baseadas em biomarcadores para os contaminantes ambientais, foram intensificadas em diversos países desenvolvidos. Diferentes tipos de biomarcadores em bivalves marinhos tem sido utilizado para monitorar a qualidade ambiental das águas costeiras e estuarinas (BEYER et al., 2017).

Verlecar et al (2001) defenderam que a aplicação de medições de biomarcadores pode otimizar o uso de equipamentos químicos analíticos caros e complexos, uma vez que essas análises são relativamente rápidas e as enzimas são secretadas em níveis subletais de componentes tóxicos, fornecendo alerta precoce sobre degradação da qualidade ambiental, mas também medidas específicas dos compostos tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos nos materiais biológicos.

A determinação da atividade enzimática em organismos aquáticos, a exemplo da acetilcolinesterase, tem sido utilizada em diversos protocolos de estudos e análises ecotoxicológicas, como biomarcador sensível a compostos químicos, como pesticidas organofosforados e carbamatos (ASSIS et al., 2018; THANOMSIT et al., 2020) e íons metálicos (LOPES et al., 2019), permitindo a detecção de baixos níveis desses contaminantes.

3.2.4 Enzima Colinesterase

As colinesterases (ChEs, EC 3.1.1.x) são enzimas hidrolíticas do grupo das serina esterases com alta afinidade para ésteres de colina. Existem dois tipos aceitos de ChEs: acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) que difere principalmente em características como tamanho do centro ativo (mais amplo em BChE), taxa de hidrólise de acetilcolina (maior na AChE), suscetibilidade a inibidores, atividade em excesso de substrato (inibição da AChE e ativação da BChE) (ÇOKUGRAS, 2003; ASSIS et al., 2018).

AChE hidrolisa acetilcolina em taxas mais altas do que outros ésteres de colina, enquanto BChE prefere butiriltiocolina como substrato, mas também hidrolisa propioniltiocolina e acetiltiocolina em taxas apreciáveis (PARRA et al., 2006). A acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) tem uma importância crucial para o adequado funcionamento do sistema nervoso central e periférico (LIONETTO et al., 2013; ARAÚJO et al., 2016). É a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas, atuando na transmissão do impulso nervoso. As sinapses colinérgicas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), sendo importante para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas humanas (WESTFALL et al., 2006).

A atividade da AChE de invertebrados marinhos dependerá da quantidade e da modulação específica do tecido envolvido (ASSIS et al., 2020). A sua importante função no controle da transmissão sináptica e sensibilidade torna esta enzima um dos alvos moleculares mais vulneráveis à ação de agentes neurotóxicos, ampliando-se os estudos a seu respeito como possíveis biomarcadores em programas de monitoramento ambiental (ASSIS et al., 2014; ARAÚJO et al., 2016).

Em bivalves marinhos, ChEs foram claramente observadas e estudos tentaram classificá-las por preferência de substrato e sensibilidade a inibidores específicos (STEFANO et al. (2008). Isso levou à identificação de diferentes isoformas de ChE com diferentes graus de semelhança com a ChE de vertebrados (BONACCI et al., 2006). O papel fisiológico dessas enzimas é bem conhecido em vertebrados, no entanto, há uma grande diversidade de ChEs em invertebrados e sua função não está completamente elucidada (SOUZA et al., 2018).

Em programas de biomonitoramento ambiental de ecossistemas aquáticos as enzimas colinesterases são utilizadas como biomarcador ambiental, objetivando avaliar

a presença de contaminantes como metais e pesticidas (ASSIS et al., 2018). A AChE é frequentemente usada como biomarcador inicial de neurotoxicidade em invertebrados aquáticos devido à sua inibição específica por metais e pesticidas organofosforados e carbamatos (CAMPILLO et al., 2013; PERIC et al., 2017).

3.2.4.1 Inibidores da AChE

Devido ao aumento de poluentes no ambiente aquático, a avaliação e compreensão dos efeitos de substâncias químicas potenciais inibidores da AChE é fundamental para a segurança e proteção da biota aquática (LATÍCIA e GERADO, 2008). Muitos compostos estranhos a um organismo ou sistema biológico, especialmente os inseticidas, são projetados para inibir a serina esterase da AChE. Esta inibição permite o acúmulo de acetilcolina (ACh) e resulta em ativação mais intensa e prolongada do local do receptor. Portanto, a inibição da AChE no sistema nervoso periférico pode ser uma séria ameaça à saúde e sobrevivência do animal (KIRBY et al., 2000).

O acúmulo de ACh pela inibição da AChE em invertebrados induz o envenenamento dos nervos, causando sintomas como inquietação, hiperatividade, tremores, convulsões e paralisia. Portanto, a avaliação da inibição da atividade da AChE no sistema nervoso central e os tecidos do sistema nervoso periférico são considerados parte integrante do perfil de toxicidade de um composto anti-AChE (RODRÍGUEZ-FUENTES et al., 2008; UMAR e AISAMI, 2020).

Vários estudos relataram a inibição da atividade da AChE por metais e pesticidas anticolinesterásicos e biossensores baseados na atividade da AChE são propostos para analisar a presença de pesticidas sob algumas condições ambientais (SILVA et al., 2013). O potencial de alguns íons metálicos, como mercúrio, cádmio, cobre e chumbo como inibidores da atividade da AChE *in vitro* e/ou *in vivo* foram demonstrados (JEBALI et al., 2006; VIOQUE-FERNANDEZ et al., 2007; ASSIS et al., 2015; SOUZA et al., 2018; ARAUJO et al., 2018).

Os pesticidas organofosforados (OFs) e carbamatos (CBs) são inibidores específicos conhecidos da atividade catalítica da acetilcolinesterase e se ligam com afinidade variável ao sítio esterásico por fosforilação ou carbamilação, respectivamente, inativando a enzima (WOREK et al., 2005). Compostos organofosforados são considerados inibidores funcionalmente irreversíveis da AChE, uma vez que o tempo

necessário para reativar a enzima pode exceder o tempo necessário para a síntese de novas AChE. Os carbamatos, por outro lado, têm uma rápida etapa de descarbamilização, de modo que a recuperação substancial da enzima pode ocorrer em um período de tempo menor (LIONETTO et al., 2013). Esses poluentes (Ofs e CBs) não podem ser facilmente detectados por análises químicas por causa da sua relativa vida curta no meio ambiente, entretanto, seus produtos da degradação ambiental podem ser muito prejudiciais, mantendo, em muitos casos, a atividade anticolinesterásica (PEHKONEN e ZHANG, 2002).

Os animais expostos a altos níveis de organofosforados e carbamatos podem desenvolver a chamada síndrome aguda colinérgica (KARALIEDDE et al., 2001) por acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica e bombardeio de seus receptores, resultando em uma gama de efeitos neurotóxicos (WHITEHEAD et al., 2005). Os carbamatos causam sintomas de intoxicação semelhantes às dos organofosforados, apresentando diferenças na duração e intensidade da toxicidade. Os efeitos moderados dos carbamatos comparativamente aos dos organofosforados devem-se ao fato de inibirem de forma reversível a acetilcolinesterase (hidrólise com regeneração da enzima) e serem metabolizados *in vivo* (JEBALI et al., 2013).

A ação anticolinesterásica desses pesticidas (OPs e CBs) ocasiona, concomitantemente, a inibição da AChE do sistema nervoso central e periférico e as inibições da AChE eritrocitária (ASSIS et al., 2010). Dependendo das doses, isso pode levar a uma série de efeitos deletérios que podem culminar em insuficiência respiratória e morte (WHO, 1986). A afinidade do grupo da serina hidroxila no sítio ativo (sítio esterásico) em relação ao inibidor é outro aspecto importante a ser considerado.

Alguns compostos têm um efeito direto sobre a enzima, enquanto outros, como os pesticidas paration ou clorpirifos, têm pouca capacidade de inibir diretamente a AChE, necessitando de biotransformação para serem ativados (LIONETTO et al., 2013). A atividade da AChE também pode ser afetada por outros pesticidas de diferentes famílias químicas, como piretróides, triazinas, paraquat e benzoilureia. Todavia, seus modos de ação envolvem outros mecanismos (COTTAGE e GUNNING, 2004; MADUENHO e MARTINEZ, 2008).

Se a AChE é inibida, a acetilcolina (ACh) se acumula e os impulsos nervosos não podem ser interrompidos, causando contração muscular prolongada e como consequência, pode ocorrer paralisia e morte do organismo (DI GIULIO e HINTON, 2008). A investigação do efeito de inibidores da AChE e outras substâncias

interferentes, é de suma importância para identificar a utilidade dessa enzima como uma ferramenta no monitoramento ambiental e identificar seu potencial para detectar a presença de contaminantes no ambiente e prevenir que estes causem danos mais elevados (MONSERRAT et al, 2003; SILVA et al, 2013).

A Food and Agriculture Organization - FAO destacou que uma inibição da atividade colinesterásica a partir de 20% caracteriza a ação de agentes anti-colinesterásicos, e que após 50% de inibição os sinais clínicos são visualizados e acima de 90% de inibição, verifica-se a morte do organismo (FAO, 2007).

Por um longo período o monitoramento e avaliação de ambientes aquáticos baseava-se principalmente em medições químicas e físicas da qualidade da água, que se limitava a avaliar as condições do ambiente no momento da coleta, não refletindo possíveis eventos de médio e curto prazo (HEATH e CLAASSEN, 1999). Os níveis subletais de poluentes geralmente causam efeitos bioquímicos ou fisiológicos no organismo. Informações sobre esses efeitos auxiliam identificar a causa tóxica antes que mudanças dramáticas (por exemplo, mortalidade em massa) ocorram na população natural do ecossistema aquático. Antes que possam ocorrer mortalidades em organismos, os biomarcadores de saúde e efeitos tóxicos subletais podem subsidiar relevantes informações (COLOVIC et al., 2013).

A inibição da colinesterase foi testada em várias espécies de organismos aquáticos, uma vez que refletem o impacto ambiental, mesmo quando esses compostos não estão mais presentes na água, devido ao fato deles frequentemente permanecerem ligados à enzima (ASSIS et al, 2015; ARAÚJO et al., 2016). O uso de biomarcadores de ChEs em moluscos foi reportado em diversos trabalhos que relataram o efeito da exposição desses organismos a OPs e CBs (GALLOWAY et al., 2002; VALBONESI et al., 2003; BOLTONWARBERG et al., 2007; SOLÉ et al., 2010; SOUZA et al., 2018) com vistas a avaliar os efeitos exercidos por tais compostos neurotóxicos (BINELLI et al., 2006; COOPER e BIDWELL, 2006; BOLTON-WARBERG et al., 2007).

Em camarões marinhos *L. vannamei*, um estudo medindo a atividade AChE sugeriu o uso da enzima como um indicador da qualidade ambiental e saúde dos animais em ambientes sujeitos a presença desses contaminantes, em especial os pesticidas organofosforados e carbamatos (ROCHE et al., 2005). Estudos indicaram que camarões peneídeos expostos a concentrações subletais de pesticidas mostram alterações comportamentais, como inquietação e hiperexcitabilidade, tremor nos apêndices, movimentos descoordenados de natação e espasmos (REDDY e RAO, 1990;

PARRA et al, 2006). Estas mudanças, em geral, eram mais aparentes com o aumento das concentrações de pesticidas e foram consideradas como um efeito direto consequência da ação dos agrotóxicos no sistema nervoso central (TU et al., 2010).

Lignot et al. (1998) não observaram mudanças significativas na atividade da AChE em camarões de *L. vannamei* submetidos a concentrações subletais de fenitrothion. Por outro lado, a atividade AChE diminuiu em camarões *Litopenaeus stylirostris* submetidos a este inseticida. Roche et al., (2005) e Garcia de La Parra et al., (2006) indicaram que em *L. vannamei* os níveis de inibição iguais ou superior a 50% são geralmente considerados como indutores de efeitos irreversíveis, enquanto as inibições abaixo deste valor são consideradas reversíveis, assumindo que os organismos são capazes de recuperar suas funções normais após o efeito tóxico.

A maioria dos estudos da atividade de ChE em organismos aquáticos foi realizada em tecidos como músculos, cérebro e guelras. Em camarões *Litopenaeus vannamei* os olhos também foram considerados uma boa alternativa para estudos de biomarcadores, devido à sua alta atividade nervosa e conteúdo de acetilcolinesterase, tornando um tecido adequado para uso em estudos com este biomarcador (PARRA et al., 2006).

O sucesso do uso de biomarcadores a partir da inibição da AChE para avaliar o efeito da exposição a substâncias químicas decorre do fato desta técnica atender a um número de características necessárias para uma aplicação bem-sucedida como biomarcador de uma resposta biológica em biomonitoramento: fácil medição, proporcionalidade em relação a quantidade de poluentes e correlação com efeitos adversos à saúde (LIONETTO et al., 2013).

3.3 Contaminantes químicos presentes em estuários

3.3.1 Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs)

Após a Segunda Guerra Mundial, os cientistas começaram a reconhecer que, certos poluentes químicos foram capazes de persistir no meio ambiente por muito tempo, migrando no ar, água, solo e sedimentos e acumulando a níveis que podem prejudicar a vida selvagem e saúde humana (MANAHAN, 2000). A liberação de poluentes orgânicos persistentes (POPs) no meio ambiente é uma questão de preocupação global, pois os produtos químicos são estáveis por um período prolongado

(NGUYEN et al, 2020), resultando em seu acúmulo em águas estuarinas, sedimentos e biota (ANIN et al., 2017).

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são compostos orgânicos halogenados, contendo substituições de flúor, cloro ou bromo nas estruturas químicas, divididos em três grandes grupos: praguicidas, produtos industriais e subprodutos da produção e uso ou incineração de organohalogenados, este último produzido de maneira não intencional (Yogui et al, 2020). Os POPs possuem características de persistência, possibilidade de serem transportados por longas distâncias, capacidade de bioacumulação e toxicidade para organismos vivos e seres humanos (UNEP, 2019) (Figura 4).

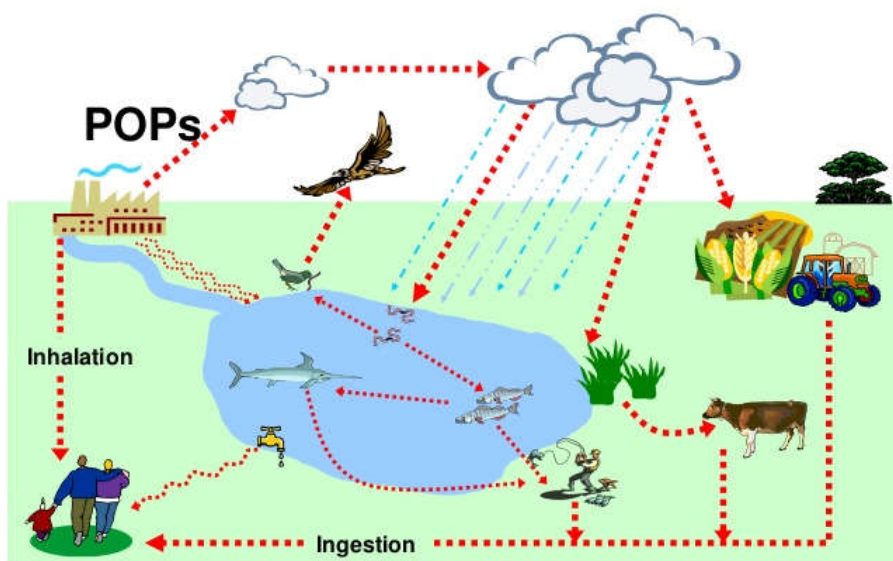


Figura 4. Dispersão de POPs no ambiente. (Fonte: Waters, 2020)

A Convenção de Estocolmo foi o ambiente de discussão por diversos países com foco na eliminação e/ou restrição dos POPs, seus estoques e resíduos, a redução da liberação de suas emissões não intencionais no meio ambiente, além da identificação e gestão de áreas contaminadas por essas substâncias. Um total de 100 países a ratificaram e teve o amparo do Programa Ambiental das Nações Unidas – UNEP (MMA, 2015).

Dentre as substâncias que compõem os POPs, destacam-se: Aldrina, Endrina, Dieldrina, Clordano, Diclorodifeniltricloroetano (DDT), Heptacloro, Hexaclorobenzeno (BHC), Mirex, Toxafeno, Bifelino policlorado (PCB), Furanos e Dioxina. Uma variedade de POPs, especialmente inseticidas organoclorados e bifenilas policloradas

(PCBs), oriundos principalmente de atividades antrópicas, têm sido amplamente utilizados em uma variedade de produtos (MATO et al., 2001). Esses compostos podem atingir os ambientes por meio de atividades agrícolas, industriais e urbanas, tornando-se uma ameaça aos ecossistemas (PARIATAMBY e KEE, 2016) incluindo estuários (BARLETTA et al., 2019).

3.3.2 Pesticidas organoclorados e outros pesticidas

Pesticida é uma palavra geral que descreve vários grupos de inseticidas, fungicidas, herbicidas, produtos químicos de jardins, desinfetantes domésticos e rodenticidas, utilizados contra diferentes pragas (EL NEMR et al., 2012). A história do uso de pesticidas remonta há muitos séculos, e compostos a base de enxofre, arsênio, mercúrio, chumbo, sulfato de nicotina, piretro e rotenona foram utilizados no controle de pragas ao longo dos séculos. Porém, foi a partir da descoberta do diclorodifeniltricloroetano (DDT) em 1939 e o desenvolvimento de hidrocarbonetos clorados e pesticidas organofosforados durante a Segunda Guerra Mundial (1940 e 1945), que ocorreu avanço no controle de pragas (RATHORE E NOLLET, 2012).

No princípio, o DDT foi considerado um pesticida ideal devido a alta toxicidade para insetos, grande efeito residual e baixo custo financeiro, características que incentivaram o desenvolvimento e introdução de outros pesticidas organoclorados no mercado, a exemplo do hexaclorociclohexano (HCH), dieldrin, clordano, endrin, endosulfan e mirex (YOGUI et al., 2020). Porém, a partir da década de 1960 anomalias congênitas em animais e humanos foram observadas e os impactos à saúde humana e ao meio ambiente vieram à tona, intensificados pela publicação do livro Primavera Silenciosa da escritora Rachel Carson em 1962. A partir destes fatos, diversos países passaram a estudar os efeitos e banir o uso do DDT (RATHORE e NOLLET, 2012).

Segundo a Organização Pan Americana de Saúde a utilização dos agrotóxicos na agricultura inicia-se na década de 1920, período com poucas informações sobre efeitos toxicológicos, mas foi a partir da segunda guerra mundial que seu uso foi intensificado, chegando a atingir dois milhões de toneladas ao ano no mundo (OPAS/OMS, 1997). No Brasil, o uso de pesticidas começou em 1946 a partir da aplicação de HCH e DDT no combate a pragas nas lavouras de café e algodão (MMA, 2006). Os pesticidas foram regulamentados pela Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89 e Decreto 4.074 de 04/01/2002, requisito legal que definiu pesticidas e agrotóxicos como “produtos e agentes de

processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

O país registrou uso dos pesticidas endosulfan, aldrin, endrin, heptacloro, mirex, clordano e toxafeno na agricultura, mas devido as suas propriedades fungicidas, o pentaclorofenol (PCP) também foi bastante utilizado como preservativo de madeira (ALMEIDA et al., 2007). Em campanhas de saúde pública, somente DDT e HCH foram aplicados no combate a vetores de doenças tropicais como malária, dengue, febre amarela, leishmaniose e doença de Chagas. O DDT no Brasil foi considerado fundamental para a erradicação do mosquito *Aedes aegypti* (transmissor da dengue e febre amarela) entre as décadas de 1950 e 1960 (YOGUI et al, 2020).

O Brasil é considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo desde 2009 e atingiu seu recorde no registro de agrotóxicos em 2019, quando foram registradas 474 novas moléculas, segundo levantamento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2020). Desse total, 26 foram pesticidas inéditos (5,4%) e 448 genéricos (94,5%), ou seja, baseados em princípios ativos inéditos ou ingredientes já existentes no mercado. Até o primeiro semestre de 2020 o país registrou 150 agrotóxicos e, destes, um número próximo a 10% encontra-se na classificação de altamente tóxico e extremamente tóxico. Dentre as substâncias mais utilizadas, destacam-se o herbicida Glifosato, o fungicida Mancozebe e o inseticida Acefato (MAPA, *op.cit*).

Os compostos de elevada toxicidade registrados para uso em culturas agrícolas no combate as pragas ocasionam efeitos adversos ao meio ambiente, especialmente quando são aplicados sem conhecimento técnico em doses maiores que as recomendadas pelos fabricantes, em busca de maior eficiência. Efeitos adversos ao ambiente e aos organismos podem ser graves e ainda não conhecidos (DELLAMATRICE e MONTEIRO, 2014). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que aproximadamente 193 mil pessoas no mundo percam a vida todos os anos por exposição a substâncias químicas nocivas (OMS, 2019).

Os efeitos sobre a saúde podem ser agudos ou crônicos ou resultantes de uma exposição continuada a doses relativamente baixas de um ou mais produtos (MS, 2003). Estima-se que os agrotóxicos causem anualmente 70 mil intoxicações agudas e crônicas que evoluem para óbito em alguns países incluindo o Brasil (DINDAR et al., 2010), com estimativas de mais de 400 mil pessoas contaminadas por agrotóxicos e cerca de 4 mil mortes por intoxicações agudas (BENDOR et al., 2009).

Os pesticidas são agrupados em sete classes distintas quanto as suas propriedades químicas, incluindo organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, aminas, anilinas e compostos heterocíclicos azotos (BARBOSA et al., 2018). A solubilidade em água, pressão de vapor, coeficiente de partição n-octanol-água e constante de ionização ácido ou base, são propriedades físicas e químicas que afetam o seu comportamento no ambiente e, quanto maior a solubilidade, maior a tendência de ocorrer transporte no ambiente. No solo, os processos de retenção (sorção, absorção), transformação (decomposição, degradação) e transporte (deriva, volatilização, lixiviação, escoamento superficial) determinam o destino, a persistência e a eficiência agrônômica do pesticida no solo (LAVORENTI et al., 2003).

No ar, após a aplicação, os pesticidas podem atingir a atmosfera por deriva e/ou volatilização na forma de gotas ou vapor (MILLER, 2004), motivo pelo qual também são encontrados em água de chuva (DUBUS et al, 2000), o que sugere seu transporte por longas distâncias e possibilita contaminar diversos compartimentos pela água da chuva, em concentrações de leves a tóxicas (REGITANO e BONFLEUR, 2011).

Os fatores que afetam o percurso dos pesticidas no meio ambiente são a forma de uso desses pesticidas, características ambientais e propriedades físico-químicas do princípio ativo (LAABS et al., 2002). No entanto, sob o ponto de vista toxicológico, a classificação mais importante é feita com base no mecanismo de ação. Segundo esta classificação, os agentes anticolinesterásicos (organofosforados e carbamatos) merecem destaque devido à sua grande utilização e alta toxicidade, quando comparados a outros compostos. Tanto os organofosforados quanto os carbamatos possuem um mecanismo comum de ação, baseado na inibição da enzima acetilcolinesterase (ALVES e SILVA, 2003).

Os ecossistemas aquáticos são contaminados por escoamento superficial e sedimentos transportados do solo tratado, resíduos industriais descartados de fábricas, aplicação direta por dispersores aéreos na cultura agrícola e descarga de lixo municipal (Ray e Ghosh, 2006). Nos rios, os agrotóxicos são carregados ao longo do curso d'água e

as maiores rotas de dispersão dos pesticidas são o escoamento superficial e drenagem, influenciados pelo tipo de cultura agrícola e a topografia do terreno em seu entrono (ALVES e SILVA, 2003).

Além disso, a liberação transitória de pesticidas aplicados na agricultura e na indústria, seja por derramamento accidental, chuva ou escoamento superficial, representa ameaça para organismos não alvos, particularmente dentro de estuários, lagoas e outras áreas marinhas com baixa circulação de água (PERIC e BURIC, 2019). Após entrar no ambiente aquático e, dependendo das características físico-químicas, os resíduos de agrotóxicos podem se ligar ao material particulado em suspensão, se depositar no sedimento de fundo ou ser absorvido por organismos aquáticos bentônicos (SILVA e SANTOS, 2007).

Alguns pesticidas têm estruturas químicas muito estáveis e levam anos para se decompor em formas menos tóxicas, acumulando-se ao longo do tempo e possibilitando transferir para níveis tróficos superiores, podendo causar diminuição da fertilidade, aumento do número de processos cancerígenos e má formação congênita (BIANCHINI, 2008). Os invertebrados aquáticos desempenham um papel importante na teia alimentar aquática, no entanto, exposição aos pesticidas pode ocasionar o aumento da concentração ao longo da cadeia trófica e causar biomagnificação no topo da cadeia (MORIARTY 1983; NEWMAN 2001; NETO et al., 2008).

Os potenciais sítios de ação das diferentes classes de pesticidas são o transporte de íons (sódio, potássio, cálcio ou cloreto) nas membranas, a inibição seletiva da atividade de diversas enzimas, ou a contribuição para a liberação ou persistência de transmissores químicos nas terminações nervosas (ECOBICHON, 1991). Alguns efeitos foram observados em organismos aquáticos após intoxicação por pesticidas, como excitação, convulsões, natação errática, escurecimento do corpo, perda de equilíbrio, aumento da frequência de ventilação respiratória, secreção de muco e perda de coloração (MONSERRAT e BIANCHINI, 1995).

Variações dos principais parâmetros físicos e químicos em ambientes estuarinos, tais como temperatura, pH, oxigênio dissolvido e salinidade, apresentam forte influência na degradação dos pesticidas (MOON e KUIVILA, 2001). Em estuários de Pernambuco, estudos reportaram a presença de heptacloro, DDT e seus metabólitos em amostras de sedimento no estuário do rio Botafogo (TELLES, D. 2001), Diuron em amostras de água do estuário do Rio Formoso (SILVA, H. M. 2011), PCBs e DDTs no sedimento do estuário do Rio Capibaribe (MOURA, 2016), PCBs e organoclorados no

sedimento do estuário do rio Capibaribe e de SUAPE (YOGUI et al., 2018) e PCBs e DDTs em sururu *Mytella charruana* e marisco *Anomalocardia flexuosa* (ARAÚJO, 2018).

Os compostos Organoclorados (OCs) são estruturas predominantemente cíclicas, com elevada massa molecular, baixa volatilidade, estabilidade química, biossolubilidade e baixas taxas de biotransformação e degradação. Incluem alguns inseticidas, fungicidas, herbicidas, químicos industriais, compostos secundários e outros produtos sintéticos, integrando parte do grupo dos Poluentes Orgânicos Persistentes (FILHO et al., 2008).

Yogui et al (2020) destacaram que as principais características que tornaram os organoclorados amplamente empregados em todo o mundo foram o baixo custo de produção e ação residual prolongada no local de aplicação, sendo o DDT e derivados (dicofol), ciclodienos (aldrin, dieldrin, endrin, clordano, endosulfan e heptacloro), HCH (α -HCH, β -HCH e γ -HCH) e outros (mirex, PCP, clordecona e toxafeno), os principais grupos utilizados. À medida que a comunidade científica passou a ter mais conhecimento sobre os mecanismos de atuação dos OCs no meio ambiente e os efeitos à saúde humana, a utilização desses compostos passou a ser restringida e eles foram substituídos por outros tipos de inseticidas (SAOUDI et al, 2014).

No Brasil, por exemplo, o DDT foi um produto tão popular que deu origem ao verbo "dedetizar" na língua portuguesa. Essa palavra tem sido empregada coloquialmente para referir-se à aplicação de qualquer tipo de praguicida (YOGUI et al., 2020). Dentre os efeitos atribuídos aos OCs citados por Ecobichon (1991) estão à imunossupressão, teratogenia, tumores e doenças secundárias que foram observadas em animais de laboratório, domésticos e selvagens submetidos a estes contaminantes. Alguns tratados internacionais incentivam o banimento ou restrição severa de OCs nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, a exemplo do Tratado de Estocolmo e Convenção de Roterdã (FILHO et al., 2008).

O Hexaclorocicloexano (HCH) teve seu uso em diversas culturas de café, soja e algodão, bem como no controle da doença de Chagas (WEBER e MONTONE, 1990). Após seu banimento na agricultura e na saúde pública, o isômero γ -HCH continuou sendo usado no país como preservante de madeira (ALMEIDA et al., 2007). Em vários países, incluindo o Brasil, o γ -HCH foi empregado como ingrediente ativo (1%) na formulação de loções para tratamento de piolho e sarna pela indústria farmacêutica. Em 2009, os isômeros α -HCH, β -HCH e γ -HCH foram adicionados à lista de POPs que

devem ser eliminados, conforme Convenção de Estocolmo. Apesar dos isômeros α -HCH e β -HCH não apresentarem toxicidade para insetos, eles são tóxicos para diversos organismos não alvos, incluindo mamíferos (YOGUI et al., 2020).

Organoclorados (OCs) já foram registrados até mesmo em regiões remotas como o Ártico e o continente Antártico, locais que não possuem fontes industriais e agrícolas, devido ao ciclo de transporte de zonas temperadas e tropicais para os pólos (LARA et al., 1990; WU et al., 2020). A rota de entrada ao ambiente inclui, dentre outras, a volatilização para o meio atmosférico via dispersão durante aplicação e incineração de equipamentos e produtos, contaminação das águas através de vazamentos e práticas de descarte inadequadas por meio da lixiviação, carreamento superficial, podendo se dispersar, sofrer transformações ou concentração (FILHO et al., 2008).

No ambiente marinho os OCs incorporam-se ao material particulado e dissolvido na água do mar e posteriormente pode ser assimilado pelo fitoplâncton e incorporado ao sedimento. Não sendo inativado, pode retornar a coluna d'água reiniciando o ciclo, caracterizando-se como poluente crônico em potencial (BUNCE, 1994; MONTONE, 2002). Os OCs são conhecidos por serem potenciais desreguladores endócrinos. Resíduos de DDT e seus derivados afetam o desenvolvimento das gônadas e causam anormalidades reprodutivas em moluscos (BINELLI et al. 2004). Mexilhões têm sido usados como bioindicador para detectar resíduos de OCs em ecossistemas aquáticos (WON et al. 2005; RIVA et al. 2010).

Já os compostos organofosforados (OFs), utilizados como defensivos agrícolas em todo o mundo são ésteres, amidas ou derivados tióis dos ácidos fosfóricos, fosfônico, fosforotióico ou fosfonotióico (WHO, 1986). Por apresentar baixas solubilidades em água e, geralmente, facilmente hidrolisáveis em ambientes alcalinos, são utilizados em substituição aos pesticidas OCs, pois se degradam mais facilmente no meio ambiente, ou seja, apresentam um tempo de meia vida bastante reduzido (SILVA e COSTA, 2011).

Eles despertaram atenção devido as suas potenciais propriedades biológicas como pesticidas sistêmicos, antifúngicos, antibacterianos, antileucêmicos, antiparasitários, antivirais, antiinflamatórios, antitumoral, anti-hipertensivos e antioxidantes. O crescente interesse no estudo dos OFs ocorre devido à aplicação desses compostos como drogas, polímero, perfume, removedor de tinta, revestimento protetor e na indústria automobilística (CHATURVEDI et al., 2014; JOSHI et al., 2015). Os OFs foram banidos da agricultura em vários países devida sua alta toxicidade e, um dos

efeitos que causa, é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) que desempenha um papel crítico no bom funcionamento das células nervosas (BARBOSA et al, 2018).

Os carbamatos (CBs) são ésteres ou derivados N-substituídos do ácido carbâmico e apenas os CBs inseticidas apresentam atividade anticolinesterásica (WHO, 1986). Os CBs são inseticidas efetivos em virtude de inibirem a AChE no sistema nervoso, sem necessitar de biotransformação. A ligação dos CBs com a AChE é instável e a regeneração da enzima carbamilada é relativamente rápida em relação à da enzima fosforilada pelos OPs, uma vez que os carbamatos interagem mais com o sub-sítio aniônico, assim como os substratos, aumentando a possibilidade de hidrólise (ASSIS, 2012).

Os OFs e carbamatos (CBs) responderam juntos por mais de 50% do que é comercializado no mundo e atualmente o herbicida glifosato (Roundup® da Monsanto) é o líder em comercialização (LOPES et al., 2016) e são capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase (ALFONSO, 2017; SOUZA et al., 2018; LOPES et al., 2019). Organofosforado (OPPs) foi capaz de reduzir a atividade da colinesterase no molusco asiático *Corbicula fluminea* e reduziu sua capacidade de locomoção no substrato (Cooper e Bidwell 2006). Efeito de pesticidas carbamato em moluscos, como carbaril (1-naftil metil carbamato) têm sido usados para controle de pragas. A toxicidade dos CMs é semelhante para OFs, no entanto, existem relatos de que os CMs são mais tóxicos e exibem uma maior sensibilidade à inibição da atividade da AChE do que os OFs (RETHORE e NOLLET, 2012).

Além destes, outros pesticidas como o mirex, possui grande especificidade no combate a formigas e cupins, mas também foi utilizado secundariamente como retardante de chama em plásticos, borrachas e materiais elétricos, vendido com esta finalidade, com o nome comercial declorano (Miranda-Filho et al., 2008). O mirex é bastante persistente tanto no ambiente quanto em tecidos biológicos. Ele é um composto de difícil metabolização, sendo eliminado muito lentamente por organismos vivos (YOGUI et al., 2020).

3.3.3 Bifenilas Policloradas - PCBs

Os PCBs são misturas de compostos químicos aromáticos, manufaturados pela cloração do bifenil na presença de um catalisador apropriado. Utilizados pela indústria desde 1881 devido as suas propriedades físicas e químicas, ocasionaram problemas de

contaminação ambiental devido ao uso legal e ilegal e pelo descarte indevido. São de difícil degradação, persistentes e tendem a bioacumular (FILHO et al, 2008), além de causar câncer e interferir nos sistemas hormonal e imunológico (OMS, 2014).

Estes compostos são comercializados desde 1929 e foram utilizados como dielétricos e como fluidos de troca de calor em capacitores elétricos e transformadores, fluidos hidráulicos e lubrificantes, tintas e vernizes, retardantes de chama em resina, papel manufaturado, adesivos e aplicações na indústria de plástico. Comercialmente ficou conhecido como Aroclor[®] entre 1930 e 1977 quando produzido pela Monsanto (ERICKSON, 1997). Ao todo 209 isômeros (moléculas de fórmula química idêntica e entretidas distintas) e congêneres (PCBs com diferentes quantidades de cloros) foram identificados, porém apenas 130 estão presentes em produtos comerciais. Quanto maior for a quantidade de cloro na molécula, maior é a persistência dela no ambiente (PENTEADO e VAZ, 2001).

Dentre os 130 congêneres comerciais, sete deles foram classificados como os mais abundantes nas misturas europeias pela Community Bureau of Reference e chamados de ICES-7 (International Council for the Exploration of the Sea). São eles os PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180 (WEBSTER et al., 2013).

No Brasil, os PCBs estão entre as principais classes de substâncias tóxicas persistentes com quantidades estimadas em 130 mil toneladas, originadas de importações dos Estados Unidos e Alemanha, tendo como principal consumidor o setor elétrico. A partir de 1981 passou a ser banido no país, no entanto, os equipamentos já instalados tiveram permissão de uso até a sua troca, contudo, não há registro da quantidade destes equipamentos e onde estão localizados (FILHO et al., 2008).

Foi demonstrado que os PCBs são poluentes muito tóxicos para o meio ambiente e para o homem (Waid, 1987, Wolf e Toniolo, 1995). Estes produtos químicos industriais foram proibidos em vários países e passaram a ser monitorados regularmente em países ocidentais (HEDGECOTT, 1994). Assim como os OCs, os PCBs possuem resistência à oxidação e, como consequência apresenta elevada persistência quando liberados no meio ambiente. Também são apolares, voláteis em temperatura ambiente, lipossolúveis, e possuem uma baixa pressão de vapor, propriedades que conferem grande potencial de bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica, uma vez que em contato com a água, são adsorvidos ao sedimento, matéria orgânica e biota (WHO, 1991; ERICKSON, 1997). Dados experimentais e de monitoramento demonstraram que

as concentrações no sedimento e na matéria orgânica são superiores as da coluna d'água (FILHO et al, 2008).

Na costa do Brasil há diversos estudos que investigaram a contaminação de POPs em crustáceos, moluscos, peixes, répteis, aves e mamíferos marinhos. Em geral, as concentrações encontradas são relativamente baixas, exceto para algumas espécies de peixes e mamíferos. No que diz respeito à biota marinha, a maior parte dos trabalhos realizados no Brasil analisou PCBs e praguicidas organoclorados em golfinhos. Isso acontece principalmente porque os POPs sofrem biomagnificação através da teia trófica, portanto as maiores concentrações geralmente são encontradas em organismos de topo de cadeia, particularmente mamíferos (BORGA et al., 2001).

Contaminações por PCBs em moluscos utilizados como organismos biomonitores foram registradas em várias partes do mundo (SERICANO et al., 1995; BENALI et al., 2017), incluindo o Brasil (TAVARES et al., 1988; ARAÚJO, 2018; SANTOS et al., 2020). Os moluscos geralmente mostram pouca capacidade para metabolizar e eliminar a maioria desses contaminantes (NHAN et al., 2001). Na Baía de Guanabara (RJ), estudo avaliou PCBs e PBDEs em bivalves (*Perna perna*) e registrou concentração média de 0,8 ng.g⁻¹ ps de PBDEs e 96 ng.g⁻¹ ps de PCBs (SILVA et al., 2013). No SERC, Araújo (2018), registrou concentrações de PCBs em *Mytella charruana* variando de não detectado a 1,36 ng.g⁻¹. Silva et al (2020) registrou concentrações de PCBs em *Mytella guyanensis* na Baía de Todos os Santos, variando de 0,1 a 17,0 ng.g⁻¹.

Entretanto, a presença desses contaminantes em organismos herbívoros, como a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), e organismos coletados em áreas remotas, como caranguejos (*Grapsus grapsus*), peixes (*Exocoetus volitans*) e aves (*Sula leucogaster*) do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, confirmam o amplo alcance e presença ubíqua dos POPs no meio ambiente (DIAS et al., 2013). Na Baía de Santos (SP), Magalhães et al. (2012) encontraram PCBs, PBDEs, DDTs, HCHs, HCB, clordano e mirex em duas espécies de crustáceos: o caranguejo *Hepatus pudibundus* e o siri *Callinectes danae*.

Em Pernambuco, PCBs e DDTs foram identificados no sedimento de dois estuários (Suape e Bacia do Pina) com diferentes históricos de impacto antrópico. A Bacia do Pina apresentou contaminação significativamente maior que o estuário de Suape, refletindo o histórico de ocupação e uso do solo nessas áreas (YOGUI et al., 2018).

3.3.4 Metais traços

Metais traços ocorrem como constituintes naturais da crosta terrestre e são contaminantes ambientais persistentes, já que não podem ser degradados ou destruídos, permanecendo por longos períodos no ambiente e representando considerável ameaça à biodiversidade e ecossistemas (HE et al., 2005).

Os metais cobalto, cobre, cromo, ferro, magnésio, manganês, molibdênio, níquel, selênio e zinco são considerados essenciais e necessários para várias funções bioquímicas e fisiológicas em animais (WHO; FAO; IAEA, 1996), enquanto o alumínio, antimônio, arsênico, bário, cádmio, ouro, chumbo, lítio, mercúrio, níquel, platina, prata, estrôncio, estanho, titânio e vanádio não possuem funções biológicas estabelecidas e são considerados metais não essenciais (CHANG et al, 1996), podendo causar ameaças a vida marinha.

O termo “metais pesados” se refere a qualquer elemento metálico que tem uma densidade relativamente alta ($> 4 \text{ g/cm}^3$) e pode ser tóxico ou venenoso mesmo em baixa concentração (DURUIBE et al. 2007). Os metais pesados incluem chumbo (Pb), cádmio (Cd), zinco (Zn), mercúrio (Hg), arsênico (As), prata (Ag) cromo (Cr), cobre (Cu) ferro (Fe), manganês (Mn) e Níquel (Ni) (FARLEX, 2005).

Especialistas do Conselho Internacional para a Exploração do Mar (ICES) e as Convenções de Oslo e Paris (OSPAR) apontaram como principais substâncias que suscitam preocupação no ambiente marinho os metais arsênio, cádmio, cromo, cobre, mercúrio, níquel, chumbo e zinco (BEYER et al., 2017). Metais pesados são liberados em formas elementares e compostas (orgânicas e inorgânicas). Estudos revelaram que atividades industriais, efluentes domésticos, emissões automotivas, fertilizantes, estrume de gado, fungicidas, fábricas de papel e celulose, incineração de resíduos, refinarias, escoamento urbano e pluvial, escoamento agrícola, mineração, produção de ferro e aço, aterro e indústrias de petróleo, são as principais fontes de poluição de metais em ecossistemas aquáticos (HE et al., 2005; MARCOTULLIO, 2007; KIBRIA et al., 2010).

Na maioria das vezes os metais, como poluentes da água, são transportados de um lugar para outro via atmosfera, ou como gás, ou como espécies adsorvidas ou absorvidas sobre material particulado em suspensão (BAIRD e CANN, 2011). Nos sistemas aquáticos, por meio de rios e córregos, os metais potencialmente tóxicos são transportados na forma dissolvida na água (com maior potencial de causar mais efeitos

deletérios) ou em partículas, onde sedimentos e partículas em suspensão desempenham papéis importantes na adsorção, dessorção e dissolução de metais e processos de sedimentação (GONZALEZ et al., 2007).

Há uma estreita relação entre a concentração desses elementos na água e sua capacidade de retenção em solo e sedimento. Dentre as fontes destes elementos traço para o ambiente costeiro, está o intemperismo de rochas, a erosão de solos ricos nestes elementos e, principalmente, emissões oriundas de atividades antrópicas na bacia hidrográfica (LACERDA et al., 2006). Solubilização, especiação, precipitação, bem como difusão e advecção também são processos críticos que determinam a distribuição espacial do metal (BENOIT et al., 1994).

A circulação estuarina, descarga de rios e águas subterrâneas, inundação de marés, sedimentos entrada e ressuspensão, intercâmbio com ambientes vizinhos, as propriedades da água (por exemplo, salinidade, potencial redox e pH) e a presença de organismos determinam em conjunto a mobilidade dos metais em estuários. Gradientes de concentração de matéria em suspensão, tipos de sedimentos e salinidade são decisivos para a mobilidade do metal no estuário (MACHADO et al, 2016).

A poluição por metais pode afetar o ecossistema e a biodiversidade, eliminar espécies nativas sensíveis ou reduzir a abundância de espécies por comprometimento reprodutivo e aumentar a incidência de doenças (WU et al., 2007; KIBRIA et al., 2012). A natureza dos efeitos pode ser tóxica (agudos, crônicos ou subcrônicos), carcinogênica, mutagênica ou teratogênica. Os seguintes efeitos foram associados ao envenenamento por cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio, zinco, cobre e alumínio: perturbações gastrointestinais, diarreia, estomatite, tremor, ataxia, paralisia, vômitos, convulsões, depressão e pneumonia, quando os vapores voláteis e a fumaça é inalada (MCCLUGGAGE, 1991).

No Japão, por exemplo, o despejo indiscriminado de metil-mercúrio na Baía de Minamata entre 1950 e 1960, ocasionou a morte de aproximadamente 8.000 pessoas (HARADA, 1995; ROSS, 1996). O metil-mercúrio associado a partículas de sedimento na baía de Minamata tornou o poluente presente no ambiente por 40 anos, demandando diversos estudos e ações para descontaminar a área afetada, incluindo o aterramento de mais da metade da área da baía. Só a partir destas ações que a atividade de pesca no local foi permitida (HOSOKAWA, 1993). Estudos de simulação matemática apontam que o tempo de permanência dos metais no ambiente após eventos de contaminação é de

42 anos, desde que as fontes causadoras sejam totalmente eliminadas (ABREU et al., 1998).

Peixes e frutos do mar contêm elementos necessários para o seu metabolismo, como sódio (Na), magnésio (Mg), cloro (Cl), fósforo (P), porém também carregam elementos não essenciais como mercúrio (Hg), arsênico (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb), que não têm papel metabólico e podem ser tóxico para os seres humanos, mesmo em baixas concentrações (ERSOY et al, 2009). Em particular, o Pb e o Cd estão incluídos na lista prioritária de substâncias perigosas da Resposta Ambiental Global, Compensação e Lei de Responsabilidade Civil (CERCLA) aplicada pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) e pela Agência de Registro de substâncias tóxicas e doenças (ATSDR) (ATSDR, 2011). A FAO / OMS estabeleceu o limite provisório permitidos níveis de ingestão diária tolerável de 270 e 75 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para Pb e Cd, respectivamente, considerando um peso corporal de 75 kg.

3.3.5.1 Metais em sedimento

Os metais traço chegam ao ambiente estuarino associado, principalmente, ao material particulado em suspensão e/ou dissolvidos na coluna d'água, oriundos de descargas fluviais e por deposição atmosférica. As características da bacia hidrográfica e da região podem favorecer a deposição e o acúmulo destes metais no sistema estuarino, resultando em concentrações elevadas desses elementos. O potencial de toxicidade das águas estuarinas é determinado pelo balanço de vários processos físicos e químicos que controlam a dinâmica dos contaminantes no meio (SALOMÃO et al., 2001). Efeitos diretos de remoção pelas plantas, lixiviação, escoamento superficial e erosão são os possíveis caminhos da redistribuição de metais no ambiente (REZENDE et al., 2007).

A acumulação de material fino no ambiente costeiro tem implicações muito significativas com relação à retenção de poluentes, devido à elevada superfície específica apresentada por este tipo de material. Os sedimentos mais finos em suspensão possuem superfície altamente reativa, capazes de interagir e imobilizar quando entram em contato com a superfície de outras partículas e substâncias dissolvidas (WESSERMAN e WESSERMAN, 2008).

Os estuários são ambientes com elevado teor de matéria orgânica, o que favorece a mobilização dos metais no sedimento, sendo a matéria orgânica um importante

carreador geoquímico de metais devido a sua capacidade de dispor de sítios de troca iônica (CLARK, 2011). Geralmente, à medida que se aproxima da foz do estuário observa-se redução da matéria orgânica e consequentemente da concentração de metais, cuja adsorção no sedimento são influenciadas pelas variações no pH, salinidade, potencial redox e oxigênio dissolvido na água (TOMLINSON et al, 1980; DAVUTLUOGLU et al., 2011).

As fontes de contaminação dos metais no sedimento podem ser de origem antrópica ou de fontes naturais. Ao longo dos processos de transportes dos sedimentos os metais de origem antrópica vão se incorporando e o nível de poluição na bacia de drenagem influencia diretamente na concentração total do depósito (WESSERMAN e WESSERMAN, 2008). Nos estuários com presença de indústrias de grande porte, quando submetidos à dragagem dos canais de navegação, são observados no sedimento dragado, rejeitos de mais de um século e quantidade expressiva de material contaminado (CLARK, 2011). A determinação da concentração total de metais nos sedimentos é inadequada para compreender a biodisponibilidade, mobilidade e toxicidade dos metais, no entanto é geralmente útil como um indicador de contaminação em ambientes aquáticos (HOODA, 2010).

3.3.5.2 Metais em bivalves

Diversos organismos acumulam compostos químicos tóxicos a partir do alimento que consomem e de seu contato com particulados em água e sedimentos que contêm esses compostos adsorvidos. Em muitos casos, os compostos químicos não são metabolizados e se acumulam no tecido gorduroso dos organismos, onde sua concentração aumenta com o tempo (BAIRD e CANN, 2011).

No meio ambiente, os metais pesados são geralmente mais persistentes que os contaminantes orgânicos, como pesticidas ou subprodutos do petróleo e, quando disponíveis no meio, podem tornar-se biodisponíveis para organismos vivos (SANTONA et al., 2006). A absorção de metais pesados disponíveis em soluções no meio depende dos sistemas de transporte nos organismos, que geralmente se dá através da difusão passiva em gradientes criados pela adsorção na superfície e por elementos osmorregulatórios das células superficiais e fluidos corporais (CLARK, 2011).

Os invertebrados que se alimentam de detritos e que vivem em meio aos sedimentos, servem como um elo essencial entre as cadeias alimentares decompositoras

e os níveis tróficos superiores e muitos são importantes fontes de recursos para humanos. Compreender os mecanismos que controlam a biodisponibilidade dos metais para os organismos bentônicos tem implicações importantes para o ciclo dos metais através de diferentes compartimentos de ecossistemas costeiros (SARAH et al., 2004).

As distribuições heterogêneas das concentrações de metais no sedimento podem refletir nos tecidos de espécies de invertebrados que habitam este compartimento no processo de bioacumulação. Vários estudos mostraram que dentro do mesmo habitat ou microcosmo experimental, concentrações em organismos podem ser altamente variáveis em relação a taxa, mobilidade e comportamento alimentar, bem como a biologia do animal (LEE et al., 2000).

Esses fatos levaram muitos a reconhecer que a geoquímica de sedimentos e a biologia do animal específico deve ser entendidas a fim de explicar os mecanismos que controlam a bioacumulação de metais. A bioacumulação, em geral, raramente está relacionada às concentrações totais de metais em sedimentos (LUOMA, 1989; BRYAN e LANGSTON 1992), nem tem sido bem sucedido em medir uma única fração química que é universalmente a fração biodisponível para todos os metais (LUOMA, 1996).

Os bivalves são resistentes a uma ampla gama de contaminantes e podem se desenvolver mesmo em ambientes altamente poluídos, qualidade que torna essas espécies candidatas a programas de biomonitoramento em todo o mundo (O'CONNER, 1992). Por serem filtradores, bioacumulam vários contaminantes nos tecidos e fornecem uma medida temporal da permanência destes contaminantes no ambiente (SASIKUMAR G., et al 2006; O'CONNOR e LAUENSTEIN., 2006).

O material particulado em suspensão e o sedimento representaram, ao longo do caminho evolutivo dos bivalves, duas vias de exposição aos metais, durante a transição do hábito alimentar de coletor seletivo para filtrador. Desta forma, pode-se propor que houve uma seleção das linhagens que, ou inseriram os metais em suas funções biológicas, ou desenvolveram mecanismos para excreção/detoxificação destes elementos (GALVÃO et al., 2009). Os moluscos bivalves absorvem metais presentes no alimento ou em material particulado por meio do seu mecanismo de filtração, que pode chegar até 5 litros por hora em algumas espécies (ANANDRAJ et al., 2002).

A quantidade de água filtrada pode variar de acordo com a quantidade de partículas suspensas encontradas na água. Por exemplo, os mexilhões podem diminuir sua taxa de eliminação (ou seja, circular menos água através de suas guelras) quando a concentração de partículas é alta na água (BABARRO et al. 2000). À medida que os

bivalves filtram grandes quantidades de água, seus tecidos absorvem alguns dos contaminantes presentes na água e nas partículas dos alimentos (BOENING, 1999).

Tem sido relatado que os bivalves acumulam metais em seus tecidos em níveis superiores às concentrações observadas na água em que vivem e, portanto, vários contaminantes químicos presentes em níveis indetectáveis na água do mar, podem ser detectados em tecidos de bivalves, por isso muitas espécies têm sido utilizadas com sucesso para monitorar as concentrações de contaminantes no ambiente marinho (CASAS et al., 2008).

A maioria dos moluscos bivalves armazena traços de metais principalmente no hepatopâncreas e nos rins em formas como metalotioneínas ou na forma granular em altas concentrações ambientais destes elementos (PHILLIPS e RAINBOW, 1989). Galvão et al (2009) sugerem que uma vez incorporados aos tecidos dos bivalves, os metais são transportados pelo seu interior para suprir o requerimento dos diferentes tecidos e, a hemolinfa, seria o meio pelo qual esses elementos são carreados pelo corpo do animal. O bisso é o tecido pelo qual os bivalves excretam os metais (GEORGE et al., 1976).

Substâncias e elementos potencialmente tóxicos podem comprometer o ganho energético de sua alimentação, pois há desvio de energia para o metabolismo dos contaminantes por não conseguir excretá-los, bioacumulando no organismo em concentrações bem superiores às verificadas na fonte de exposição (TORO et al., 2003; CLARK, 2011).

A maioria das espécies que ocupam habitats poluídos por metais mostrou resistência aos contaminantes, resultante de uma combinação de aclimatação fisiológica, mudanças na composição de espécies e adaptação genética. Nos moluscos bivalves os sinais de estresse podem incluir recessão do manto, glândula digestiva pálida, regressão do epitélio tubular digestivo, infiltração de tecidos nos hemócitos, edema, defasagem na gametogênese e anormalidades na concha (SIDERMAN. C. J., 2006).

Os metais podem ficar disponíveis aos organismos quando a sua associação à matriz sedimentar encontra-se sob a forma metabolizável ou biodisponível, ou seja, dissolvidas, complexos ionizados, íons adsorvidos à partículas, associadas à complexos orgânicos prontamente metabolizáveis como a proteína, associados à quelatos e compostos de alto peso molecular ou metabolizados por organismos (STUM e MORGAN, 1981).

A concentração de compostos químicos aumenta expressivamente com o aumento da cadeia alimentar, considerando o consumo de espécies por outras espécies que a precede. Um composto químico cuja concentração aumenta ao longo da cadeia alimentar é chamado de biomagnificado, enquanto os resultados da biomagnificação são uma sequência de passos da bioacumulação que ocorre ao longo da cadeia. No caso dos metais, muitos organismos aquáticos bioconcentram mas não biomagnificam (BAIRD e CANN, 2011).

A bioacumulação de metais traço nos tecidos de bivalves é dependente de diferentes processos metabólicos que ocorrem em tipos celulares específicos nos tecidos-alvo (KRISHNAKUMAR et al., 2018). Alterações no ambiente marinho (temperatura, pH, salinidade) e condições biológicas da espécie (idade, sexo, estágio de maturidade sexual, etc.) influenciam nos processos acumulativos (SAAVEDRA et al., 2004; MUBIANA et al., 2006).

O tecido branquial de bivalves constitui uma interface-chave para a absorção de íons metálicos dissolvidos da água seguida pelo tecido do manto. A absorção de metais ligados ao material particulado é alcançada através da glândula digestiva (RAINBOW P.S., 2002). Geralmente as concentrações máximas de metais são registradas na glândula digestiva e/ou tecido branquial seguido do manto e tecido muscular (KRISHNAKUMAR et al., 1990; YAP C.K., 2002).

Os poluentes químicos, agindo como estressores ambientais afetam os sistemas enzimáticos celulares envolvidos no metabolismo do cálcio, cuja alteração enzimática resulta em deposição anormal de conchas, produzindo moluscos não comercializáveis. Pesquisas sobre contaminação por metais pesados, especialmente nas zonas costeiras, têm avançado ao longo das últimas décadas, incluindo tecnologias inovadoras com moluscos artificiais para monitorar metais pesados nos oceanos, áreas costeiras, estuários e rios em diferentes países no mundo (KIBRIA et al., 2016).

3.3.5.3 Metais em camarões peneídeos

Invertebrados aquáticos absorvem e acumulam traços de metais essenciais e não essenciais de várias fontes. As concentrações em seus tecidos e estruturas mostram grande variabilidade (MARSDEN e RAINBOW, 2004). Os metais podem ocasionar efeitos tóxicos aos espécimes quando em concentrações elevadas, incluindo os metais essenciais (SILVA et al., 2014), o que torna importante o biomonitoramento para

avaliar as condições ambientais de um ecossistema ou espécie (YETIMOGLU et al., 2007). Rainbow (1998) destaca que a acumulação de metais em crustáceos se dá por meio das superfícies ectodérmicas permeáveis ou através da endoderme do intestino (WANG, 2002) e que ao entrar no corpo do espécime, passam a estar metabolicamente disponíveis e podem bioacumular (RAINBOW, 2007).

As brânquias, estruturas com função essencial na respiração do crustáceo, absorvem metais e refletem as concentrações destes elementos na água (YILMAZ, 2003), além da ingestão por meio de sedimentos contaminados (FIRAT et al., 2008) e por meio da alimentação de rações industriais (LOPES et al., 2009). Maiores concentrações de metais foram observadas no hepatopâncreas em relação ao tecido muscular (Yilmaz e Yilmaz, 2007). O hepatopâncreas, além de suas funções de absorção, digestão, armazenamento e secreção (DALL e MORIARTY, 1983; CACECI et al., 1988), possui papel de armazenamento e desintoxicação (VOGT e QUINTIO, 1994).

Um alto conteúdo de metalotioneínas (MTs), proteínas responsáveis pelo sequestro e desintoxicação de metais tóxicos (ERGEN, 2020), foram observadas no hepatopâncreas (LINDAHL e MOKSNES, 1993). As MTs são ricas em cisteína, capazes de ligar íons metálicos seletivamente e participam da homeostase e desintoxicação de metais e outros processos celulares (GUTIERREZ et al., 2020). As MTs têm sido amplamente consideradas como potencial biomarcador do efeito de metais pesados em *L. vannamei* (SOARES et al., 2011) e sua função mais importante é neutralizar os metais desnecessários ou quantidades excessivas, evitando a toxicidade (AHEARN et al. 2004).

O efeito de metais pesados em organismos aquáticos é observado como alterações no comportamento, migração, fisiologia, metabolismo, reprodução, desenvolvimento e crescimento dos animais (NAMMALWAR, 1983). Frias Espericueta et al (2008) observaram que juvenis de *Litopenaeus vannamei* expostos aos metais Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb e Zn apresentaram danos no hepatopâncreas, brânquias, epípodito e tecidos do intestino médio dos camarões e que a presença de metais no ambiente estuarino é uma preocupação ecotoxicológica, porque podem alterar alguns processos fisiológicos, como osmorregulação, respiração e crescimento dos organismos. Camarões *L. vannamei* expostos a metais tiveram os indicadores de respostas imunológicas afetados, sugerindo que este estresse pode aumentar a suscetibilidade deste crustáceo à infecções e dano aos tecidos (Abad-Rosales et al., 2018).

De acordo com Marsden e Rainbow (2004) o exoesqueleto é um dos tecidos para o qual os metais são transportados para desintoxicação, a exemplo do Fe e Al, que excretam parte deles por meio de ecdise (mudança de carapaça). Para organismos aquáticos Abel (1989) listou por ordem de toxicidade os metais $Hg > Cd > Cu > Zn > Ni > Pb > Al$, enfatizando que a sequência é provisória e sujeita a mudanças dependendo das condições físico-químicas do ambiente. No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Resolução RDC N° 42 de 2013, estabeleceu limite máximo para contaminação em crustáceos para os metais As (1,0 mg/kg), Pb (0,50 mg/kg), Cd (0,50 mg/kg) e Hg (0,50 mg/kg).

4 RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO I

Análise da concentração de metais, bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas e atividade da acetilcolinesterase (AChE) de *Mytella charruana* como ferramenta de biomonitoramento no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe, Pernambuco, Brasil.

Este artigo será submetido à
revista



Qualis: A2

ISSN: 0039-9140

Fator de Impacto: 4.610

Corresponding author:

Ranilson de Souza Bezerra

Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica e Biofísica,
Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

E-mail address: Email: glauber77@gmail.com

Análise da concentração de metais, bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas e atividade da acetilcolinesterase (AChE) de *Mytella charruana* como ferramenta de biomonitoramento no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe, Pernambuco, Brasil.

Glauber Pereira de Carvalho Santos¹, Caio Rodrigo Dias de Assis², Carlos Henrique Marinho da Silva¹, Gilvan Takeshi Yogui³ Ranilson de Souza Bezerra².

¹Instituto de Tecnologia de Pernambuco, Recife, Brasil;

²Departamento de Bioquímica e Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

³Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Abstract

The mollusc *Mytella charruana* is a bivalve of commercial importance in the northeast region of Brazil, used as a bioindicator of estuarine pollution. They can accumulate pollutants in your tissues due to their sessile behavior in the sediment and filtration feed. Therefore, the present study aimed to evaluate the pollution in the Capibaribe River Estuarine System (SERC) by metals (n=10) in sediment and tissue of *M. charruana* and PCBs (n=182), organochlorine pesticides (DDTs, HCHs, chlordanes, heptachlor and mirex) and other pesticides (n=400) in tissues of the bivalve caught in the three main mollusc fishing areas in SERC. The activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) was also evaluated as a tool for biomonitoring in the estuary. The results indicated that in the sediment, Al, As, Cd, Cu, Cr, Mn, Hg and Zn were higher in the summer and, the metal Ni, in the winter ($p < 0.05$). In tissues, only Cr was higher in winter ($p < 0.05$). There was no biocumulation of metals in the bivalve from the sediment. Of the PCB congeners evaluated, 55 were found above the limit of quantification (LQ), with an average concentration of $38.08 \pm 9.35 \text{ ng.g}^{-1}$ and a predominance of hexachlorobifeline. The pp'-DDE metabolite dominated the composition of DDTs, with an average of $21.3 \pm 5.0 \text{ ng.g}^{-1}$ and CHLs $< 0.62 \text{ ng.g}^{-1}$, with no heptachlor and mirex being recorded. The pesticide Cypermethrin was registered in *M. charruana* (25.0 ng.g^{-1}) in the Ponte bank, summer. Seasonal variability did not influence the mean AChE between summer ($23.86 \pm 2.21 \text{ mU / mg}$) and winter ($54.91 \pm 2.65 \text{ mU/mg}$), with inhibition being recorded only in the Croa bank (summer). The food risk assessment indicated that there is no risk for the consumption of bivalve in SERC, however contaminants can causing adverse effects to the species.

Keywords: Metals, PCBs, DDTs, pesticides, acetylcholinesterase, *Mytella charruana*

1 Introdução

A poluição no estuário é caracterizada por interações complexas e interconectadas, muitas vezes dificultando a análise dos efeitos ao ecossistema. As dinâmicas físicas, químicas e as condições geológicas demandam esforços para avaliar o impacto de atividades antropogênicas e sua contaminação ao sedimento e biota (Essien et al., 2009; Zanardi-Lamardo et al., 2016). Os sedimentos estuarinos acumulam poluentes que podem ser novamente liberados para a água e muitas vezes torna a condição ambiental complexa e altamente variável, podendo causar efeitos adversos aos organismos (Fan et al., 2020). Contaminação por metais em ambientes estuarinos tem sido alvo intenso de estudos em várias partes do mundo (Barletta et al., 2019), bem como poluentes orgânicos persistentes - POPs (por exemplo, bifenilas policloradas e pesticidas organoclorados) devido a persistência, toxicidade e potencial de bioacumulação destes compostos, que representam risco aos ecossistemas e saúde humana (Santos et al., 2020; Yogui et al., 2020).

Estudos sobre acumulação e variação sazonal de contaminantes no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC), Nordeste do Brasil, são importantes devido a sua relevância ecológica e socioeconômica (Zanard-Lamardo et al., 2016). Tal relevância inclui a pesca de moluscos bivalves de importância comercial na região (Silva et al., 2010), a exemplo da espécie *Mytella charruana* (d' Orbigny, 1842). De acordo com a FAO (2020), 664 milhões de toneladas de bivalves marinhos foram mundialmente capturados em 2018. Os bivalves são considerados bons monitores biológicos devido ao seu modo de vida sésil e alimentação por filtração (Krishnakumar et al., 2018), refletindo a contaminação do ambiente (Langston et al, 1995).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares e simpáticas (Assis et al., 2014; Bernal-rey et al., 2020), possuindo influência na comunicação neuronal (Lopes et al., 2019) e conferindo potencial uso como biomarcador ambiental (Souza et al., 2018). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a contaminação por metais em sedimento e tecidos de *Mytella charruana* capturados no SERC, bem como POPs e pesticidas em tecidos do bivalve, avaliando a atividade da AChE desse molusco como ferramenta de biomonitoramento ambiental no SERC frente aos contaminantes avaliados.

2 Material e métodos

2.1 Área de estudo

O estuário do Rio Capibaribe está localizado na cidade do Recife (8° S, 35° W), estado de Pernambuco, Nordeste, Brasil. A bacia hidrográfica do Rio Capibaribe possui área de drenagem de 7.557,41 km² e está totalmente inserida no Estado de Pernambuco, abrigando uma população de 1.328.361 habitantes com cerca de 75% concentrada em áreas urbanas (CPRH, 2018). O SERC é formado pelos rios Capibaribe, Tejipió, Jordão e Beberibe, ambos com registros de altas cargas de águas residuais não tratadas ao longo de seus cursos de água (Zanardi-Lamardo et al., 2016; Yogui et al., 2018). Possui relevante função como berçário e área de reprodução para inúmeras espécies, além de polo econômico e portuário (Macedo et al., 2007).

A Bacia do Pina, inserida no SERC, abriga o banco de sedimento denominado Croa dos Passarinhos, um dos principais habitats de *M. charruana* no estuário. Ela está situada na parte interna do Porto do Recife, separada do Oceano Atlântico por meio de um dique natural. É considerada um ambiente hidrodinâmico com características estuarinas sujeitas à ação das marés provenientes do Porto do Recife, em constantes alterações ambientais devido aos despejos de efluentes domésticos e industriais oriundo dos rios Tejipió, Jordão e braço sul do Capibaribe, que deságuam nesta porção do estuário (Feitosa, 1988; Araujo e Pires, 1998).

2.2 Coleta e preparação das amostras

As campanhas de campo (n = 4) foram realizadas em dois períodos sazonais, seco (estiagem) e chuvoso. No primeiro, as coletas ocorreram em novembro e dezembro de 2018, quando foi registrado acúmulo de chuvas de 93,70 mm. No chuvoso, as coletas ocorreram em junho e julho de 2019, quando foram registrados 888,7 mm de precipitação. O acúmulo de chuvas em 12 meses, de setembro de 2018 a agosto de 2019, foi de 1.852 mm, de acordo com dados da Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC).

Os três principais bancos de pesca (BP) do sururu *Mytella charruana* no SERC (Figura 1) foram avaliados. Coletou-se amostras de sedimento e do bivalve, além de registro de parâmetros adicionais de qualidade de água (oxigênio dissolvido, pH,

salinidade e temperatura) por meio de sonda multiparâmetro YSI, modelo Pro Plus (EUA). Os BPs são denominados pelos pescadores na região como: 1) Palácio do Campo das Princesas (PL), nas proximidades da sede do Governo do Estado de Pernambuco; 2) Croa dos Passarinhos (CP) e; 3) Ponte do Pina (PP), estes dois últimos inseridos na Bacia do Pina.

2.2.1 Coleta de sedimento

As amostras de sedimento (± 2 kg) foram coletadas com amostrador Van Veen em aço inoxidável na camada superficial (0-20 cm), em triplicatas para cada banco de pesca (BP) de *M. charruana*. O sedimento foi armazenado em recipiente plástico, mantido temporariamente refrigerado até a chegada ao laboratório, quando foram congelados a -22 °C para posterior análise de metais traços.

2.2.2 Coleta do sururu *Mytella charruana*

Os espécimes foram capturados no sedimento dos três BP em triplicata ($\pm 2,0$ kg), por meio de coleta manual no sedimento. Amostras controle (*background*) foram coletadas de igual forma no estuário de Barra de Camaragibe, Alagoas, Brasil - distante 230 km do Recife ($9^{\circ} 19' S$, $35^{\circ} 25' W$). Ao chegar no laboratório, os espécimes foram limpos em água corrente e inseridos (100 indivíduos) em aquários de depuração ($n = 9$) contendo água do mar por um período de 24 h, visando eliminar o trato digestivo dos animais. Estes poderiam conter partículas de silte e argila em seu trato digestivo (incluindo contaminantes adsorvidos em sua superfície). Assim, essa depuração visou evitar a superestimação da concentração de contaminantes nos organismos (BATISTA NETO et al, 2008). Após esse procedimento, os espécimes foram armazenados em sacos plásticos e congelados a -22 °C até posterior análise de contaminantes (metais traços, bifenilas policloradas, pesticidas organoclorados e outros pesticidas).

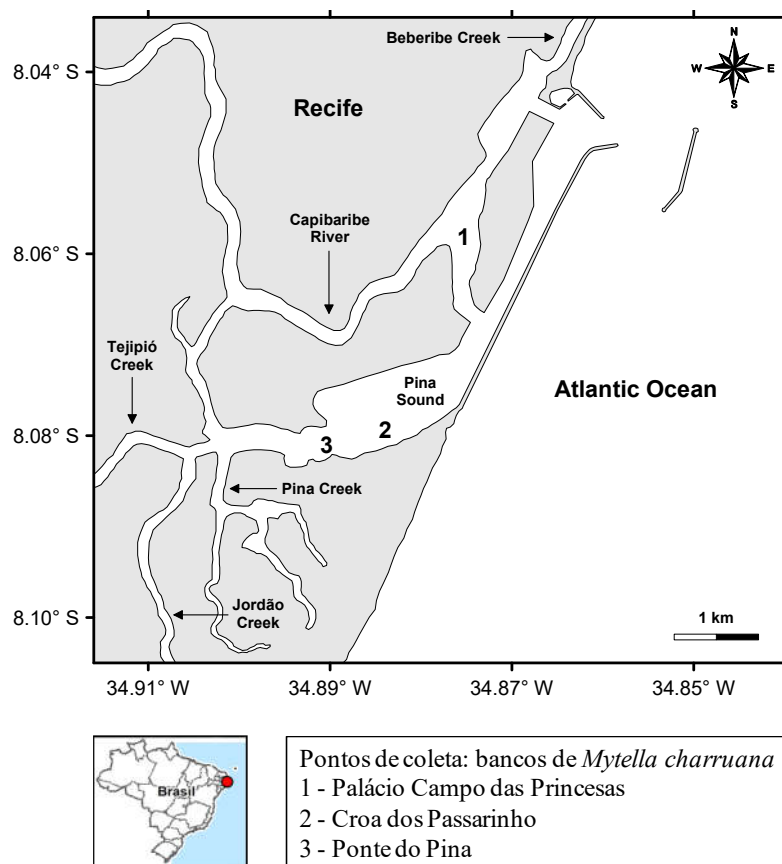


Figura 1. Locais de coleta de *Mytella charruana* no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe.

2.3 Análises químicas

2.3.1 Determinação de metais em sedimento e tecido de *Mytella charruana*

Ao todo dez metais (Al, As, Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Hg, Ni e Zn) foram analisados em sedimento e nos tecidos de *M. charruana*. A digestão ácida do As, Cd e Pb seguiu o método 999.10 descrito pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 20^a Edição (AOAC, 2016), enquanto o Al, Cu, Cr, Ni e Zn seguiu o Método 3030K do Standard Methods, 23^a Edição (SMEWW, 2017). Para o mercúrio foi utilizado o método 7473 descrito pela United States Environmental Protection Agency - USEPA, (USEPA, 2007). A digestão em forno microondas foi realizada conforme método DMA 80 PC/T640/1640, Revision 10, descrito em DMA Milistore SRL – Application Book (DMA, 2011). O material de referência utilizado seguiu o Guia ISO 34:2012 da Agência Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

A determinação de metais nas amostras foi realizada através da técnica de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) em equipamento de marca Thermo Scientific modelo ICAP 6300 CID, contendo plasma de argônio com vazão de 0,0 a 1,5 L min⁻¹ e potência de radiofrequência de 135 a 700 W. A leitura das amostras foi efetuada em duplicata e seguiu recomendações do método 6010B, Revisão 2 da USEPA (1996). Os resultados das análises foram expressos em mg kg⁻¹ de peso seco.

2.3.2 Análises de agrotóxicos em *Mytella charruana*

Foram analisados agrotóxicos organofosforados (OFs), carbamatos (CBs) e piretroides (Pyr). Os padrões analíticos foram produzidos por Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha) e Chem Service (West Chester, EUA), todos com certificado ISO Guide 34 e pureza superior a 99%. O método de extração adotado foi o QuEChERS (do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), conforme descrito em Anastassiades et al. (2003). A técnica de cromatografia líquida de ultraeficiência (UPLC) acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) foi empregada para analisar os agrotóxicos, utilizando um UPLC ACQUITY UPLC™ (Waters Corp. Milford, Massachusetts, EUA) e o espectrômetro de massas foi o Xevo TQS fabricados pela Waters® (Waters Corp. Milford, Massachusetts, EUA). As condições de análise cromatográfica para separação dos agrotóxicos foram baseadas em método previamente validado pelo Laboratório de Análises de Resíduos de Agrotóxicos (LABTOX) do ITEP. O equipamento utilizado nas análises por cromatografia gasosa (CG-ECD/ECD) para analisar o grupo de agrotóxicos piretróides foi o Agilent modelo 7890B com detector de captura de elétrons e injetor do tipo split/splitless. A separação dos agrotóxicos foi obtida em coluna capilar HP-5ms, com fase estacionária composta de 5% metilfenilsilicone e as seguintes dimensões: 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da fase estacionária. O hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL min⁻¹.

2.3.3 Análises de compostos organoclorados em *Mytella charruana*

As amostras úmidas armazenadas em recipientes de alumínio foram pesadas em balança analítica e levadas a liofilizador até secagem total do tecido mole. A extração de organoclorados seguiu o protocolo descrito por Miranda e Yogui (2016) e Araújo (2018). Aproximadamente 1,5 g de cada amostra foi inserida em cartucho de extração e adicionado 100 μL do padrão interno - PI (DBOFB, PCB-103 e PCB-198 em concentração de 1000 ng mL^{-1}). A extração foi realizada em aparato Soxhlet por aproximadamente 8 horas, visando extrair lipídios e contaminantes orgânicos da amostra. Após a extração, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo e fluxo suave de nitrogênio até o volume de 1 mL. Para quantificar a matéria orgânica extraível (MOE), um pequeno béquer foi previamente pesado e adicionada alíquota de 100 μL do extrato concentrado, aferido a 1 mL. Após evaporação natural do solvente o béquer com a MOE foi pesado sucessivamente ao longo do tempo até atingir peso constante. O extrato restante (900 μL) foi submetido a tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (95-98%) para purificação do mesmo por três vezes, com vistas a garantir uma boa eficiência na oxidação da matéria orgânica interferente. Após este procedimento o extrato purificado foi lavado por duas vezes com água destilada (livre de orgânicos) para remover resíduos de ácido. Por fim, novamente concentrado em fluxo suave de nitrogênio e transferido para um vial. Exatamente 90 μL do padrão interno cromatográfico - PICG (TCMX em concentração de 1000 ng mL^{-1}) foi adicionado ao vial avolumado a aproximadamente 500 μL com n-hexano e imediatamente armazenado em freezer até o momento das análises.

A análise das amostras foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas – GC-MS (Agilent Technologies, modelos 7820A e 5975C, respectivamente). A coluna capilar utilizada foi a HP-5ms com as seguintes dimensões: 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura da fase estacionária. He foi usado como gás de arraste (pureza: 99,9990%), com fluxo constante de 1,2 mL min^{-1} na coluna capilar. O controle de qualidade dos lotes de extração foi executado com as seguintes amostras: (1) branco de laboratório (1 g de sulfato de sódio anidro calcinado); (2) duplicata; (3) matriz fortificada; (4) material de referência certificado – MRC (NIST SRM 2974a) produzido com tecido de *Mytilus edulis*, um bivalve pertencente à mesma família de *M. charruana*; e (5) controle analítico.

O controle de qualidade do lote analítico indicou que apenas 1,6% dos analitos de interesse foram identificados no branco de laboratório, sendo sua contaminação geralmente inferior ao limite de quantificação. A recuperação média dos padrões internos (PI) foi de $73 \pm 12\%$ (média $\pm$ desvio padrão). A faixa de recuperação aceitável é de 40 a 120% (Wade e Cantillo, 1994). Após a injeção de padrões analíticos em diferentes concentrações foi realizada uma análise de regressão para elaboração de curvas de calibração dos analitos de interesse. O limite aceitável do coeficiente de determinação das análises de regressão foi $R^2 \geq 0,995$. Nas sequências de injeção dos lotes analíticos no GC-MS foram injetados padrões de verificação para avaliar a validade das curvas de calibração. O padrão de verificação consistia em uma solução padrão representativa do centro da faixa de concentrações da curva de calibração. Os resultados foram expressos em ng g^{-1} peso seco (ps).

O risco à saúde humana pela ingestão de PCBs foi determinado considerando fatores de equivalência tóxica (TEF) em 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TCDD), um composto de referência. Os 12 PCBs coplanares que possuem TEF são os congêneres 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 169, 167 e 189) (OMS, 1998). A partir dos valores de TEF e concentração de PCBs nas amostras, foi calculada a equivalência tóxica (TEQ-PCBs) expressa pela fórmula: $\text{TEQ} = \sum (C_i \times \text{TEF}_i)$ onde C_i representa a concentração dos PCBs semelhantes à 2,3,7,8-TCDD e TEF_i representa o fator de equivalência tóxica desses PCBs. O resultado é expresso em pg g^{-1} (Van Den Berg et al., 2006). A estimativa de ingestão diária (EID) de um indivíduo ou de uma população foi proposta pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization ou WHO) e visa estimar a quantidade diária de um poluente que pode ser ingerida por uma pessoa (WHO, 2010). A EID foi calculada por meio da fórmula: $\text{EID} = (C \times I) / \text{PC}$, onde C é a concentração do contaminante no alimento, em pg g^{-1} (peso úmido); I é a quantidade do alimento ingerido, em g dia^{-1} ; e PC é o peso corpóreo médio de uma população humana específica, em kg. Devido à indisponibilidade de dados específicos sobre consumo de bivalves em Pernambuco, foi adotado o valor de $39,7 \text{ g dia}^{-1}$ que representa o consumo médio de pescado pela população brasileira (MAPA, 2014). O peso médio corporal de 65 kg para adultos homens e mulheres (IBGE, 2010) também foi usado para determinar o EDI.

2.4 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em *Mytella charruana*

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) foi determinada pelo método colorimétrico proposto por Ellman *et al.* (1961) e modificado por Assis *et al.* (2012). As amostras de tecido mole dos sururus foram homogeneizadas por meio de um homogeneizador IKA RW-20 em tampão Tris-HCl 0,5 M e pH 8,0 até a concentração de 20 mg de tecido /mL de tampão. Em seguida, foram centrifugados a 1.000 x g por 10 minutos em centrífuga Legend XTR da Thermo Scientific, coletando o sobrenadante (extrato bruto) para os ensaios. Em seguida, 20 µL do extrato bruto foi adicionado ao reagente cromogênico DTNB 0,25 mM (200 µL) e a reação teve início com a adição do substrato iodeto de acetiltiocolina 62 mM (20 µL). O produto da reação foi lido a 405 nm durante 3 min no leitor de microplacas Bio-Rad xMark.

2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas para avaliar metais, PCBs e pesticidas foram realizadas utilizando os programas PAST 4.02 (Hammer et al., 2001) e Origin[®] 8.0. Comparações entre bancos de pesca e períodos de coleta (seco e chuvoso) foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis. A opção pelo teste não paramétrico se deu após verificação que os conjuntos de dados não se ajustaram às premissas de normalidade e homocedasticidade da análise de variância (ANOVA). Para os testes comparativo da atividade da AChE, foi utilizado o teste de Tukey após o cumprimento das premissas de normalidade (pelo teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (pelo teste de Levene).

3 Resultados

3.1 Parâmetros de qualidade da água

As variações dos parâmetros de qualidade da água estão descritos na Tabela 1. resultados indicaram, sazonalmente, concentração média mais elevada para oxigênio dissolvido e salinidade no período seco ($p < 0,05$).

Tabela 1. Variações do oxigênio dissolvido, pH, salinidade e temperatura (média $\pm$ DP) no SERC ao longo do período seco e chuvoso nos bancos de pesca (BP) de *Mytella charruana*.

BP	Parâmetros							
	OD (mg/L)		pH		Salinidade		Temperatura (°C)	
	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso
Palácio	4,48 $\pm$ 0,92 a,ab	1,14 $\pm$ 0,72 b,a	7,14 $\pm$ 0,16 a,a	6,92 $\pm$ 0,16 a,a	22,25 $\pm$ 5,79 a,a	10,08 $\pm$ 2,65 b,a	29,91 $\pm$ 0,38 a,ab	27,25 $\pm$ 0,44 b,a
Croa	6,17 $\pm$ 1,87 a,b	1,22 $\pm$ 0,36 b,a	7,08 $\pm$ 0,52 a,ab	7,12 $\pm$ 0,06 a,ab	21,82 $\pm$ 6,42 a,a	10,00 $\pm$ 1,20 b,a	30,61 $\pm$ 0,96 a,b	27,65 $\pm$ 0,79 b,a
Ponte	2,14 $\pm$ 2,15 a,a	1,39 $\pm$ 1,28 a,a	6,86 $\pm$ 0,53 a,b	8,17 $\pm$ 1,30 b,b	18,23 $\pm$ 2,21 a,a	7,31 $\pm$ 2,89 b,a	29,25 $\pm$ 0,72 a,a	27,53 $\pm$ 0,42 b,a
Média	4,26 $\pm$ 2,35 a	1,25 $\pm$ 0,83 b	7,03 $\pm$ 0,43 a	7,40 $\pm$ 0,90 a	20,77 $\pm$ 5,18 a	9,13 $\pm$ 2,59 b	29,92 $\pm$ 0,89 a	27,47 $\pm$ 0,57 a

Letras *a* e *b* antes da vírgula indicam $p < 0,05$ entre período sazonal (seco e chuvoso) e após a vírgula indicam $p < 0,05$ entre bancos no mesmo período.

Espacialmente, entre os bancos, foi registrado no período seco maiores concentrações de OD na Croa em relação à Ponte, não havendo diferença no período chuvoso. O pH no período seco esteve mais elevado no banco Palácio em relação a Ponte e valores próximos a neutralidade. O inverso foi observado no período chuvoso, quando esteve mais alcalino em Ponte. A salinidade não divergiu espacialmente entre os bancos no período sazonal, já a temperatura esteve mais elevada em Ponte no período seco.

3.2 Metais em sedimento do SERC

A concentração média dos metais nos três BP durante os períodos sazonais indicou no período seco (PS) valores mais elevados para Al, Zn, Mn, Cu, Cr, As, Cd e Hg, enquanto no período chuvoso (PC) o metal Ni foi mais elevado ($p < 0,05$). O chumbo não apresentou diferença entre períodos sazonais ($p > 0,05$), conforme Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações de metais em mg kg^{-1} (mínimo, máximo, média $\pm$ desvio padrão – DP) em amostras de sedimento de três bancos de pesca de *Mytella charruana* no SERC em períodos sazonais, frente a valores de Diretriz de Qualidade de Sedimentos (DQS) e amostras controle (*background*) de Barra de Camaragibe, Alagoas.

Metais	Período Seco			Período Chuvoso			DQSs		Valores de Background
	Min	Max.	Média $\pm$ DP	Min	Max.	Média $\pm$ DP	ERL/ERM	TEL/PEL	
Al	70,0	78.686	48.428 $\pm$ 20.659 a	18,0	6.403	20.969 $\pm$ 13.845 b	-	-	-
As	<LQ	4,63	2,95 $\pm$ 1,38 a	<LQ	3,08	1,0 $\pm$ 1,24 b	8,2 / 70	7,24 / 41,6	3,35
Cd	<LQ	1,42	0,81 $\pm$ 0,36 a	<LQ	1,05	0,37 $\pm$ 0,39 b	1,2 / 9,6	0,68 / 4,21	0,19
Pb	<LQ	37,4	9,5 $\pm$ 7,70 a	<LQ	28,3	10,3 $\pm$ 11,1 a	46,7 / 218	-	1,29
Cu	23,35	68,39	49,3 $\pm$ 12,5 a	1,40	38,3	25,6 $\pm$ 10,0 b	34 / 370	30,2 / 112	2,5
Cr	<LQ	59,2	41,1 $\pm$ 14,8 a	11,6	45,2	30,3 $\pm$ 9,3 b	81 / 370	52,3 / 160	10,29
Mn	40,27	250	95,8 $\pm$ 43,4 a	30,1	124,5	69,3 $\pm$ 24,2 b	-	-	40,55
Hg	<LQ	0,34	0,20 $\pm$ 0,10 a	0,04	0,19	0,14 $\pm$ 0,05 b	0,15 / 0,71	0,13 / 0,70	0,16
Ni	5,53	17,0	11,7 $\pm$ 2,86 b	2,81	46,9	12,8 $\pm$ 12,8 a	20,9 / 51,6	15,9 / 42,8	1,27
Zn	12,7	203	114,0 $\pm$ 42,7 a	36,3	135,6	89,2 $\pm$ 32,5 b	150 / 410	124 / 271	16,81

ERL= concentração abaixo da qual os efeitos tóxicos são pouco observados ou previstos; ERM = concentração acima da qual os efeitos são geralmente ou sempre observados (LONG et al., 1995). TEL = Nível Limiar de Efeitos adversos à comunidade biológica; PEL = Nível de Efeitos Adversos Prováveis à comunidade biológica (MacDonald et al., 1996). Letras distintas indicam diferença significativa. LQ –Limite de Quantificação do método.

A análise dos bancos, entre período seco e chuvoso, indicou concentrações significativamente mais elevadas ($p < 0,05$) de (As, Cd, Cu e Zn) no banco Palácio, (Al e Cu) no banco Croa e os metais (Cu e Hg) no banco Ponte. No período seco, a concentração de (Mn) foi maior no banco Palácio do que no banco Ponte, não sendo verificadas diferenças significativas para os outros metais ($p > 0,05$). Durante o período chuvoso, os metais (Al, As, Cd, Pb, Mn e Ni) não apresentaram diferenças significativas entre bancos de pesca ($p > 0,05$), enquanto para os metais (Cr, Cu e Hg) as concentrações na Croa foram maiores do que na Ponte ($p < 0,05$), e (Zn) foi maior na Croa do que nos outros bancos, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Análise comparativa das concentrações de metais em mg kg⁻¹ (média ± DP) no sedimento de bancos de pesca de *Mytella charruana* no SERC nos períodos seco e chuvoso, frente aos valores da Diretriz de Qualidade do Sedimento (DQS).

Metais	Período Seco			Período Chuvoso			DQS	
	Palácio	Croa	Ponte	Palácio	Croa	Ponte	ERL/ERM	TEL/PEL
Al	48.132 ± 25.881 a	52.250 ± 14.847 a ‡	44.900 ± 22.984 a	27.738,17 ± 14.374,86 a	23.844,0 ± 16.118,7 a ‡	11.325 ± 2.959 a	-	-
As	3,71 ± 0,72 a ‡	2,86 ± 1,66 a	2,29 ± 1,40 a	1,22±1,35 a ‡	1,3±1,4 a	0,6± 1,0 a	8,2 / 70	7,24/41,6
Cd	0,84 ± 0,45 a ‡	0,97 ± 0,29 a	0,61 ± 0,25 a	0,25±0,28 a ‡	0,5±0,5 a	0,3±0,4 a	1,2 / 9,6	0,68/4,21
Pb	11,98 ± 13,01 a	7,74 ± 4,05 a	8,88 ± 2,09 a	7,17±7,89 a	12,5±13,8 a	11,2±12,2 a	46,7 / 218	-
Cu	49,77 ± 6,47 a ‡	53,31 ± 10,12 a ‡	44,72 ± 18,44 a ‡	25,45±8,30ab ‡	34,4±2,7 a ‡	16,9±9,1 b ‡	34 / 370	30,2/112
Cr	39,19 ± 20,35 a	45,30 ± 8,06 a	38,80 ± 15,32 a	29,98±7,76 ab	39,3±3,8 a	21,5±5,5 b	81 / 370	52,3/160
Mn	124,68 ± 61,7a	88,14 ± 11,09 ab	74,52 ± 29,34 b	74,62±16,54 a	78,0±10,7 a	55,2±35,2 a	-	-
Hg	0,21 ± 0,11 a	0,16 ± 0,12 a	0,22 ± 0,06 a ‡	0,14±0,03 ab	0,20 ±0,0 a	0,10 ±0,0 b	0,15 / 0,71	0,13/0,70
Ni	12,75 ± 2,19 a	12,00 ± 1,86 a	10,36 ± 3,98 a	8,77±3,17 a	10,8±1,0 a	18,8±21,8 a	20,9 / 51,6	15,9/42,8
Zn	106,03 ± 8,56 a ‡	137,00 ± 24,87 a	98,85 ± 67,27 a	78,00±21,12 b ‡	126,9±7,6 a	62,7±19,7 b	150 / 410	124/271

ERL= concentração abaixo da qual os efeitos tóxicos são pouco observados ou previstos; ERM = concentração acima da qual os efeitos são geralmente ou sempre observados (LONG et al., 1995). TEL = Nível Limiar de Efeitos adversos à comunidade biológica ; PEL = Nível de Efeitos Adversos Prováveis à comunidade biológica (MacDonald et al., 1996). Letras *a* e *b* indicam $p < 0,05$ entre bancos e (‡) indicam $p < 0,05$ entre período sazonal no banco.

3.3 Metais em tecidos de *Mytella charruana*

A concentração média de metais nos tecidos de *M. charruana* entre períodos sazonais indicou, para o metal cromo (Cr), concentrações mais elevadas no período chuvoso ($p < 0,05$). Os outros metais avaliados (Al, As, Cd, Pb, Cu, Mn, Hg, Ni e Zn) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre períodos (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração mínima, máxima e média (± DP) em mg kg⁻¹ de metais (peso úmido) em tecidos de *Mytella charruana* no SERC nos períodos seco e chuvoso.

Metais (mg.kg ⁻¹)	Período Seco			Período Chuvoso		
	Mínimo	Máximo	Média + DP	Mínimo	Máximo	Média + DP
Al	1,36	160,0	44,15 ± 45,28 a	6,21	44,6	27,34 ± 9,43 a
As	0,46	0,87	0,65 ± 0,11 a	<LQ	1,03	0,55 ± 0,34 a
Cd	<LQ	<LQ	0,00 ± 0,00 a	<LQ	<LQ	0,00 ± 0,00 a
Pb	<LQ	0,01	0,02 ± 0,03 a	<LQ	0,13	0,04 ± 0,05 a
Cu	<LQ	2,98	1,96 ± 0,66 a	<LQ	3,96	1,89 ± 0,88 a
Cr	<LQ	0,27	0,02 b ± 0,06 b	<LQ	0, 76	0,14 ± 0,22 a
Mn	<LQ	5,37	2,46 ± 1,33 a	1,09	4,17	2,32 ± 0,84 a
Hg	<LQ	0,20	0,09 ± 0,10 a	<LQ	0,20	0,01 ± 0,05 a
Ni	<LQ	0,26	0,12 ± 0,10 a	<LQ	0,26	0,06 ± 0,10 a
Zn	<LQ	9,59	7,26 ± 2,78 a	<LQ	11,4	6,72 ± 2,99 a

Letras *a* e *b* indicam diferenças significativa ($p < 0,05$) entre médias no período sazonal.

A análise dos bancos de pesca entre períodos sazonais indicou, no período seco, concentração mais alta do metal (Ni) no Palácio e do metal (Cr) na Croa ($p < 0,05$). No período chuvoso, (As) foi maior nos bancos Palácio e Croa ($p < 0,05$) e (Hg) foi maior na Croa ($p < 0,05$). Os outros metais (Al, Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Ni e Zn) não apresentaram diferença significativa entre os bancos no período sazonal (Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio padrão das concentrações de metais em mg kg^{-1} (peso úmido) de metais em tecidos de *Mytella charruana* de três bancos de pesca do SERC em cada período sazonal.

Metais	Seco (Méd $\pm$ DP)			Chuvoso (Méd $\pm$ DP)		
	Palácio	Croa	Ponte	Palácio	Croa	Ponte
Al	45,13 $\pm$ 18,35 a	71,52 $\pm$ 67,95 a	31,53 $\pm$ 37,94 a	26,57 $\pm$ 13,53 a	28,7 $\pm$ 8,18 a	26,64 $\pm$ 6,20 a
As	0,69 $\pm$ 0,11 a	0,65 $\pm$ 0,10 a	0,61 $\pm$ 0,11 a ‡	0,70 $\pm$ 0,25 a	0,72 $\pm$ 0,18 a	0,17 $\pm$ 0,27 b ‡
Cd	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a
Pb	0,08 $\pm$ 0,00 a	0,08 $\pm$ 0,00 a	0,08 $\pm$ 0,00 a	0,05 $\pm$ 0,05 a	0,05 $\pm$ 0,05 a	0,02 $\pm$ 0,04 a
Cu	1,96 $\pm$ 0,26 a	2,11 $\pm$ 0,97 a	1,88 $\pm$ 0,39 a	1,96 $\pm$ 1,31 a	1,69 $\pm$ 0,49 a	2,06 $\pm$ 0,73 a
Cr	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,04 $\pm$ 0,01 b	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,26 $\pm$ 0,31 a	0,09 $\pm$ 0,14 a	0,04 $\pm$ 0,09 a
Mn	2,21 $\pm$ 0,58 a	3,31 $\pm$ 1,78 a	1,88 $\pm$ 0,95 a	1,99 $\pm$ 0,90 a	2,71 $\pm$ 0,90 a	2,24 $\pm$ 0,62 a
Hg	0,10 $\pm$ 0,05 a	0,10 $\pm$ 0,05 a	0,07 $\pm$ 0,06 a	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,03 $\pm$ 0,06 a	0,00 $\pm$ 0,00 b
Ni	0,22 $\pm$ 0,33 a	0,18 $\pm$ 0,01 b	0,18 $\pm$ 0,02 b	0,08 $\pm$ 0,11 a	0,06 $\pm$ 0,09 a	0,04 $\pm$ 0,09 a
Zn	7,71 $\pm$ 1,09 a	6,11 $\pm$ 4,42 a	8,10 $\pm$ 0,70 a ‡	6,04 $\pm$ 4,37 a	7,74 $\pm$ 2,65 a	6,29 $\pm$ 0,69 a ‡

Letras *a* e *b* indicam $p < 0,05$ entre bancos e (‡) indicam $p < 0,05$ entre período sazonal no banco.

3.4 Bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas organoclorados e outros pesticidas em *Mytella charruana*

De um total de 182 PCBs investigados em tecidos de *M. charruana* do SERC, 55 congêneres foram detectados nos tecidos do bivalve em concentrações acima do limite de quantificação (LQ), sendo eles: 16/32, 17, 18, 20/33, 28, 31, 44, 47/75, 49, 51, 52/73, 53, 66/80, 70/76, 84, 86/97, 87/115, 90/101, 95, 99, 105/127, 110, 111/116/117, 118, 121, 128, 135/144, 138/160, 139/149, 140, 146, 147, 151, 153, 158, 163, 164, 175 e 182/187. Os PCBs coeluídos (separados por barra na lista acima) apareceram sobrepostos no cromatograma, não permitindo separá-los na coluna cromatográfica. A distribuição dos grupos homólogos de PCBs revelou predominância de hexaclorobifenilas e pentaclorobifenilas (Figura 2).

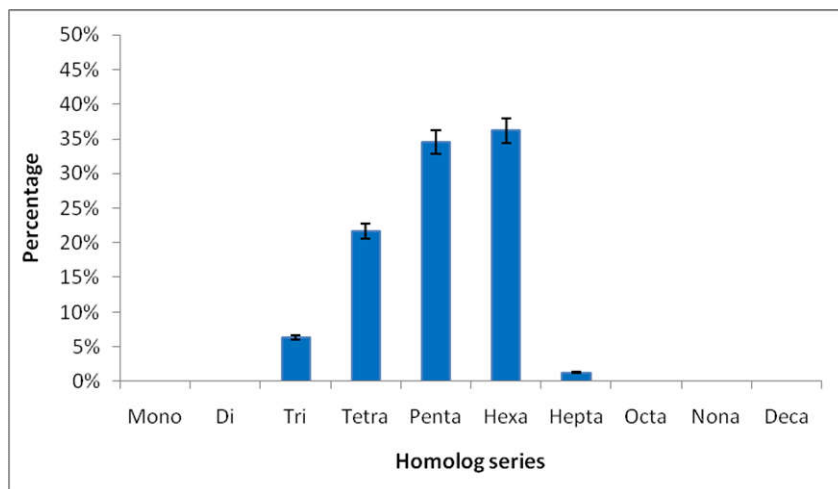


Figura 2. Grupos homólogos de PCBs em tecidos de *Mytella charruana* capturados no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC), nordeste do Brasil.

A concentração média no período sazonal (seco e chuvoso) para a soma dos PCBs nos bancos de pesca de *M. charruana* foi de $38,08 \pm 9,35 \text{ ng g}^{-1}$. As concentrações de PCBs nas amostras variaram de não detectado (nd) a $26,15 \text{ ng g}^{-1}$, esta última registrada no período chuvoso no BP Ponte. Os pesticidas organoclorados diclorodifeniltricloroetano e seus metabólitos (DDTs), variaram de nd a $24,78 \text{ ng g}^{-1}$ e apresentaram concentração média de $21,3 \pm 5,0 \text{ ng g}^{-1}$, enquanto os clordanos (CHLs) foram detectados em concentrações abaixo do limite de quantificação do método - LQ (Tabela 6).

Tabela 6. Concentrações em peso seco (ng g^{-1}) de compostos organoclorados (PCBs, DDTs e CHLs) em tecidos de *Mytella charruana* de bancos de pesca no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe e controle em Barra de Camaragibe (BC).

POPs (ng g^{-1})	Período Seco				Período Chuvoso				Média Sazonal	BC
	Palácio	Croa	Ponte	Média	Palácio	Croa	Ponte	Média		
PCBs	33,5 $\pm 8,1 \text{ a}$	43,4 $\pm 8,0 \text{ a}$	40,1 $\pm 3,9 \text{ a}$	39,02 $\pm 6,37 \text{ a}$	35,6 $\pm 5,3 \text{ a}$	31,49 $\pm 5,29 \text{ a}$	45,43 $\pm 11,85 \text{ a}$	37,07,36 $\pm 7,72 \text{ a}$	38,08 $\pm 9,35$	1,35
DDTs	20,2 $\pm 7,6 \text{ a}$	20,0 $\pm 3,4 \text{ a}$	20,7 $\pm 3,4 \text{ a}$	20,3 $\pm 4,9 \text{ a}$	21,3 $\pm 2,9 \text{ a}$	22,1 $\pm 7,7 \text{ a}$	23,7 $\pm 4,1 \text{ a}$	22,3 $\pm 5,1 \text{ a}$	21,3 $\pm 5,0$	0,73
CHLs	<0,62 a	<0,61 a	<0,63 a	<0,63 a	<0,62 a	<0,62 a	<0,61 a	<0,61 a	<0,62	nd

Letras *a* e *b* indicam $p < 0,05$ entre bancos e (†) indicam $p < 0,05$ entre período sazonal no banco. PS – período seco; PC – período chuvoso.

Acima do LQ foram detectados os metabólitos dos DDTs (o,p'-DDD, p,p'-DDD e p,p'-DDE), sendo que apenas o,p'-DDE não foi encontrado. As concentrações para os DDTs e CHLs variaram, respectivamente, de nd a 24,78 ng g⁻¹ ps e nd a < 0,66 ng g⁻¹ ps. Hexaclorociclohexanos (HCHs), heptacloro e mirex não foram detectadas nos tecidos de *M. charruana*.

As concentrações de PCBs e DDTs não indicaram diferenças significativas entre os bancos de pesca e períodos seco e chuvoso ($p > 0,05$). Dentre os demais grupos de pesticidas avaliados (organofosforados, carbamatos e piretroides), apenas o composto cipermetrina (Cyp) do grupo piretroide foi encontrado, em concentração de 25,0 ng g⁻¹ (peso úmido) no BP Ponte no período seco (Tabela 6).

3.5 Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em *M. charruana*

A atividade da enzima AChE de *M. charruana* do SERC não apresentou diferença significativa entre período sazonal, bem como, em relação a valores médios da estação controle em Barra de Camaragibe, Alagoas ($p > 0,05$). O BP Croa foi a única estação do SERC que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no período sazonal, com maior atividade no inverno (Tabela 7, Figura 3).

Tabela 7. Comparação entre as atividades da enzima AChE de *Mytella charruana* (mU mg⁻¹) nos bancos de pesca do SERC e estação controle em Barra de Camaragibe (AL).

Período	Bancos de Pesca				
	Controle	Palácio (PL)	Croa (CP)	Ponte (PP)	Média SERC
Seco	28.06 ± 13.53 a,a	24.10 ± 11.10 a,a	20.12 ± 10.80 a,a	27.48 ± 14.78 a,a	23,86 ± 2,21 a
Chuvoso	44.19 ± 3.58 a,a	53.97 ± 13.0 3a,a	58.83 ± 17.11 b,a	51.93 ± 12.14 a,a	54,91 ± 2,65 a

Letters *a* and *b* before the comma indicate $p < 0.05$ between banks in different seasonal periods and after the comma indicate $p < 0.05$ between banks in the same seasonal period according to ANOVA followed by Bonferroni, Dunn-Sidak and Tukey tests after aftermeeting the requirements for normality (Shapiro-Wilk, Lilliefors and Kolmogorov-Smirnov) and homogeneity of variances (Levene, Levene^2 and Brown-Forsythe).

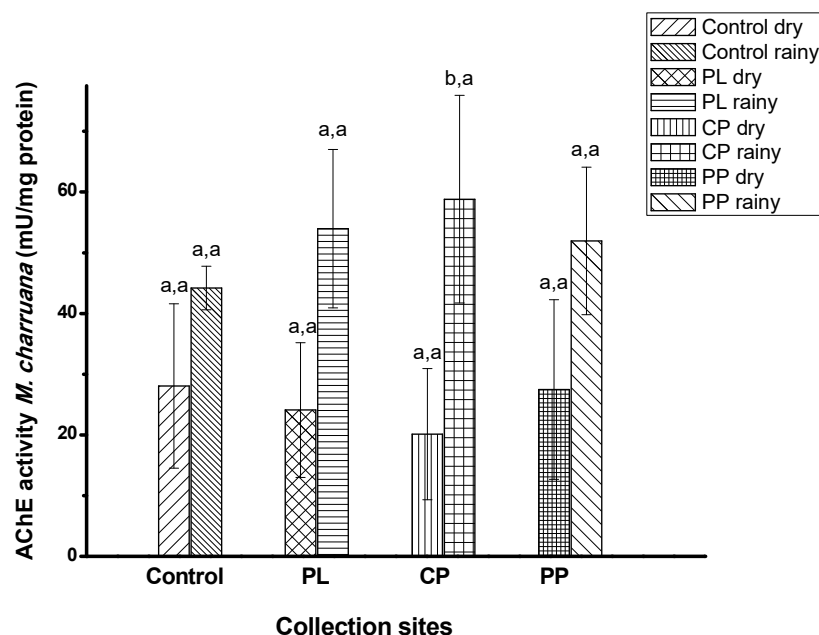


Figura 3. Comparação entre as médias totais de atividade AChE de *Mytella charruana* nos bancos de pesca de *M. charruana* Palácio (PL), Croa (CP) e Ponte (PP) no período sazonal. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n = 144$). Após as premissas de normalidade de acordo com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade de variâncias de acordo com Levene e Brown-Forsythe, foi realizada ANOVA-one way seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 Discussão

4.1 Análise da contaminação de metais em sedimento do SERC

Os metais ocorrem naturalmente no sedimento de ambientes marinhos, mas inúmeras atividades antrópicas, tais como esgoto industrial e urbano contribuem com a entrada destes metais no meio e podem ser influenciados por fatores abióticos (Robson et al., 2016) e processos biogeoquímicos e geoquímicos como sedimentação, precipitação e floculação de substâncias particuladas (Che et al., 2003).

A variabilidade sazonal de metais no sedimento do SERC indicou que 90% dos metais avaliados (Al, As, Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Hg e Zn) apresentaram valores mais elevados no período seco e de menor precipitação pluviométrica. Diretrizes de qualidade de sedimentos (SQGs) foram propostas por Long et al. (1995) e Macdonald et al. (1996) no intuito de avaliar os potenciais efeitos biológicos adversos aos organismos quanto à presença de produtos químicos tóxicos em estuários e sedimentos marinhos.

Valores para efeitos de alcance baixo - ERL (effects range-low = intervalo de efeito baixo) e efeitos de alcance médio - ERM (effects range median = intervalo de efeito mediano) foram desenvolvidos por Long et al. (1995), enquanto MacDonald et al. (1996) propuseram valores para TEL (threshold effects level = nível limiar de efeitos) e PEL (probable effect level = nível de efeito provável). Em ambos os estudos, os autores sugeriram que concentrações nas faixas intermediárias ($\geq$ ERL e $\leq$ ERM) e ($\geq$ TEL e $\leq$ PEL) indicam um possível efeito adverso à comunidade biológica.

A concentração média para os metais (Cd) nos bancos Palácio e Croa, (Cu e Hg) nos bancos Croa e Ponte, (Zn) no banco Croa e (Ni) em Ponte, quando confrontada aos valores sugeridos pela DQS, indicou possíveis efeitos adversos ao *M. charruana* nestes locais. O enquadramento dos resultados em valores percentuais que se apresentaram na faixa $\geq$ ERL e $\geq$ TEL (MacDonald et al., 1996) estão demonstrados na Figura 4 (a e b).

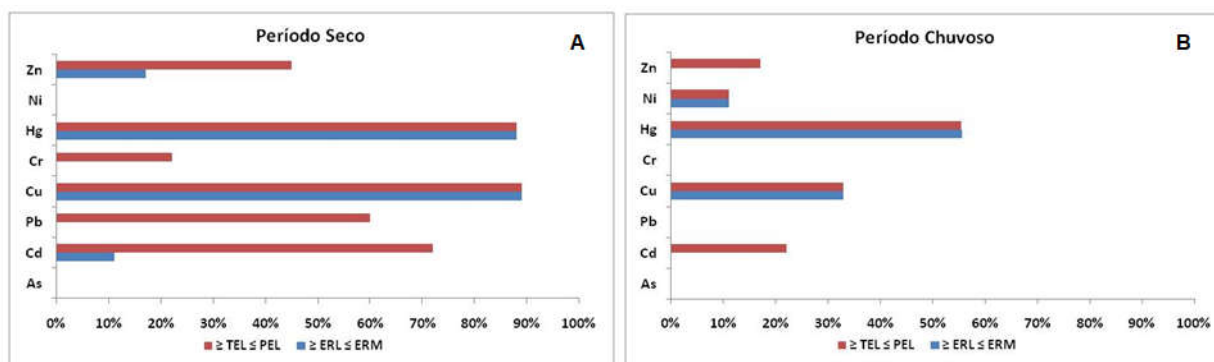


Figura 4. Valores percentuais da concentração de metais enquadradas nas faixas $\geq$ ERL e $\leq$ ERM e $\geq$ TEL e $\leq$ PEL em período seco (a) e chuvoso (b) no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC).

O período seco se destaca, com 88% (Hg e Cu), 72% (Cd) e 60% (Pb) acima do TEL e 89% dos valores de Hg e Cu acima do ERL. No período chuvoso, destaca-se o Hg com 56% das amostras acima do TEL e ERL.

Os valores de metais encontrados no sedimento do SERC foram comparados a outros estudos realizados em estuários do Brasil e de outras partes do globo, conforme descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações médias de metais no sedimento de bancos de pesca de *Mytella charruana* do SERC (mg kg^{-1}) e de outros estuários em diferentes regiões.

Referência	Al	As	Cd	Pb	Cu	Cr	Mn	Hg	Ni	Zn	Estuário, Região, País
Presente estudo	34,698	1,99	0,59	9,91	37,41	35,67	82,53	0,17	12,25	101,6	Rio Capibaribe, NE, Brasil
Senez Mello et al., (2020)	-	-	0,06	23,44	29,7	81,33	-	-	29,1	78	Rio Potengi, NE, Brasil
Fan et al. (2020)	-	8,8	0,13	25,8	19,7	34,4	-	0,064	-	71,5	Estuário do Rio Yangtze, China
M. Barletta et al., (2019)	-	-	<0,01-	<0,05-	<0,03-	<0,013-	-	<0,03-	<0,06-	-	Países da América do Sul
Mitra, A. (2019)	-	-	-	4,53	18,44	-	-	0,83	-	58,82	Baía de Bengal, Índia
Azevedo e Salgado (2019)	-	-	<LD	180	68,43	<LD	3890	-	<LD	229,88	Iguape, Cananeia, SP, Brasil
Barros et al. (2019)	-	-	0,12	3,77	1,02	1,33	6,91	-	-	7,56	Lagoa Mundaú, NE, Brasil
Regis et al (2018)	-	4,25	0,29	28,37	39,25	45,75	-	0,22	14,55	141,5	Rio Capibaribe, NE, Brasil
Fragoso et al. (2018)	-	-	-	-	-	-	-	0,03 - 0,123	-	-	Paraíba do Sul, RJ, Brasil
Sundaramanickam et al. (2016)	-	-	1,0	17,52	22,86	34,0	155,98	-	10,97	22,53	Parangipettai, Índia
Abreu et al. (2016)	19,792	-	0,0009	0,045	-	0,055	424,33	-	0,05	0,22	Baía de Guanabara, RJ, Brasil
Ali et al. (2015)	-	-	0,4	45,0	64,2	171,0	-	-	34,0	68,0	Coastal Belt, Paquistão
Kumar et al. (2015)	17,918	-	1,42	53,16	16,80	25,24	158,99	-	<LD	5,03	Ilha de Vitória, ES, Brasil
Zhang et al. (2014)	-	-	0,0-5,4	0,0-19	0,5-93	0,0-363	20-1026	6,7-15	0,0-180	9-410	Estuários da China
Coimbra et al., (2015)	-	-	3,51	35,74	5,65	15,96	30,98	-	6,72	44,4	Rio Maracaipe, NE, Brasil
Baruaem et al., (2013)	-	-	0,14	-	41,00	-	-	-	-	53,7	Rio Potengi NE, Brasil
Gao and Chen (2012)	-	-	-	43,65	41,5	142,55	-	-	38,05	256,15	Baía de Bohai, China
Covelli et al. (2012)	-	-	-	-	-	-	-	0,1 - 3,22	-	-	Baía de Guanabara, RJ, Brasil
Ramos, SVC (2011)	84,497	1,532	-	83,5	-	32,5	134	-	-	62,35	Rio Formoso, NE, Brasil
Noronha et al., (2011)	-	-	-	-	-	66	138	-	-	155	Rio Timbó, NE, Brasil
Silva et al. (2010)	-	-	-	-	-	81	180	-	-	255	Rio Capibaribe, NE, Brasil
Arruda, G.N (2010)	2,077	3,75	0,074	3,04	3,89	5,92	22,29	-	-	29,63	Rio Formoso, NE, Brasil
Sabadini et al. (2009)	-	-	-	8,72	9,93	39,42	106,35	-	12,17	20,43	São Francisco, NE, Brasil
Macedo et al. (2007)	-	-	-	-	83,5	161,5	319	-	-	275	Rio Capibaribe, NE, Brasil
Censi et al. (2006)	-	-	-	-	10,51	32,06	115,5	-	7,31	175,8	Golfo da Tailândia
Lacerda et al. (2004)	-	-	0,36	5,83	8,36	-	-	-	-	25,2	Estuários do Ceará, NE, Brasil
Calado, SCS (2004)	-	-	-	4,27	40,9	-	-	-	-	9,68	Itamaracá, NE, Brasil
Brayner et al. (2003)	-	-	5,7	65,44	36,09	73,75	186,89	-	12,82	142,21	Rio Capibaribe, NE, Brasil
Coimbra, AG (2003)	-	-	-	-	0,012	0,015	-	0,011	0,035	0,245	Bahia Sepetiba RJ

(-) não mensurados pelos autores.

No sedimento do SERC, as concentrações de (Al) estiveram acima das reportadas por Abreu et al. (2016) na Baía de Guanabara ($19.792 \text{ mg kg}^{-1}$) e Kumar et al. (2015) na Ilha de Vitória ($17.972 \text{ mg kg}^{-1}$), regiões portuárias no Brasil. Quanto ao (As), metal considerado altamente tóxico e de caráter bioacumulativo (Liu et al., 2006), valores de até 3.000 mg kg^{-1} foram registrados em sedimento estuarino (WHO, 2001). No SERC este metal apresentou concentrações inferiores ao TEL e ERM, bem como, a reportada por Fan et al., (2020) em estuários da China ($8,8 \text{ mg kg}^{-1}$) e por Xavier et al (2017) em testemunho de 158 cm de profundidade instalado no Banco Croa do SERC (71 mg kg^{-1}) e Regis et al., (2018) em sedimento superficial ($4,25 \text{ mg kg}^{-1}$).

O cádmio (Cd) no sedimento apresentou concentrações acima do TEL nos bancos Palácio e Croa, com níveis mais elevados no período seco. Estudo realizado por Brayner et al (2003) no SERC registraram valores mais elevados ($5,7 \text{ mg kg}^{-1}$) do que o

presente estudo, enquanto Regis et al (2018) encontrou concentração inferior ($0,29 \text{ mg kg}^{-1}$). O metal chumbo (Pb) no meio ambiente é em grande parte resultante de atividades antropogênicas (WHO, 2006) e baixas concentrações ($9,9 \text{ mg kg}^{-1}$) foram registradas no sedimento quando comparadas a estudos pretéritos no SERC, que reportaram $28,37 \text{ mg kg}^{-1}$ (Regis et al., 2018) e $65,4 \text{ mg kg}^{-1}$ (Brayner et al., 2003). Outros estuários apresentaram valor acima do SERC, a exemplo da China (Fan et al., 2020) e Índia (Sundaramanickam et al., 2016), conforme Tabela 8.

O metal cobre (Cu) esteve acima de ERM e TEL, sugerindo efeitos adversos aos organismos no SERC (Long et al., 1995; MacDonald et al., 1996). Brayner et al. (2003) registrou concentrações mais elevadas igualmente no período seco, divergindo do reportado por Hamed et al. (2006) no Golfo de Suez, onde foi mais elevado no período chuvoso. As concentrações de cromo (Cr) e (Mn) foram encontradas em concentração inferior aos estudos pretéritos no SERC desenvolvidos cronologicamente por Brayner et al (2003), Macedo et al (2007), Silva et al (2010) e Regis et al (2018). Os autores registram concentração média de $90,5 \text{ mg kg}^{-1}$ para o (Cr) e de 228 mg kg^{-1} para o (Mn), respectivamente 60,5 % e 65 % acima do presente estudo.

Já o mercúrio (Hg) causa preocupação ambiental devido a possibilidade de bioacumulação em organismos aquáticos e biomagnificação em humanos (Wolswijk et al, 2020). No SERC, 90% dos resultados estiveram acima do ERM e TEL no período seco, valores que podem refletir efeitos adversos aos organismos. Diluição no período chuvoso por meio de sedimentos carregados para o estuário pela lixiviação e pobres em Hg podem causar essa diferença (Lacerda et al.1993). As concentrações de Hg no SERC ($0,17 \text{ mg kg}^{-1}$) estiveram próximas a reportada por Regis et al (2018) no mesmo estuário ($0,22 \text{ mg kg}^{-1}$), porém abaixo de estuários do sudeste do Brasil ($1,66 \text{ mg kg}^{-1}$) encontrado por Covelli et al. (2012). Valores mais elevados foram reportados por Robson et al (2016) em estuário no Atlântico Norte ($0,52 \text{ mg kg}^{-1}$) e Europa ($0,27 \text{ mg kg}^{-1}$), bem como Zhang et al., (2014) em estuários da China ($10,5 \text{ mg kg}^{-1}$), evidenciando igualmente valores acima do ERL.

O níquel (Ni) foi o único metal que apresentou concentração mais elevada no período chuvoso, em relação ao verão, fato que pode estar associado as concentrações mais elevadas na formação barreira a montante (CPRM, 2005) e que podem carrear contribuições em épocas de chuva. Valores acima do PEL foram registrados no banco Ponte, que podem ocasionar efeitos adversos aos organismos (MacDonald et al. 1996). As concentrações do presente estudo estiveram próximas a registrada por Brayner et al.

(2003) e Regis et al (2018), o que sugere baixa contribuição antrópica para este metal no SERC. O zinco (Zn) apresentou valores mais elevados e acima do TEL nos bancos Palácio e Croa, indicando provável efeito adverso aos organismos (MacDonald et al., 1996). A concentração média (101,6 mg kg⁻¹) encontrada no presente estudo foi 50 % inferior a registrada em estudos pretéritos (Brayner et al., 2003; Macedo et al., 2007; Silva et al., 2010; Regis et al., 2018) que representaram uma concentração média de 203,42 mg kg⁻¹. Valor mais elevado foi reportado por Gao and Chen (2012) em estuário da China (256,15 mg kg⁻¹).

4.2 Análise da contaminação de metais em tecidos de *Mytella charruana* do SERC

Os valores de metais em tecidos de *M. charruana* foram comparados a outros estudos, conforme descritos respectivamente na Tabelas 9. Devido ao número reduzido de publicações com a espécie *M. charruana*, foram inseridos resultados de outras espécies de mitilídeos para comparação com os valores encontrados para os espécimes do SERC.

Tabela 9. Concentrações médias de metais em tecidos de *Mytella charruana* em bancos de pesca do SERC (mg kg⁻¹) e em mexilhões de outros estuários em diferentes regiões.

Referência	Espécie	Al	As	Cd	Pb	Cu	Cr	Mn	Hg	Ni	Zn	Estuário, Região, País
Neste estudo	<i>M. charruana</i>	36,0	0,60	< LQ	0,028	1,93	0,074	2,39	0,05	0,09	6,99	Rio Capibaribe, NE, Brasil
Salama et al. (2020)	<i>L. lithophaga</i>	-	-	1,34	0,95	2,89	0,76	-	-	0,63	4,71	Alexandria, Egito
Oliveira, A.P.F (2019)	<i>M. guyanensis</i>	603,77	-	<LD	<LD	3,96	25,0	<LD	-	26,28	<LD	Paranaguá, PR, Brasil
Rodríguez et al. (2018)	<i>M. charruana</i>	-	-	0,18	0,35	-	-	-	-	-	-	Costas do México
Balgobin e Singh (2018)	<i>M. guyanensis</i>	-	7,48	0,78	1,08	11,16	0,98	34,76	0,11	8,78	51,13	Golfo de Pária, Trindad e Tobago
Moura et al. (2018)	<i>M. charruana</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,0005	-	-	Rio Jaguaribe, CE, Brasil
Campolim et al. (2018)	<i>P. perna</i>	375,23	-	0,11	0,38	1,63	0,37	2,33	-	2,31	27,11	Baia de Santos, SP, Brasil
Camargo, J.B.D.A (2018)	<i>P. perna</i>	-	2,06	0,026	0,05	-	0,076	-	0,022	-	20,15	Baixada Santista, SP, Brasil
Higino et al. (2016)	<i>M. charruana</i>	-	-	-	2,62	11,6	15,3	-	-	9,3	52,95	Lagoa Mundú, Alagoas
De souza et al. (2016)	<i>M. guyanensis</i>	1.577,5	9,41	0,22	8,04	30,18	1,96	8,04	0,14	-	72,9	Baia de Todos os Santos, BA, Brasil
Kumar et al. (2015)	<i>M. falcata</i>	-	-	3,87	-	17,57	-	27,51	-	-	96,25	Bahia de Vitória, ES
Kumar et al. (2015)	<i>M. guyanensis</i>	-	-	4,37	-	22,7	-	40,36	-	-	87,5	Bahia de Vitória, ES
Silva, A.F (2015)	<i>M. charruana</i>	-	<0,01	<0,03	<0,01	<0,05	<0,03	-	<0,01	-	-	Roteiro, AI, Brasil
Higino et al., (2012)	<i>M. charruana</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	Lagoa Mundaú, AL, Brasil
Ramos, S.V.C (2011)	<i>M. charruana</i>	662	21,4	-	1,16	-	0,22	8,72	-	-	13,33	Rio Formoso, PE, Brasil
De Souza et al. (2011)	<i>M. guyanensis</i>	1764,27	9,6	0,35	8,05	30,51	2,15	65,52	0,14	-	78,02	Bahia de Todos os Santos, BA, Brasil
Silva, HKP (2010)	<i>M. charruana</i>	131,9	-	-	-	3,2	-	4,25	-	-	8,45	Rio Capibaribe, NE, Brasil
Brito, Q. G (2010)	<i>M. falcata</i>	36,35	-	0,00	0,036	2,02	0,13	7,31	-	0,54	9,74	Rio Potengi, RN
Higino et al. (2009)	<i>M. charruana</i>	-	--	-	2,62	9,95	9,22	-	-	9,31	53,6	Lagoa do Mundaú, AL, Brasil

Catharino et al. (2008)	<i>P. perna</i>	-	-	1,0	2,0	-	-	-	0,5	-	50,0	Costa de São Paulo, SP, Brasil
Silva S.A.S.C (2008)	<i>M falcata</i>	164,4	-	<LD	-	4,1	<LD	3,8	-	<LD	8,95	Rio Timbó, PE, Brasil
Marini et al., (2008)	<i>M strigata</i>	-	-	0,22	1,74	0,007	-	-	0,09	-	0,013	Golfo da California, México
Kehrig et al. (2007)	<i>P. perna</i>	-	-	0,02	0,74	1,85	0,26	-	0,035	1,5	22,32	Baía de Guanabara, RJ, Brasil
Brito et al. (2007)	<i>M falcata</i>	-	-	-	0,14	0,9	-	-	-	-	-	Estuário do Rio Potengi
Rojas et al. (2007)	<i>M falcata</i>	-	-	-	-	26,42	-	-	-	-	31,23 - 45,41	Estuário Rio Bacanga, Maranhão
E Silva et al. (2006)	<i>M charruana</i>	-	-	1,79	-	17,7	-	68,3	167,2	10,153	80,5	Rio Potengi, RN, Brasil
Batalha et al. (2003)	<i>M charruana</i>	-	-	<LD	1,0	4,25	<LD	5,55	-	1,75	15,0	Baía de Sepetiba, RJ
Otchere et al. (2003)	<i>P perna</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,26	-	-	Costa Oeste, Ghana, Africa
Pereira et al. (2002)	<i>M falcata</i>	-	-	0,09	0,15	1,91	-	-	0,023	-	37,88	Baixada Santista, SP, Brasil
Torres et al. (2002)	<i>M. guyanensis</i>	-	-	0,00065	0,00066	0,00065	0,00047	-	-	-	-	Florianópolis, SUL, Brasil
Carvalho et al. (2001)	<i>P. perna</i>	1.317	-	0,38	1,8	5,1	1,25	8,2	-	8,9	83	Ilha de Santana, NE, Brasil
Avelar et al. (2000)	<i>P. perna</i>	-	-	2,60	11,08	3,27	5,10	-	-	-	-	Litoral de Ubatuba, SE, Brasil
Carvalho et al. (2000)	<i>M falcata</i>	-	-	<2,0	<2,0	5,2-13,1	-	-	-	-	49,1 - 76,3	Estuário Rio Bocanga, NE, Brasil

(-) não mensurados pelos autores.

Maiores concentrações de Al em tecidos de *M. charruana* foram registradas no período seco ($p < 0,05$), quando comparada ao chuvoso, porém representaram apenas 1% da registrada para o sedimento. No SERC, Silva (2010) reportou concentrações de $131,9 \text{ mg kg}^{-1}$ em tecidos de *M. charruana* coletados em local de forte influência de efluentes sanitários no SERC, valor 70% acima do presente estudo ($36,0 \text{ mg kg}^{-1}$). De Souza et al (2016) registraram concentração de 1.577 mg kg^{-1} em tecidos de *M. guyanensis* coletados em região portuária na Baía de Todos os Santos, sugerindo concentrações baixas quando comparada a outros estuários (Tabela 8).

A influência do arsênio (As) nos organismos é atribuída em maior parte à fontes antrópicas (Kato et al., 2020) e concentrações de até $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ já foram encontradas em tecidos de bivalves (WHO, 2001). Os valores encontrados em *M. charruana* do SERC foram inferiores a bivalves de outros estuários, conforme reportou Balgobin e Singh (2018) em *M. guyanensis* ($7,48 \text{ mg kg}^{-1}$) de Trindade Tobago e De souza et al. (2016) em *M. Guyanensis* ($9,41 \text{ mg kg}^{-1}$) na Baía de Todos os Santos.

Os valores de cádmio (Cd) em tecidos de *M. charruana* estiveram abaixo do limite de detecção do método (<LQ). De acordo com Wang et al. (2016) os mexilhões possuem menor potencial de bioacumulação do Cd quando comparado às ostras, que possuem mecanismo de filtração mais eficiente. Batalha et al (2003) e Oliveira (2019) também registraram valores abaixo do LQ em estuários da região sudeste do Brasil, respectivamente para *M. charruana* e *M. guyanensis*, porém valores de $4,37 \text{ mg kg}^{-1}$ foram reportados por Kumar et al (2015) em estuário de região portuária no sudeste do

Brasil. As concentrações de chumbo (Pb) em *M. charruana* do SERC (0,028 mg kg⁻¹) estiveram abaixo da encontrada por Rodrigues et al (2018) em na costa do México (0,35 mg kg⁻¹) e Higino et al. (2016) na Lagoa do Mundaú (2,62 mg kg⁻¹), nordeste do Brasil, ambos avaliando *M. charruana*. Estudo realizado por Galal-Gorchev (1991) em mariscos de 30 países, registrou concentração média de 200 mg kg⁻¹ para o Pb, muito acima do presente estudo.

As concentrações de cobre (Cu) nos tecidos (1,93 mg kg⁻¹) não divergiram no período sazonal (seco e chuvoso) e estiveram abaixo da registrada por Silva (2010) para *M. charruana* (3,2 mg kg⁻¹) no SERC. Na Baía de Todos os Santos, De Souza et al (2016) registraram média de 30,18 mg kg⁻¹, enquanto Balgobin e Singh (2018) em Trindade Tobago encontraram 11,16 mg kg⁻¹ em *M. guyanensis*. O cromo (Cr) foi o único elemento que, em tecidos de *M. charruana*, apresentou concentração mais elevada no período chuvoso (p<0,05). Apesar de Bruggmann et al (2019) ter associado aumento do Cr em *Mytilus edulis* com o decréscimo da salinidade, não se descarta a possibilidade de aumento por fontes antrópicas, uma vez que no inverno ocorre maior lixiviação de efluentes diversos para os estuários (Zhao et al., 2019). Valor muito acima do SERC foi encontrado por Higino et al. (2016) em *M. Charruana* (15,3 mg kg⁻¹) na Lagoa do Mundaú, nordeste do Brasil, bem como em estuário de Alexandria (Salama et al., 2020)

Traços de manganês (Mn) são essenciais para organismos vivos, no entanto, níveis elevados podem ser tóxicos para mexilhões (Hernandez et al., 2011; Oweson e Hernroth., 2009). Silva (2010) encontrou concentração acima do presente estudo em *M. charruana* no SERC, bem como, Balgobin e Singh (2018) no Golfo de Pária e por Kumar et al. (2015) em região portuária no sudeste do Brasil, ambos em *M. guyanensis* (Tabela 8).

O mercúrio (Hg) é um metal não essencial aos moluscos e de elevada toxicidade, com possibilidade de bioacumulação e biomagnificação (Wolswijk et al, 2020). As concentrações em tecido não divergiram entre período sazonal, conforme observou Higino et al (2016) na Lagoa do Mundaú, bem como, não foram influenciadas por fatores abióticos, como pH e salinidade, observado em estudos desenvolvidos por Modassir (2000) e Streets et al. (2017). Já o níquel (Ni) presente em tecidos de *M. charruana* no SERC, foi encontrado em maiores concentrações no banco Palácio quando comparado aos outros bancos, durante o período seco (p < 0,05). Os registros no SERC estiveram abaixo de valores reportados para outros estuários (Tabela 8), bem como, de valores divulgados por programas de bimonitoramento nos EUA e Espanha

(Amiard et al., 2008). O zinco (Zn) no banco Ponte apresentou concentração significativamente maior no verão ($p < 0,05$), local caracterizado por receber contribuições antrópicas de um maior número de afluentes que compõem o sistema. Valores mais elevados foram reportados por diversos autores para várias regiões do globo (Tabela 8), incluindo estuários da Região Nordeste do país, sugerindo menor contaminação para este elemento ao SERC.

4.3 Fator de Bioacumulação (rever se discussão ou método)

A bioacumulação, processo no qual substâncias químicas são assimiladas e retidas pelos organismos, foi expressa como fator de bioacumulação (FBA), conforme descrita em Zagatto e Bertoletti (2008). O FBA foi determinado pela razão entre as concentrações do metal presente no organismo (mg kg^{-1}) e a concentração do metal no sedimento (mg kg^{-1}), descrito em Ladrin et al. (1992). O fator de bioacumulação (FBA) calculado a partir da relação entre concentrações do sedimento e tecidos de *M. charruana* foi menor que 1, indicando que não ocorreu bioacumulação dos metais avaliados em *M. charruana* a partir da contaminação no sedimento.

4.4 Risco à saúde humana

Apesar da considerável contribuição que os efluentes industriais e urbanos exercem para a entrada de metais e outros contaminantes pelos afluentes ao SERC (ZANARDI-LAMARDO et al., 2016; YOGUI et al., 2018), baixas concentrações foram detectadas nos tecidos de *M. charruana*, em especial para os metais que possuem limites máximos permitidos (LMP) para consumo humano (As, Cd, Pb, Mn e Hg), por legislações nacionais e internacionais (OMS), não conferindo risco a saúde dos consumidores. As concentrações de metais estiveram abaixo do limite máximo permitido (LMP) respectivamente nos seguintes percentuais: 40% para As ($\text{LMP} \leq 1,0 \text{ mg/kg}$), 100% para Cd ($\leq 2,0 \text{ mg/kg}$), 98% para Pb ($\leq 1,5 \text{ mg/kg}$) e 90% para Hg ($\text{LMP} \leq 1,0 \text{ mg/kg}$).

4.5 Bifelinas policloradas (PCBs) em *Mytella charruana*

No presente estudo as concentrações individuais de PCBs em tecidos de *M. charruana* variaram de, menor que o limite de quantificação do método (LQ) a 26,15 ng g⁻¹, representando menos de 0,003% do valor mais elevado encontrado em mexilhões de áreas fortemente industrializadas no globo, conforme descrito por Pan et al. (2007) para Baía de Qingdao (Tabela 10).

Tabela 10. Variação da concentração de PCBs em amostras de mexilhões (ng g⁻¹ de peso seco) em diferentes partes do globo.

Autor	Espécie	Valor (ng/g)	Região
Presente estudo	<i>Mytella charruana</i>	<L.Q - 26,5	SERC, Brasil
Santos et al. (2020)	<i>Mytella guyanensis</i>	0,1 - 17	Baía de Todos os Santos, Brasil
Araujo, G F (2018)	<i>Mytella charruana</i>	0,0 – 1,40	SERC, Brasil
Campillo et al. (2017)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	0.1 – 5,8	Costa do Mediterrâneo, Espanha
Milun et al. (2016)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	5,69 – 195,65	Baía de Kaštela, Adriático Oriental
Commendatore et al. (2015)	<i>Mytilus edulis</i>	0,41 – 0,6	Patagônia, Argentina
Petrus et al. (2014)	<i>Perna perna</i>	48 - 61	Baía de Guanabara, Brasil
Petrus et al. (2014)	<i>Perna perna</i>	6,7 – 9,1	Baía de Sepetiba, Brasil
Reese et al. (2012)	<i>Mytilus trossulus</i>	7– 2.800	Arquipélago das Aleutas, Alasca
Vorkamp et al. (2010)	<i>Mytilidae sp</i>	338	Boston Harbor, EUA
Vorkamp et al. (2010)	<i>Mytilus edulis</i>	147 - 282	Estuário de Sydney, EUA
Pan et al. (2007)	<i>Mytilus edulis</i>	4622–7881	Baía de Qingdao, China
Andral et al. (2004)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	0,0 - 18	Costa do Mediterraneo, França
Kim et al. (2002)	Várias espécies	4,4 -422	Costa da Coréia
Taniguchi (2001)	<i>Perna perna</i>	47,7 -141,7	Arraial do Cabo, RJ, Brasil
Thompson et al. (1999)	<i>Mytilus edulis</i>	38 - 60	Baía de Arcachon, França

Sericano et al. (1995) encontraram para soma de congêneres de PCBs concentração média de 280 ng g⁻¹ p.s. em mexilhões *Mytella falcata* coletados entre 1991 e 1992 em Recife. Após duas décadas, o estudo atual encontrou média 85% inferior (38 ng g⁻¹ p.s) àquela reportada por Sericano et al. (1995) e 15% inferior a reportada por Araujo G.F. (2018) para *M. charruana* (46,05 ng.g⁻¹) no SERC. Os mexilhões podem refletir os níveis de contaminação local devido ao seu padrão de vida sésil (Pan et al., 2007), permitindo acumular diferentes contaminantes através dos mecanismos de filtração de partículas em suspensão e alimentos contaminados, além do contanto com o sedimento (Petrus et al., 2014).

Yogui et al (2018) registraram para amostras de sedimento coletadas no SERC em 2011, valor médio de 4,37 ng g⁻¹ ps e de 0,94 ng.g⁻¹ ps para o estuário de Suape, ambos em Pernambuco. As concentrações registradas no presente estudo em *M. charruana* acima da encontrada por Yogui et al (2018) no sedimento do SERC, demonstra a capacidade que os bivalves possuem para absorver e refletir a contaminação de PCBs no ambiente (Bodin et al., 2011). A ausência de diferenças significativas para os PCBs no SERC (especialmente e sazonalmente) sugere um passivo de contaminação ambiental antigo, diferente do que foi observado por Bodin et al. (2011) na costa do Senegal.

Percentual mais elevado para congêneres hexaclorados (36%) em tecidos de *M. charruana* do SERC também foi reportado para outros organismos aquáticos no Brasil (Santos et al., 2020; Miranda e Yogui., 2016; Araujo GF., 2018) e outros continentes (Kim et al., 2002; Vorkamp et al., 2010; Campillo et al., 2017). Em regiões tropicais, congêneres mais pesados tendem a prevalecer devido às características de baixa pressão de vapor e de uma maior presença nas misturas técnicas produzidas nos EUA e importados pelo Brasil, a exemplo do Aroclor 1254[®] (Lavandier et al., 2013). Esta mistura técnica atua como um potente indutor do sistema de enzimas microsossomais hepáticas que metabolizam substratos endógenos tais como esteróides, ácidos graxos e xenobióticos (Miranda Filho et al., 2008).

Dos 209 congêneres de PCBs, 130 foram utilizados em misturas técnicas e 7 deles (PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180) foram listados como mais abundantes em amostras ambientais pelo Conselho Internacional de Exploração do Mar (ICES). Estes congêneres foram utilizados como indicadores de contaminação à biota em diversos estudos (Webster et al., 2013; Masci et al., 2015). No SERC, os congêneres (ICES - 7) foram registrados na ordem 153 > 138/160 > 90/101 > 118 > 52/73 > 28, não sendo encontrado em tecidos de *M. charruana* o PCB 180. Na estação controle (BC) utilizada como background, foram encontrados apenas os PCBs 90/101 > 52/73 > 153 > 138/160, não sendo registrado os PCBs 28, 118 e 180 (Figura 5). A predominância dos PCBs 153 e 138 em amostras biológicas está diretamente relacionada ao fato destes congêneres serem também predominantes em misturas técnicas comerciais e serem altamente persistentes na biota (Andersen et al., 2001) e de difícil metabolização (Bruhn et al., 1995).

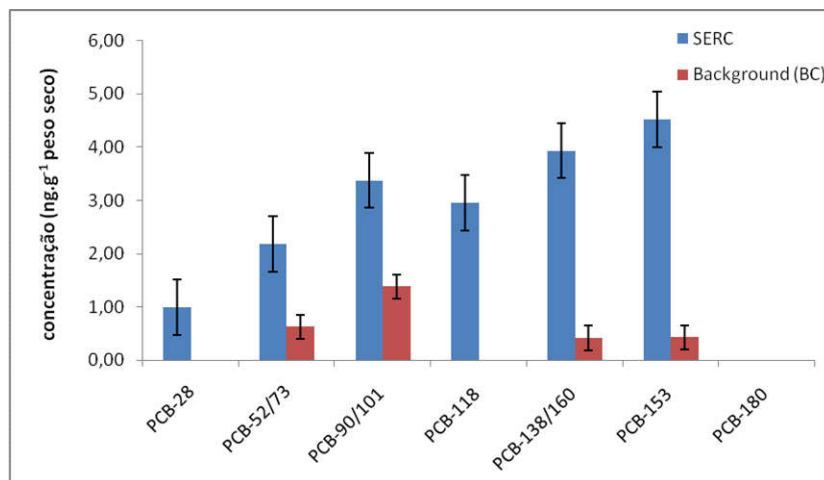


Figura 5. Concentrações (ng g^{-1} peso seco) dos sete congêneres do International Council for the Exploration of the Sea (ICES7) em tecidos de *Mytella charruana* no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe e estação controle em Barra de Camaragibe (BC).

A análise de POPs em moluscos permite monitorar a qualidade do ambiente marinho e ainda estimar o risco de segurança alimentar para a população local (Bodin et al., 2011). As vias de entrada desses contaminantes em humanos ocorrem através do trato gastrointestinal, pulmões ou epiderme (WHO, 1993). De acordo com Malisch e Kotz (2004), entre 90 e 98% da exposição à PCBs em humanos é proveniente da ingestão de alimentos. Os níveis máximos de PCBs em produtos pesqueiros com base em fatores de equivalência tóxica (TEF) foram propostos pela União Europeia (UE) e pela Organização Mundial da Saúde - OMS (CE, 2011; Van den Berg et al., 2006).

As concentrações dos 12 congêneres de PCB semelhantes a dioxinas (IUPAC n° 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 e 189), quando multiplicadas por seus respectivos TEFs e posteriormente somadas, resulta em uma única concentração expressa em termos de equivalentes tóxicos (TEQ) da 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TCDD). Nas amostras do SERC, apenas os congêneres 105 e 118 foram detectados acima do limite de quantificação. O TEQ-PCBs foi calculado e encontrou valor de $0,803 \text{ pg g}^{-1} \text{ pu}$, ou seja, 73% abaixo do limite de $3,0 \text{ pg g}^{-1} \text{ pu}$ estabelecido pelo regulamento da UE (CE, 2011). O TEQ-PCBs registrado no presente estudo esteve acima do reportado por Araujo GF (2018), que também avaliou *M. charruana* no SERC e reportou valor de $0,054 \text{ pg g}^{-1} \text{ pu}$. Milun et al. (2016) registraram $0,01\text{-}0,06 \text{ pg g}^{-1} \text{ pu}$ em *M. galloprovincialis* na Croácia e Abad et al. (2003) registraram $<\text{LQ}$ a $0,01 \text{ pg g}^{-1} \text{ pu}$ em mexilhões na Espanha.

A OMS (1998) estabeleceu o limite de $4 \text{ pg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para consumo de pescados contaminados com PCBs, sem representar risco potencial à saúde. O valor calculado para ingestão diária estimada (EID) no SERC, com base no peso corpóreo médio (65 kg) de adultos de 18 a 64 anos (homens e mulheres) e consumo médio de pescado pela população ($39,7 \text{ g dia}^{-1}$), foi de $0,49 \text{ pg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, não representando risco potencial para a saúde da população.

4.5.1 DDTs e clordanos

O valor médio encontrado para os pesticidas DDTs em *M. charruana* foi de $21,3 \text{ ng g}^{-1}$, enquanto os clordanos estiveram abaixo do LQ ($< 0,62 \text{ ng g}^{-1} \text{ ps}$). Araújo, G. F (2018) reportou concentração média de DDTs em *M. charruana* no SERC de $33,3 \text{ ng g}^{-1} \text{ ps}$, 33% acima do registrado neste estudo. Campilo et al. (2017) registraram, em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* da costa mediterrânea da Espanha, concentrações 83% abaixo do SERC para DDTs, variando de $0,63$ a $20,06 \text{ ng.g}^{-1}$ os e média de $3,54 \text{ ng.g}^{-1}$.

De acordo com Yogui et al. (2020), o DDT tende a sofrer conversão para seus metabólitos DDE e DDD no ambiente, o que foi verificado no presente estudo, com maior presença de p,p' DDE em *M. charruana*. Isso pode ocorrer através de fotólise ou metabolismo biológico (Kennish, 1997). Na via oxidativa, a molécula do DDT perde um átomo de cloro e outro de hidrogênio, transformando-se em DDE. Na via redutiva, um átomo de cloro é substituído por hidrogênio com consequente formação de DDD. A razão (p,p'-DDE/DDTs) tem sido empregada para determinar a temporalidade da introdução desse pesticida no ambiente (Batista Neto et al., 2008).

Proporções mais elevadas de p,p'-DDE no SERC (Figura 6), quando comparadas à mistura técnica comercial (D'amato et al., 2002), também foram observadas por Araújo GF (2018) em *M. charruana* no próprio SERC, Miranda e Yogui (2016) em *S. cavalla* no litoral de Pernambuco e Yogui et al. (2018) em sedimento do SERC. Os resultados sugerem que os organismos já assimilaram o produto da degradação do pesticida p,p'-DDT, tendo em vista que o ciclo de vida de *M. charruana* é de aproximadamente 1 ano (Rodrigues et al., 2013) e a meia-vida desse contaminante em matrizes abióticas pode ser acima de 10 anos (Sericano et al., 2014).

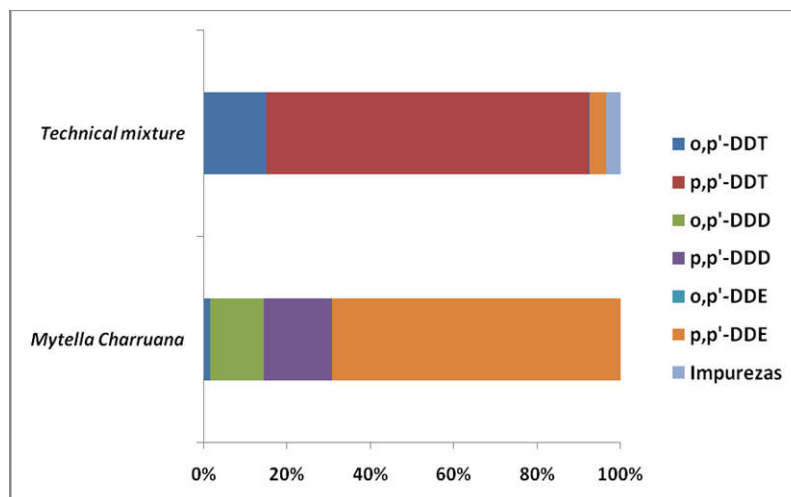


Figura 6. Proporção de DDT e seus metabólitos encontrados em tecidos do mexilhão (*Mytella charruana*) capturados no Sistema Estuarino do Rio Capibaribe (SERC), nordeste do Brasil, e na mistura técnica comercializada no Brasil (segundo D'Amato et al., 2002).

A predominância de p,p'DDE sobre o total de DDT normalmente indica entradas antigas de DDTs (Ricking e Schwarzbauer, 2012). Miranda e Yogui (2016) atribuíram a esta predominância de p,p' DDE em relação aos DDTs a proibição do uso deste composto no Brasil a partir de 1998, bem como, a implementação mundial da Convenção de Estocolmo que entrou em vigor em 2004. De acordo com Yogui (2002), a razão $\sum \text{DDTs} / \sum \text{PCBs}$ indica se a principal fonte de contaminação ambiental foi oriunda de atividades agrícolas/saúde pública (DDTs) ou industriais (PCBs). O valor de 0,55 para *M. charruana* no SERC indica maior contribuição industrial no estuário. Isso também foi observado por Araujo G.F (2018) para mesma espécie e estuário, registrando valor de 0,72.

4.5.2 Outros pesticidas

A cipermetrina (CP), único composto não clorado encontrado em *M. charruana* no SERC foi detectada em concentração de 0,25 ng g⁻¹ p.u. no banco Ponte (período seco), pertence ao grupo dos pesticidas piretroides e tem sido amplamente utilizada em aplicações agrícolas para controle de pragas domésticas (Palmquist et al., 2012). A fonte de contribuição mais provável para cipermetrina no SERC é o uso de inseticidas a base deste composto e que são carregados para o estuário por meio de efluentes domésticos não tratados, uma vez que no local encontrado, possuem residências nas margens.

Apesar da cipermetrina possuir meia-vida curta na coluna de água (< 2 dias), é adsorvida rapidamente ao material particulado em suspensão e pode ser incorporada pelos bivalves (Tang et al., 2018). Casos de bioacumulação de cipermetrina ocasionaram efeitos prejudiciais à saúde dos mexilhões e alterações no mecanismo de fechamento das conchas (Gowland et al., 2002). Hoai et al (2011) registraram concentração média de 370 ng g⁻¹ p.u de cipermetrina em seis espécies de peixes cultivados no norte do Vietnã e Rawn et al (2010) registraram valores de 0,3 a 6,5 ng g⁻¹ p.u em tecidos de salmão cultivado no Canadá, ambos demonstraram efeitos adversos aos organismos.

4.6 Atividade da AChE em *M. charruana*

A acetilcolinesterase (AChE) é uma serino hidrolase encontrada principalmente nas junções neuromusculares e nas sinapses cerebrais colinérgicas. Seu principal papel biológico é o término da transmissão do impulso nas sinapses colinérgicas por rápida hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em acetato e colina (Taylor e Radic., 1994). A atividade enzimática (AE) da AChE tem sido bem caracterizada em mexilhões utilizados em programas de biomonitoramento (Lioneto et al., 2012). Não foram registradas correlações de parâmetros abióticos (oxigênio dissolvido, salinidade, pH e temperatura) para AE da AChE no no SERC, fato também observado por Peric et al. (2011) em *M. galloprovincialis* na costa do Mar Adriático e Moschino e Da Ros (2016) em *M. galloprovincialis* no sul da Itália.

A atividade enzimática da AChE em *M. charruana* no SERC não apresentou diferenças significativas entre períodos sazonais ($p > 0,05$; teste de Tukey), no entanto, a média geral no verão (23,86 mU mg⁻¹) foi 43% inferior a do inverno (54,91 mU mg⁻¹). Se atribui a este fato concentrações significativamente maiores para os metais Al, As, Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Hg e Zn no verão. A diferença significativa da atividade enzimática da AChE apenas para o banco Croa, com maior redução no período de estio (20,12 mU mg⁻¹) em relação ao chuvoso (58,83 mU mg⁻¹), pode ser explicada pelo fato deste banco apresentar o maior número de metais (Hg, Cd, Cu e Zn) em concentrações acima do TEL e ERL que conferem efeitos adversos aos organismos.

Destaca-se ainda que no BP Croa os valores de Cu e Hg estiveram respectivamente 94,5 % e 88 % em concentrações que refletem efeito adverso aos organismos (Long et al., 1995; MacDonald et al., 1996), metais que foram reconhecidos

como inibidores da enzima AChE em organismos aquáticos (Assis et al, 2015; Lopes et al., 2019). Frasco et al. (2007) afirmaram que a atividade enzimática da AChE pode ser usada como um biomarcador para avaliar áreas poluídas por Hg, sugerindo que o tipo e a eficácia dessa inibição dependem fortemente da espécie estudada. Moschino e Da Ros (2016) verificaram que os metais As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn, presentes no sedimento de áreas contaminadas do Mar Piccolo (Itália), foram capazes de inibir a atividade da AChE de mexilhões *M. galloprovincialis*. Outrora, a concentração média de PCBs no banco Croa foi 27% maior no período seco ($43,42 \text{ ng.g}^{-1}$) em relação ao chuvoso ($31,49 \text{ ng.g}^{-1}$) e 14% acima da média dos demais bancos ($36,83 \text{ ng.g}^{-1}$) no estio.

5 Conclusões

Os teores críticos de oxigênio dissolvido demonstram que sazonalmente fatores de estresse ambiental no SERC ocasionam declínio na qualidade da água em período chuvoso, que junto à queda brusca da salinidade podem afetar o *M. charruana*, período que foi observada a mortalidade destes organismos durante a sua captura. A variabilidade sazonal influenciou nas concentrações de metais no sedimento, coferindo concentrações mais elevadas no período seco para nove de dez metais avaliados. A maior contaminação no sedimento do SERC foi para os metais Hg e Cu, com resultados acima dos limites TEL e ERL em 90% das amostras, sugerindo efeitos adversos mais críticos aos organismos no verão. Em tecidos de *M. charruana*, apenas o metal Cr sofreu influência da variabilidade sazonal, em concentrações mais elevadas no período chuvoso. Não houve bioacumulação de metais para os tecidos a partir da contaminação no sedimento. Os compostos organoclorados não sofreram influência da variação sazonal e as concentrações de PCBs e DDTs foram de origem antiga, sugerindo não haver novas fontes de contaminação no período. Os níveis de metais e compostos organoclorados no organismo *M. charruana* avaliado, não ocasionam risco potencial para seu consumo pela população local. No entanto, valores menores para atividade da enzimática da AChE de *M. charruana* no período seco, sugere que estes contaminantes podem ocasionar efeitos adversos aos organismos, demonstrando o potencial da espécie como organismo biomonitor do uso da AChE como biomarcador ambiental de contaminação em estuários eutrofizados como o SERC.

6 Referências

- Abreu, I. M., Cordeiro, R. C., Soares-Gomes, A., Abessa, D. M. S., Maranhão, L. A., & Santelli, R. E., 2016. Ecological risk evaluation of sediment metals in a tropical Eutrophic Bay, Guanabara Bay, Southeast Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 435–445.
- Abad, E., Pérez, F., Llerena, J. J., Caixach, J., & Rivera, J., 2003. Evidence for a Specific Pattern of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Bivalves. *Environmental Science & Technology*, 37(22), 5090–5096.
- Agência Estadual de Meio Ambiente, CPRH. Relatório de monitoramento da qualidade da água de bacias hidrográficas do estado de Pernambuco – 2018. Recife, CPRH, 2020, 141p. Disponível em cprh.gov.pe.br, acesso em 17/10/2020
- Andral, B., Stanisiere, J. Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., & Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin*, 49(9-10), 704–712. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.05.008
- AOAC. Official Methods of Analysis. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemist, 2016.
- Ali, A. M., Ronning, H. T., Sydnes, L. K., Alarif, W. M., Kallenborn, R., & Al-Lihaibi, S. S., 2018. Detection of PPCPs in marine organisms from contaminated coastal waters of the Saudi Red Sea. *Science of The Total Environment*, 621, 654–662.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., & Métayer, C. (1986). Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 90(3), 425–431.
- American Public Health Association. Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater. 23^a edition. Washington: APHA; 2017.
- Andrade, D. F., Rocha, M. S. (2016). A toxicidade do Arsenio e sua natureza. *Revista Acadêmica Oswaldo Cruz*. ISSN 2357-81873
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D., & Schenck, F.J. (2003) *J. AOAC Int.* 86, 412–431
- Andral, B., Stanisiere, J. Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., & Boissery, P. (2004). Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin*, 49(9-10), 704–712.
- Ayad et al., 2011. MA Ayad, MA Fdil, A. Mouaba. Effects of cypermethrin (pyrethroid insecticide) on the valve activity behavior, byssal thread formation, and survival in air of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* Arch. Environ. Contam. Toxicol., 60 (2011), pp. 462-470

Araujo e Pires, 1998. Simulação exploratória dos efeitos das marés na circulação e transporte hidrodinâmicos da bacia do pina. Revista Brasileira de Recursos Hídricos Volume 3 n.3 Jul/Set 1998, 57-71

Arruda, G.N., 2010. Avaliação das concentrações recentes e históricas de metais pesados nos sedimentos de fundo do estuário do rio formoso, pernambuco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 145 p.

Araújo, G. F. Modelagem de fontes de matéria orgânica para bivalves e sua contaminação por organoclorados no sistema estuarino do Rio Capibaribe, Pernambuco. Dissertação (Mestrado). Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2018. 94 p.

Arora, S., Balotra, S., Pandey, G., & Kumar, A. (2017). Binary combinations of organophosphorus and synthetic pyrethroids are more potent acetylcholinesterase inhibitors than organophosphorus and carbamate mixtures: An in vitro assessment. Toxicology Letters, 268, 8–16. doi:10.1016/j.toxlet.2016.12.009

Assis, C.R.D.; Linhares, A.G.; Oliveira, V.M.; França, R.C.P.; Marcushi, M.; Maciel Carvalho, E.V.M.; Bezerra, R.S.; Carvalho Junior, L.B., 2014. Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. Fish Physiology and Biochemistry, v.40, p.1659–1668. doi:10.1007/s10695-014-9956-1

Avelar, W. E. P., Mantelatto, F. L. M., Tomazelli, A. C., Silva, D. M. L., Shuhama, T., & Lopes, J. L. C., 2000. Water, Air, and Soil Pollution, 118(1/2), 65–72.

Azevedo, J.C.R; Salgado, L.D., 2019. Variação espacial e temporal da biodisponibilidade de metais na região estuarina do complexo estuarino-lagunar de iguape-cananéia, sudeste do Brasil. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, V 12, N 13.

ATSDR, (2008). Draft toxicological profile for cadmiun. Atlanta , Georgia: US Departamento f Health and Human Services.

Balgobin, A., & Ramroop Singh, N., 2018. Impact of anthropogenic activities on mussel (*Mytella guyanensis*) in the Gulf of Paria, Trinidad. Marine Pollution Bulletin, 135, 496–504.

Baptista-Neto, J. A. e Wallner-Kersanach, M. (Ed.). **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

Baruaem et al.,2013. Assessment of sediment toxicity from the Areia Branca off-shore harbor and the Potengi river estuary (RN), Northeastern Brazil. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 8 (4):312-326

Barletta, M., Lima, A. R. A., & Costa, M. F., 2019. Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. Science of The Total Environment, 651, 1199–1218. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.276

Barros et al. Bioavailability of heavy metals in mangrove soil in Alagoas, Brazil. Bioscience Journal, v. 35, n. 3, p. 818-825, 2019. DOI: 10.14393/BJ-v35n3a2019-41990

Bernal-Rey, D.L.; Cantera, C.G.; Afonso, M.S.; Menendez-Helman, R.J. Seasonal variations in the dose-response relationship of acetylcholinesterase activity in freshwater fish exposed to chlorpyrifos and glyphosate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.187, Artigo 109673, 2020. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109673

Batalha, F.; Pinto, A.S.S.B.; Maia, M. F. Bioacumulação de micronutrientes metálicos em moluscos bivalves em Coroa Grande, Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. <http://copec.eu/congresses/cbpas2003/proc/pdf/T154.pdf>

Benali, I., Boutiba, Z., Grandjean, D., de Alencastro, L. F., Rouane-Hacene, O., & Chèvre, N., 2017. Spatial distribution and biological effects of trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) and organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1-2), 539–550. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.12.028

Bonnard, M., Roméo, M., & Amiard-Triquet, C., 2009. Effects of Copper on the Burrowing Behavior of Estuarine and Coastal Invertebrates, the Polychaete *Nereis diversicolor* and the Bivalve *Scrobicularia plana*. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 15(1), 11–26.

Brayner, F. M. M.; Silva, H. K. P.; Barbosa, A. M. F. Speciation of heavy metals in estuarine sediments in the Northeast of Brazil. *Environ Sci 8 Pollut Res* 8 (2001). p. 1-6. August, 2001.

Brayner, F. M. M. et al. Behaviour of heavy metals in the estuarine area of the Capibaribe River in the Northeast of Brazil. *Journal de Physique IV. France* 107 (2003). p. 221-225.

Bruhn, R., Kannan, N., Petrick, G., Schulz-Bull, D.E., Duinker, J.C., 1995. CB pattern in the harbour porpoise: bioaccumulation, metabolism and evidence for cytochrome P450 IIB activity. *Chemosphere* 31, 3721–3732

Bruggmann, S., Kläbe, R. M., Paulukat, C., & Frei, R. (2019). Heterogeneity and incorporation of chromium isotopes in recent marine molluscs (*Mytilus*). *Geobiology*. doi:10.1111/gbi.12336

Calado, S.C.S., 2004. Níveis de concentrações de metais pesados em macro algas e em sedimentos marinhos de Pernambuco, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco.

Catarino, A. I., Cabral, H. N., Peeters, K., Pernet, P., Punjabi, U., & Dubois, P., 2008. Metal concentrations, sperm motility, and rna/dna ratio in two echinoderm species from a highly contaminated fjord (The Sorfjord, Norway). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7), 1553. doi:10.1897/07

Campillo, J.A., Fernández, B., García, V., Benedicto, J., León, V.M., 2017. Levels and temporal trends of organochlorine contaminants in mussels from Spanish Mediterranean waters. *Chemosphere* 182, 584–594

Campolim, M.B.; Henriques, M.B; Barbieri, E., 2018. Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn in mussels collected in Santos bay, São Paulo, Brazil: limits required by local legislation.

Carvalho, C.E.V.; Cavalcanti, M.P.O; Gomes, M.P; Faria,V. 2001. Distribuição de Metais Pesados em Mexilhões (Perna perna, L.) da Ilha de Santana, Macaé, SE, Brasil. *Ecotoxicology and Environmental Restoration* 4(1).

Censi, P., Spoto, S. E., Saiano, F., Sprovieri, M., Mazzola, S., Nardone, G., Ottonello, D., 2006. Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. *Chemosphere*, 64(7), 1167–1176.

Coimbra C.D, Carvalho G, Philippini H, Silva M.F.M., Neiva E. Determinação da concentração de metais traço em sedimentos do estuário do Rio Maracaípe – PE/Brasil. *Braz J Aquat Sci Technol*. 2015;19(2):58-75. [dx.doi.org/10.14210/bjast.v19n2.4863](https://doi.org/10.14210/bjast.v19n2.4863)

Commendatore M. G., Franco, M. A., Costa P. G. S., Castro I. B., Fillmann G., Bigatti G., Esteves J. L., & Nievas M.L., 2015. Butyltins, polyaromatic hydrocarbons, organochlorine pesticides, and Polychlorinated biphenyls in sediments and bivalve mollusks in a mid-latitude environment from the patagonian coastal zone. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 34, No. 12, pp. 2750–2763.

Covelli, S., Protopsalti, I., Acquavita, A., Sperle, M., Bonardi, M., & Emili, A., 2012. Spatial variation, speciation and sedimentary records of mercury in the Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil). *Continental Shelf Research*, 35, 29–42.

Commendatore, M.G., Franco, M.A., Costa, P.G., Castro, I.B., Fillmann, G., Bigatti, G., Esteves, J.L., Nievas, M.L., 2015. BTS, PAHS, OCPS and PCBS in sediments and bivalve mollusks in a midlatitude environment from the Patagonian coastal zone. *Environ. Toxicol. Chem.* <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3134>.

CPRM, 2005. Projeto Piloto Mapa Geoquímica Internacional. Internacional, Projeto piloto mapa geoquímico. <http://cprm.gov.br/>. Acessado em 04 de novembro de 2020.

Clark, R.B. 2001. *Marine Pollution*, 5th ed., Oxford University Press, New York, 237p.

D'AMATO, C., *et al.* DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. *Química Nova*, v.25, p.995-1002. 2002.

Dellali, M., Gnassia Barelli, M., Romeo, M., & Aissa, P., 2001. The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(2), 227–235. [doi:10.1016/s1532](https://doi.org/10.1016/s1532)

De Souza, M. M., Windmöller, C. C., & Hatje, V. (2011). Shellfish from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil: Treat or threat? *Marine Pollution Bulletin*, 62(10), 2254–2263.

DMA Milistore SRL, Application Book., 2011. DMA 80 PC/T640/1640. Revision 10.

Essien, J. P., Antai, S. P., & Olajire, A. A., 2009. Distribution, Seasonal Variations and Ecotoxicological Significance of Heavy Metals in Sediments of Cross River Estuary Mangrove Swamp. *Water, Air, and Soil Pollution*, 197(1-4), 91105. [doi:10.1007/s11270-008-9793](https://doi.org/10.1007/s11270-008-9793)

EFSA, 2009. Cadmiun in Food. Scientific Opinion of the Panel on Contamnants in the Food Chain. The EFSA Journal, 980:1-39

EPA. Environmental Protection Agency, 1993. Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories. Vol. I. Fish Sampling and Analysis. EPA 823-R-93-002, U.S. Washington, D.C.

FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma.

Fan H, Chen S, Li Z, Liu P, Xu C, Yang X, 2020. Assessment of heavy metals in water, sediment and shellfish organisms in typical areas of the Yangtze River estuary, China. Marine Pollutution Bulletin 151:110864. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110864

Feitosa, F. A. N., 1998. Produção primária do fitoplâncton correlacionada com parâmetros bióticos e abióticos na Bacia do Pina (Recife- Pernambuco-Brasil). Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica), Departamento de Oceanografia Universidade Federal de Pernambuco, 270 p.

Filimonova, V., Gonçalves, F., Marques, J. C., De Troch, M., & Gonçalves, A. M. M. (2016). Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: A review. Ecological Indicators, 67, 657–672.

Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. Biomarkers, 10(5), 360–375. doi:10.1080/13547500500264660

Fragoso, C. P., Bernini, E., Araújo, B. F., Almeida, M. G. Rezende, C. E., 2018. Mercury in litterfall and sediment using elemental and isotopic composition of carbon and nitrogen in the mangrove of Southeastern Brazil. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 202, 30–39.

Gao, X., & Li, P., 2012. Concentration and fractionation of trace metals in surface sediments of intertidal Bohai Bay, China. Marine Pollution Bulletin, 64(8), 1529–1536.

Galal-Gorchev, H. (1991) Global overview of dietary lead exposure. Chem. Speciation Bioavailab., 3, 5–11

Gowland, B., Webster, L., Fryer, R., Davies, I., Moffat, C., & Stagg, R. (2002). Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis® in the marine mussel, *Mytilus edulis*. Environmental Pollution, 120(3), 805–811. doi:10.1016/s0269

Hamed, M.A., Emara, A.M., 2006. Marine molluscs as biomonitors for heavy metal levels in the Gulf of Suez, Red Sea. J. Mar. Syst. 60, 220–234.

Hammer, O.,D., A.T. Harper & P.D. Ryan (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4:9

Hernández, R. B., Farina, M., Espósito, B. P., Souza-Pinto, N. C., Barbosa, F., & Suñol, C., 2011. Mechanisms of Manganese-Induced Neurotoxicity in Primary Neuronal

Cultures: The Role of Manganese Speciation and Cell Type. *Toxicological Sciences*, 124(2), 414–423.

Hoai, P. M., Sebesvari, Z., Minh, T. B., Viet, P. H., & Renaud, F. G., 2011. Pesticide pollution in agricultural areas of Northern Vietnam: Case study in Hoang Liet and Minh Dai communes. *Environmental Pollution*, 159(12), 3344–3350.

Higino, P.A.S.; Jesus, T.B; Carvalho, C.E.V; Tonial, L.S.S; Calado, T.C.S., 2012. Variação Sazonal de Mercúrio Total em Sururus (*Mytella charruana*, Orbigny, 1842) de uma Laguna Tropical, NE, Brasil. *Rev. Virtual Quimímica*, Vol 4, No. 4, 393-404.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008–2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Brasília, Brasil. Accessed January, 2019. <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45419.pdf>

Juan, F.S; M. R., Cortelezzi, A., Alborno, C. B., Landro, S. M., Arrighetti, F., Najle, R., & Lavarias, S. M. L. (2020). Ecotoxicology and environmental safety toxicity of pyrethroid cypermethrin on the freshwater snail *Chilina parchappii*: Lethal and sublethal effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 196, 110565. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110565

Kato, L. S., Ferrari, R. G., Leite, J. V. M., & Conte-Junior, C. A., 2020. Arsenic in shellfish: A systematic review of its dynamics and potential health risks. *Marine Pollution Bulletin*, 161, 111693. doi:10.1016/j.marpolbul.2020.111693

Kehrig, H. A., Costa, M., Moreira, I., & Malm, O., 2006. Total and methyl mercury in different species of molluscs from two estuaries in Rio de Janeiro State. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(7), 1409–1418. doi:10.1590/s0103-50532006000700031

Kennish, M.J. 1997. *Practical Hand Book of Estuarine and Marine Pollution*. CRC Press. 524p

Khazri, A., Sellami, B., Dellali, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., ... Mahmoudi, E., 2016. Diastereomeric and enantiomeric selective accumulation of cypermethrin in the freshwater mussel *Unio gibbus* and its effects on biochemical parameters. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129, 83–88. doi:10.1016/j.pestbp.2015.11.001

Kim, S.-K., Oh, J. R., Shim, W. J., Lee, D. H., Yim, U. H., Hong, S. H., Lee, D. S., 2002. Geographical distribution and accumulation features of organochlorine residues in bivalves from coastal areas of South Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1-12), 268–279. doi:10.1016/s0025

K. Das, M. Ray, S. Ray., 2012. Cypermethrin induced dynamics of hemocyte density of Indian mollusc *Lamellidens marginalis* *Ani Biol J*, 3 (1), pp. 1-11

Kumar, V., Sinha, A. K., Rodrigues, P. P., Mubiana, V. K., Blust, R., & De Boeck, G. (2015). Linking environmental heavy metal concentrations and salinity gradients with metal accumulation and their effects: A case study in 3 mussel species of Vitória estuary and Espírito Santo bay, Southeast Brazil. *Science of The Total Environment*, 523, 1–15.

Krishnakumar, P. K., Qurban, M. A., & Sasikumar, G., 2018. Biomonitoring of Trace Metals in the Coastal Waters Using Bivalve Molluscs. *Trace Elements - Human Health and Environment*. doi:10.5772/intechopen.76938

Lacerda LD, Carvalho CEV, Rezende CE, Pfeiffer WC, 1993. Mercury in sediments of the Paraíba do Sul River estuary and continental shelf, SE Brazil. *Mar Poll Bull* 26:220-222

Lacerda, L.D; Marins, R.V.; Vaisman, A.G.; Aguiar, J.E. & Dias, F.J.S., 2004. Contaminação por metais pesados nas bacias inferiores dos Rios Curimataú e Açu (RN) e Rio Jaguaribe (CE). Sociedade Internacional para Ecossistemas de Manguezal do Brasil (ISME/BR), Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC), Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC). Fortaleza, 63 p.

Landrum, P. F., Lydy, M. J., & Lee, H. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(12), 1709–1725. doi:10.1002/etc.5620111205

Langston WJ, Spence SK, 1995. Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. In: Tessier A, Turner DR, editors. *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Chichester, UK: John Wiley; p. 407–78

L.R. Vieira, C. Gravato, A.M.V.M. Soares, F. Morgado, L. Guilhermino., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behavior *Chemosphere*, 76, pp. 1416-1427

Lopes, D. F. C., Assis, C. R. D. de, Sant'Anna, M. C. S. de, Silva, J. F. da, Bezerra, R. de S., & Frédou, F. L., 2019. Brain acetylcholinesterase of three perciformes: From the characterization to the in vitro effect of metal ions and pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 494–503. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.02.047

Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., & Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives. *BioMed Research International*, 2013, 1–8.

Liu, C.-W., Liang, C.-P., Huang, F. M., & Hsueh, Y.-M. (2006). Assessing the human health risks from exposure of inorganic arsenic through oyster (*Crassostrea gigas*) consumption in Taiwan. *Science of The Total Environment*, 361(1-3), 57–66.

Lopes, D.F.C.; Assis, C.R.D.; Santanna, M.C.S.; Silva, J.F.; Bezerra, R.S.; Frédou, F.L. Brain acetylcholinesterase of three perciformes: From the characterization to the in vitro effect of metal ions and pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.173, p.494–503, 2019. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.02.047

Long, E. R., Macdonald, D. D., Smith, S. L. & Calder, F. D. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management*, 19, 81-97.

Mao, A., Mahaut, M.-L., Pineau, S., Barillier, D., & Caplat, C. (2011). Assessment of sacrificial anode impact by aluminum accumulation in mussel *Mytilus edulis*: A large-scale laboratory test. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2707–2713.

Madhura Mukadam, Arvind Kulkarni., 2014. Acute toxicity of Cypermethrin, a synthetic pyrethroid to estuarine clam *Katelysia opima* (Gmelin) and its effect on oxygen consumption. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, V. 3, N. 4. doi: 10.4236/jacen.2014.34016

Macedo, S. J.; Phillippini DA Silva, H. K.; Brayner, F. M. M.; Duarte, M. M. M. B.; Barbosa, A. M.F. Heavy metal concentrations in sediments of the Capibaribe river estuary in the Metropolitan Region of Recife, Pernambuco-Brazil. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, v. 102, p. 3, 2007.

MacFarlane, G. R., Burchett, M. D., 2000. Cellular distribution of Cu, Pb and Zn in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.). *Vierh. Aquat. Bot.* 68, 45–59.

Macdonald, D. D., Carr, R. S., Calder, F. D., Long, E. R. & Ingersoll, C. G. 1996. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology*, 5, 253-278

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Instrução Normativa SDA N° 11. 07 de maio de 2014. Brasília. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacionalde-controle-deresiduos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2014.pdf>.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015. Instrução Normativa SDA N° 5. 23 de abril de 2019. Brasília. Disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/InstruoNormativaN05.2019PNCRC2019.pdf>

Marini, M. E., Soto-Jiménez, M. F., & Páez-Osuna, F, 2008. Trace metals accumulation patterns in a mangrove lagoon ecosystem, Mazatlán Harbor, southeast Gulf of California. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 43(9), 995–1005.

Medina, M., Barata, C., Telfer, T., & Baird, D. J., 2004. Effects of cypermethrin on marine plankton communities: a simulated field study using mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(2), 236–245. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.07.001

Moschino, V., & Da Ros, L., 2015. Biochemical and lysosomal biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(13), 12770–12776. doi:10.1007/s11356-015-4929-1

Montone, R. C.; Bicego, M. C. Contaminação por esgoto. In: Neto, J. A. B.; Wallner-Kersanach, M.; Patchineelam, S.M. *Poluição marinha*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

Moura, V. L., & de Lacerda, L. D. (2018). Contrasting Mercury Bioavailability in the Marine and Fluvial Dominated Areas of the Jaguaribe River Basin, Ceará, Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101(1), 49–54.

- Miranda, D. A., & Yogui, G. T. (2016). Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in king mackerel caught off the coast of Pernambuco, northeastern Brazil: Occurrence, contaminant profile, biological parameters and human intake. *Science of The Total Environment*, 569-570, 1510. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.241
- Mitra, A. (2019). Mangroves: A Sink of Heavy Metals. *Mangrove Forests in India*, 115–156. doi:10.1007/978-3-030-20595-9_5
- Milun, V., Grgas, D., & Dragičević, T. L., 2016. Assessment of PCB and chlorinated pesticide accumulation in mussels at Kaštela Bay (Eastern Adriatic). *Science of The Total Environment*, 562, 115–127.
- Noronha, J.M.N; Silva, H.K.P; Duarte, M.M.M., 2013. Avaliação das concentrações de metais pesados em sedimentos do estuário do rio Timbó, Pernambuco, Brasil. *Arq. Ciên. Mar, Fortaleza*, 2011, 44(2): 70 - 82
- Oliveira, A.P.F. (2019). Determinação de metais na água, sedimento e em moluscos bivalves do complexo estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Otchere, F. A., Joiris, C. R., & Holsbeek, L., 2003. Mercury in the bivalves *Anadara (Senilia) senilis*, *Perna perna* and *Crassostrea tulipa* from Ghana. *Science of The Total Environment*, 304(1-3), 369–375.
- Oweson, C., & Hernroth, B., 2009. A comparative study on the influence of manganese on the bactericidal response of marine invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(3), 500–507.
- Pan, J., Yang, Y.-L., Xu, Q., Chen, D.-Z., & Xi, D.-L. (2007). PCBs, PCNs and PBDEs in sediments and mussels from Qingdao coastal sea in the frame of current circulations and influence of sewage sludge. *Chemosphere*, 66(10), 1971–1982.
- Palmquist et al., 2012. K. Palmquist, J. Salatas, A. Fairbrother Pyrethroid insecticides: use, environmental fate, and ecotoxicology F. Perveen (Ed.), *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*, InTech, Rijeka, Croatia (2012), pp. 251-278
- Pereira, O. M. et al., 2002. Determinação dos teores de Hg, Pb, Cd, Cu e Zn em Moluscos (*Crassostrea brasiliana*, *Perna perna* e *Mytella falcata*). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61(1):19-25.
- Petrus, G., Henkelmann, B., Longo, R., Dorneles, P. R., Torres, J. P. M., Malm, O., & Schramm, K.-W., 2014. Partition of organochlorine concentrations among suspended solids, sediments and brown mussel *Perna perna*, in tropical bays. *Chemosphere*, 114, 9–15.
- Perić, Lorena; Petrović, Siniša, 2011. *Acetylcholinesterase activity in the gills of mussel (mytilus galloprovincialis) from the north-eastern Adriatic coast*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20 (11). pp. 2855-2860. ISSN 1018-4619
- Plano hidroambiental da bacia hidrográfica do rio Capibaribe: Tomo III - Planos de Investimentos. Projetos Técnicos. Recife, 2010. 286p. Disponível em sirh.srh.pe.gov.br, acesso em 17/10/2020

Ramos, S.V.C., 2011. Avaliação da concentração de metais traço em ostra de mangue (*Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828), SURURU (*Mytella charruana* D'Orbigny, 1846) E SEDIMENTOS SUPERFICIAIS NO ESTUÁRIO DO RIO FORMOSO, PERNAMBUCO. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 182 p.

Rasch LW, Jensen UF, Woin P and Christoffersen K., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide cypermethrin on fresh water community studied under field conditions. II. Direct and indirect effects on the species composition. *Aquatic Toxicology* 63: 373-389

Rawn, D.F.K., Judge, J., Roscoe, V., 2010. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues, *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 397, pp. 2525-2531.

Régis, C. G., Souza-Santos, L. P., Yogui, G. T., Moraes, A. S., & Schettini, C. A. F., 2018. Use of *Tisbe biminiensis* nauplii in ecotoxicological tests and geochemical analyses to assess the sediment quality of a tropical urban estuary in northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 137, 45.

Reese, S.L., Estes, J.A., Jarman, W.M., 2012. Organochlorine contaminants in coastal marine ecosystems of southern Alaska: inferences from spatial patterns in blue mussels (*Mytilus trossulus*). *Chemosphere* 88, 873–880

Robinson, C. D., Webster, L., Martínez-Gómez, C., Burgeot, T., Gubbins, M. J., Thain, J. E., Hylland, K., 2017. Assessment of contaminant concentrations in sediments, fish and mussels sampled from the North Atlantic and European regional seas within the ICON project. *Marine Environmental Research*, 124, 21–31.

Rojas, M., Cavalcante, P.R.S., Souza, R.C. and Dourado, E.C.S., 2007. Teores de Zinco e Cobre em ostra (*Crassostrea rhizophorae*) e sururu (*Mytella falcata*) do estuário do rio Bacanga em São Luís (MA). *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, vol. 20, pp. 1-8

Rodríguez-Espinosa, P. F., Shruti, V. C., Jonathan, M. P., & Martinez-Tavera, E., 2018. Metal concentrations and their potential ecological risks in fluvial sediments of Atoyac River basin, Central Mexico: Volcanic and anthropogenic influences. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 1020–1033.

Ricking, M. e Schwarzbauer, J. DDT isomers and metabolites in the environment: na overview. *Environmental Chemistry Letters*, v.10, n.4, p.317-323. 2012

Sabadini-Santos, E., Knoppers, B. A., Padua Oliveira, E., Leipe, T., & Santelli, R. E., 2009. Regional geochemical baselines for sedimentary metals of the tropical São Francisco estuary, NE-Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 58(4), 601–606.

Salama et al. 2020. Health status of date mussel “*lithophaga lithophaga*, family: mytilidae” in alexandria, egypt: potential effects of the heavy metal pollution. Article 3, Volume 73, Issue 73, Winter and Spring 2020, Page 26-38

Santos, L. L., Miranda, D., Hatje, V., Albergaria-Barbosa, A. C. R., & Leonel, J., 2020. PCBs occurrence in marine bivalves and fish from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 154, 111070. doi:10.1016/j.marpolbul.2020.111070

Senez-Mello, T. M., Crapez, M. A. C., Ramos e Silva, C. A., Silva, E. T., & Fonseca, E. M. (2020). Heavy metals bioconcentration in *Crassostrea rhizophorae*: A site-to-site transplant experiment at the Potengi estuary, Rio Grande do Norte, Brazil. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-019-57152-w

Sericano, J. L. Quantitative determination of chlorinated hydrocarbons by gas chromatography/electron capture detection. Geochemical and Environmental Research Group. Standard Operating (SOP-9810), Texas. 21p. 1998.

Silva, H.K.P; Macedo, S.J.; Brayner, F.M.M., 2010. Avaliação das concentrações de metais traço nos sedimentos do Parque dos Manguezais, Região Metropolitana do Recife (RMR), Pernambuco, Brasil. *Tropical Oceanography*, Recife, v. 38, n. 2, p. 175-181

Silva, H.K.P., 2010. Avaliação das concentrações de metais traço e suas interações nos sedimentos e biota do Parque dos Manguezais, Região Metropolitana do Recife (RMR), Pernambuco, Brasil. 132p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Souza, P.R., S Souza, K.S., Assis, C.R.D., Araújo, M.C., Silva, K.C.C., Silva, J.F.X., Ferreira, A.C.M., Silva, V.L., Adam, M.L., Carvalho JR., L.B., Bezerra, R.S., 2018. Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. *Aquat. Toxicol*, 197, 109–121.

Solé, M., Shaw, J. P., Frickers, P. E., Readman, J. W., & Hutchinson, T. H., 2009. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2), 649–656. doi:10.1007/s00216-009-3182-1

S. J. Macedo, H. K. Philippini da Silva, F. M. M. Brayner, M. M. M. B. Duarte & A. M. F. Barbosa. Heavy metal concentrations in sediments of the Capibaribe River Estuary in the Metropolitan Region of Recife, Pernambuco-Brazil. *Sustainable Development and Planning III*, v. 2, p. 357-365, 2007.

Sparling, D. W., & Lowe, T. P. (1996). Environmental Hazards of Aluminum to Plants, Invertebrates, Fish, and Wildlife. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1–127. doi:10.1007/978-1

Sundaramanickam, A., Shanmugam, N., Cholan, S., Kumaresan, S., Madeswaran, P., & Balasubramanian, T., 2016. Spatial variability of heavy metals in estuarine, mangrove and coastal ecosystems along Parangipettai, Southeast coast of India. *Environmental Pollution*, 218, 186–195.

Taylor, P.; Radic, Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 1994, 34, 281-320.

Taniguchi S. (2001). Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e organoclorados em diferentes compartimentos do ambiente marinho do estado do Rio de Janeiro. Tese. Universidade de São Paulo.

Torres, M. A., Pires Testa, C., Gáspari, C., Beatriz Masutti, M., Maria Neves Panitz, C., Curi-Pedrosa, R. Wilhelm Filho, D. (2002). Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 923–932.

Thompson, S., Budzinski, H., Garrigues, P., & Narbonne, J. F. (1999). Comparison of PCB and DDT Distribution between Water-column and Sediment-dwelling Bivalves in Arcachon Bay, France. *Marine Pollution Bulletin*, 38(8), 655–662.

Tripathi, P. K., & Singh, A., 2004. Toxic effects of cypermethrin and alphamethrin on reproduction and oxidative metabolism of the freshwater snail, *Lymnaea acuminata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(2), 227-235. doi:10.1016/j.ecoenv.2003

UNEP, 2008. Interim Review of Scientific Information on Cadmium. Geneva: United Nations Environment Program.

Upadhyay, S., & Gupta, R. S. (1995). The behaviour of aluminium in waters of the Mandovi estuary, west coast of India. *Marine Chemistry*, 51(3), 261–276.

U.S. EPA. 2007. "Method 7473 (SW-846): Mercury in Solids and Solutions by Thermal Decomposition, Amalgamation, and Atomic Absorption Spectrophotometry," Revision 0. Washington, DC.

US EPA, (1996). SW-846 reference methodology: Method 6010B. Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry

Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., et al., 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 93, 223–241

Vorkamp, K., Strand, J., Christensen, J.H., Svendsen, T.C., Lassen, P., Hansen, A.B., Andersen, O., 2010. Polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in a one-off global survey of bivalves. *J. Environ. Monit.* 12, 1141–1152

Wade, T. L., Sericano, J., Gardinali, P. R., Wolff, G., & Chambers, L., 1998. NOAA's "Mussel Watch" project: Current use organic compounds in bivalves. *Marine Pollution Bulletin*, 37(1-2), 20–26.

Wang, X., Bao, Z., Lin, C.-J., Yuan, W., & Feng, X. (2016). Assessment of Global Mercury Deposition through Litterfall. *Environmental Science & Technology*, 50(16), 8548–8557. DOI: 10.1021/acs.est.5b06351

W. Tang, D. Wang, J. Wang, Z. Wu, L. Li, M. Huang, S. Xu, D. Yan, 2018. Pyrethroid pesticide residues in the global environment: an overview *Chemos*, 191, pp. 990-1007

WHO, 2001. Arsenic and Arsenic Compounds (Environmental Health Criteria 224), 2nd ed. Geneva: World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

WHO, 1993. World Health Organization. Polychlorinated biphenyls and terphenyls. Environmental Health Criteria: 140. Geneva: World Health Organization. 682p.

WHO. Dioxins and their effects on human health. 2010

WHO, 1989. Cypermethrin. World Health Organisation, Geneva.

WHO – World Health Organization, 1998. Assessment of the health risk of dioxins: reevaluation of the tolerable daily intake (TDI).

W.J. Langston, M.J. Bebianno, editors., 1998. Metal metabolism in aquatic environments, xx, 448p. London: Chapman and Hall. (Ecotoxicology Series 7). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 78(03).

Yogui, G. T., Tanigushi, S., Silva, J., Miranda, D. A., Montone, R. C., 2018. The legacy of man-made organic compounds in surface sediments of Pina Sound and Suape Estuary, northeastern Brazil. Brazilian Journal of Oceanography, v. 66, p. 58-72.

Yogui, G.T.; Leonel, J.; Combi, T. 2020. Poluentes orgânicos persistentes. In: Cavalcante, R.M. (Ed.). Contaminantes Orgânicos em Ambientes Aquáticos. Edições UFC, Fortaleza.

Zanardi-Lamardo, E. et al., 2016 Fontes e níveis de contaminação do sistema estuarino do rio Capibaribe (Pernambuco/Brasil). Tropical Oceanography, v. 44, n. 2, p. 118-131.

Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. (Ed.). Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. 2. ed. São Paulo: Rima, 2008. 472 p.

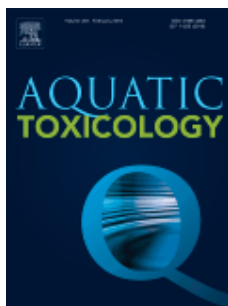
Zhao, M., Wang, E., Xia, P., Feng, A., Chi, Y., Sun, Y., 2019. Distribution and pollution assessment of heavy metals in the intertidal zone environments of typical sea areas in China. Mar. Pollut. Bull. 138, 397–406.

Zhou, J., Kang, H.-M., Lee, Y. H., Jeong, C.-B., Park, J. C., & Lee, J.-S., 2018. Adverse effects of a synthetic pyrethroid insecticide cypermethrin on life parameters and antioxidant responses in the marine copepods *Paracyclopina nana* and *Tigriopus japonicus*. Chemosphere. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.10.217

4.2 CAPÍTULO II

Acetylcholinesterase from the charru mussel *Mytella charruana*: kinetic characterization, physicochemical properties and potential as *in vitro* biomarker in environmental monitoring of mollusk extraction areas

Este artigo será submetido à
revista



Qualis: A1

ISSN: 0166-445x

Fator de Impacto: 4,344

Corresponding author:

Ranilson de Souza Bezerra

Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica e Biofísica,
Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

E-mail address: Email: ransoube@uol.com.br

Acetylcholinesterase from the charru mussel *Mytella charruana*: kinetic characterization, physicochemical properties and potential as *in vitro* biomarker in environmental monitoring of mollusk extraction areas

Glauber Pereira Carvalho dos Santos¹; Caio Rodrigo Dias de Assis^{2,3}; Gilvan Takeshi Yogui³; Ranilson Souza Bezerra²;

¹ Instituto de Tecnologia de Pernambuco, Recife, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

³ Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Abstract

Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) from aquatic organisms have been used to evaluate the exposure of specimens to pesticides and heavy metals at sublethal levels in environmental samples. AChE of *Mytella charruana* was extracted to characterize its physicochemical and kinetic properties as well as the effect of organophosphate (dichlorvos, diazinon, chlorpyrifos, methyl-parathion and temephos), carbamates (carbaryl, carbofuran and aldicarb), benzoylureas (diflubenzuron and novaluron), pyrethroid (cypermethrin) and juvenile hormone analogue - JHA (pyriproxyfen) and the effect of heavy metals: mercury (Hg^{2+}), cadmium (Cd^{2+}), lead (Pb^{2+}), arsenic (As^{3+}), copper (Cu^{2+}) and zinc (Zn^{2+}), in order to evaluate the potential of the enzyme as biomarker. The optimum pH of *M. charruana* AChE was 8.5 and the maximum activity peak occurred at 48 °C, being highly thermostable maintaining 97.8% of its activity after incubation at 60 °C. The Michaelis-Menten constants (k_m) for the substrates ASCh and PSCh were 2.8 ± 1.26 and 4.94 ± 6.9 mmol.L⁻¹, respectively. The $V_{\max}$ values for the same substrates were 22.6 ± 0.90 and 10.2 ± 4.94 mU.mg⁻¹, respectively. Specific inhibition results suggest a ChE with active site with intermediate dimensions between those of AChE and BChE. The IC₂₀ values related to the effect of the pesticides on the enzyme showed higher inhibitory power of temephos (0.17 µmol.L⁻¹), followed by aldicarb (0.19 µmol.L⁻¹) and diflubenzuron (0.23 µmol.L⁻¹). The metals inhibited *M. charruana* enzyme in the following order: $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. The enzyme showed potential as *in vitro* biomarker of the exposure to temephos, mercury, zinc and copper.

Keywords: acetylcholinesterase; biomarker; environmental monitoring; *Mytella charruana*.

1 Introduction

Cholinesterases (ChEs, EC 3.1.1.x) are hydrolytic enzymes from the group of serine esterases with high affinity for choline esters. There are two accepted types of ChEs: acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) which differs mainly in characteristics such as size of active center (wider in BChE), rate of acetylcholine hydrolysis (higher in AChE), susceptibility to inhibitors, activity in excess of substrate (inhibition of AChE and activation of BChE) (CHATTONET and LOCKRIDGE, 1989; ÇOKUGRAS, 2003; ASSIS et al., 2018). AChE is found more commonly in nervous tissues (brain, neuromuscular junctions) and erythrocyte membrane and BChE is present in liver, intestine, heart, kidney, lung and plasma (ÇOKUGRAS, 2003; SILMAN and SUSSMAN, 2005; ASSIS et al., 2018). The main functions of AChE are the deactivation of the neurotransmitter acetylcholine at cholinergic synapses preventing post-synaptic overstimulation and participation in the development of neuronal tissues whereas BChE is pointed as a detoxificant enzyme and a ghrelin hydrolase (BRIMIJOIN and KOENIGSBERGER et al., 1999; ÇOKUGRAS, 2003; BRIMIJOIN et al., 2005; BRIMIJOIN et al., 2016; ASSIS et al., 2018). There is a third ChE-like activity called propionylcholinesterase (PChE, which is not completely accepted as a new enzyme) which hydrolyzes efficiently propionylcholine, a substrate of intermediate size between acetylcholine and butyrylcholine and which is found more commonly in invertebrates such as *Drosophila* and some mollusks (GRIGORIEVA, 1973; GNAGEY et al., 1987; TALESA et al., 1990).

These enzyme activities are inhibited by compounds such as organophosphorus (OPs) and carbamate (CBs) pesticides as well as heavy metals. ChEs have been prospected as biomarkers of the exposure to these compounds in several studies due to their sensitivity and specificity mainly in aquatic organisms (BOCQUENÉ et al., 1990; RODRÍGUEZ-FUENTES and GOLD-BOUCHOT, 2000; FULTON and KEY, 2001; VARO et al., 2003; VARO et al., 2007; SILVA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2016; LOPES et al., 2019). The adverse effects of a toxic agent on aquatic organisms, including mollusks, can cause inhibition of such enzyme activities and other associated functions, changes in the behavior and reproduction of species, making it essential to know the concentration and bioavailability of these agents in ecosystems (LOMBARDI and FERNANDES, 2008; SOUZA et al., 2018).

Among the groups of animals used in biological monitoring, mollusks stand as one of the most abundant groups of invertebrates in estuarine ecosystems and which can be useful indicators of the health of these environments, in addition to be widely used in environmental monitoring programs due to their filter feeding habit that expose them continuously to a large quantity of water (YUAN et al, 2010; SOUZA et al., 2018; SAAD et al, 2019). Small species of bivalve mollusks can filter from few milliliters to more than 5 L/h/g tissue dry weight scavenging wide volumes of water by their communities and constituting suitable bioindicator organisms for *in vivo* and *in vitro* studies (FANSLOW et al., 1995; SYLVESTER et al., 2005; MUSIG et al., 2012; SOUZA et al., 2018; MESECK et al., 2020). The model organism in this study, the charru mussel *M. charruana* which is a bivalve mollusk species native of South American eastern coast from Venezuela to Argentina and western coast from Mexico to Ecuador. It is an invasive species in the southeastern coast of the United States (NARCHI and GALVÃO-BUENO, 1983; GALIMANY et al., 2017; WoRMS, 2020).

In this context, biomarkers from mollusks are important tools for assessing the estuarine and freshwater contamination by chemical pollutants. Among these biomarkers, the activity of the enzymes ChEs stands as suitable information about the status of the aquatic environments. Despite a certain level of conservation between species, ChEs present great variability even intraspecifically being extensively studied for this polymorphism which influences their responses to several compounds used in agriculture, medicine, public health campaigns and chemical weapons (WHO, 1986a, 1986b; ATSDR, 2005; FORGET et al., 2002; RILEY, 2003; KELLAR, 2006; LIONETTO et al., 2013). Therefore, the present study aimed to characterize the physicochemical and kinetic properties of the AChE from the mussel *M. charruana*, and characterize the *in vitro* effect of pesticides and heavy metals.

2 Material and methods

2.1 Materials

Acetylthiocholine iodide, S-butyrylthiocholine iodide, propionylthiocholine iodide, tetraisopropyl pyrophosphoramidate (Iso-OMPA), 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide (BW284c51), neostigmine bromide, eserine, bovine serum albumin, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB),

tris (hydroxymethyl) aminomethane, dimethyl sulfoxide (DMSO) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Analytical grade dichlorvos (98.8%), diazinon (99.0%), chlorpyrifos (99.5%), temephos (97.5%), methyl-parathion (99.7%), aldicarb (99.8%), carbofuran (99.9%), carbaryl (99.8%), novaluron (98.0%), diflubenzuron (99.7%), cypermethrin (98.9%) and pyriproxyfen (98.9%) were obtained from Riedel-de-Haën, Pestanal[®] (Seelze, Germany). HCl was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Glycine was acquired from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). Tissue homogenizer IKA RW-20 (IKA Works GmbH, Staufen, Germany). The microplate reader used was xMark[™] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The centrifuge was Legend XTR (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The Software for statistical analyzes was MicroCal[®] Origin[®] Version 8.0 (MicroCal, Northampton, MA, USA).

2.2 Sampling collection and capture method

The specimens of the mussel *M. charruana* were collected in the estuarine area of the Camaragibe river in Barra de Camaragibe, Alagoas, Brazil (9°18'57.64" S/ 35°25'8.21" W) where there are no records of discharge of industrial effluents. The place of collection of is shown in Figure 1.



Figure 1. Sampling sites of *Mytella charruana* in the Barra de Camaragibe estuarine area.

The mussel *M. charruana* was sampled in triplicate (three banks in the estuary. Approximately 300 specimens per bank). These specimens were extracted from the muddy (10 cm average depth) and rocky sediments of the estuary. Then, they were stored in plastic bags and kept on ice to reduce the metabolic rate. The criteria for choosing these fishing areas were based on the places with the greatest amount of specimens: the three main banks exploited by local fishermen in the estuarine area, whose production is destined for human consumption.

At the laboratory, the specimens were cleaned in running water and added ($n = 100$) in artisanal depuration units (with ocean water) for 24 hours, aiming at the elimination of their stomach contents (WEBSTER et al, 2013; ARAÚJO, 2018) and afterwards, sacrificed under freezing (-20°C) to remove the tissues from the shells and store in plastic tubes for cholinesterase extraction.

2.3 Acetylcholinesterase (AChE) activity in *M. charruana*

The activity of AChE was determined by the colorimetric method proposed by Ellman et al. (1961) and modified by Assis et al. (2012). *M. charruana* samples were processed in a tissue homogenizer in 0.5 mol.L^{-1} Tris-HCl buffer pH 8.0 to a concentration of 20 mg buffer per mL of tissue. Then, they were centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 minutes, collecting the supernatant (crude extract) and storing at -25°C for the assays. Then, using 96-well microtiter plates 20 μL of the crude extract were added to the chromogenic reagent 0.25 mmol.L^{-1} DTNB (200 μL) and the reaction started with the addition of 20 μL of the substrate (62 mmol.L^{-1} acetylthiocholine iodide). The reaction product was read at 405 nm for 180 seconds in a microplate reader.

2.4 Kinetic parameters

The Michaelis-Menten constant (k_m) and the maximum hydrolysis rate ($V_{\max}$) were estimated by assaying the enzymatic activity as described above with increasing concentrations of the substrates acetylthiocholine (ASCh), propionylthiocholine (PSCh) and S-butyrylthiocholine (BSCh) iodide from $10 - 250\text{ mmol.L}^{-1}$ ($0.8 - 20.8\text{ mmol.L}^{-1}$ final concentration). The kinetic curves were adjusted to the Michaelis-Menten hyperbolic model ($p < 0.05$). The parameters $V_{\max}$ ratio (Relative Efficiency of Hydrolysis – REH) and k_m ratio were also determined to corroborate the results of

specific substrates, considering k_m ratios ≥ 1 and V_{max} ratios < 1 as AChE whereas k_m ratios < 1 and V_{max} ratios ≥ 1 are considered as BChE and PChE characteristics (Pezzeменти et al., 1991; Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot, 2004; Assis et al., 2014).

2.5 physicochemical parameters

The optimal pH and the optimal temperature of the *M. charruana* AChE were measured by assaying the enzymatic activity in buffers with different pH ranging from 4.0 to 9.0 and temperatures from 5 °C to 70 °C. Thermal stability was determined by subjecting the enzyme to the same temperatures for 30 min and, after 15 min at 25 °C (equilibration to room temperature), the remaining activity was determined.

2.6 Selective inhibition assays

The selective inhibitors BW284c51 (AChE inhibitor), Iso-OMPA (BChE inhibitor), neostigmine bromide and eserine (total cholinesterase inhibitors) were incubated (10 μ L) with *M. charruana* extract (10 μ L) for 60 min, according to the method described by Assis et al. (2012). Inhibitor concentrations ranged from 0.001 to 10 mmol.L⁻¹ (serial dilution - 10x). After the incubation time, 200 μ L of 0.25 mmol.L⁻¹ DTNB was added to the mixture and following the addition of 20 μ L of 62 mmol.L⁻¹ acetylthiocholine substrate, the reaction started. The absorbance was followed at 405 nm for 180 seconds and the residual activity was determined considering the absence of the inhibitor as 100% activity. The data were adjusted to the nonlinear regression models with the best determination coefficient: exponential decay, sigmoidal (Boltzmann) and polynomial ($p < 0.05$) for calculations of the inhibition parameters.

2.7 Effect of pesticides

The extracts were incubated for 60 min at 25 °C with organophosphates (dichlorvos, diazinon, chlorpyrifos, methyl-paration and temephos), carbamates (carbaryl, carbofuran and aldicarb), benzoylureas (diflubenzuron and novaluron), pyrethroids (cypermethrin) and juvenile hormone analog - JHA (pyriproxifen), according to the method described by Assis et al. (2012). The insecticides were

dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted in distilled water to increasing concentrations from 0.001 to 10 mmol.L⁻¹ (0.00025 to 2.5 mmol.L⁻¹ for novaluron) through serial dilution (10x). The incubation was performed according to Assis et al (2012) and the residual activity was determined considering the absence of pesticides as 100% of activity. The data were fitted to nonlinear regression models (according to section 2.6) with the best determination coefficient ($p < 0.05$), to calculate the inhibition parameters.

2.8 Effect of metal ions

The effects of the metal ions As³⁺ (NaAsO₂), Cd²⁺ (CdCl₂), Cu²⁺ (CuCl₂), Pb²⁺ (PbCl₂), Hg²⁺ (HgCl₂) and Zn²⁺ (ZnCl₂) were determined according to Bocquené et al., (1990) and Assis et al., (2015) similarly to tests with selective inhibitors and pesticides (concentrations ranging from 0.001 to 10 mmol.L⁻¹ in 10x serial dilution, for each ion) with the exception that the incubation time of the *M. charruana* AChE extract (10 µL) with the ions (10 µL) was 40 min (Bocquené et al., 1990; Assis et al., 2015). Data obtained were adjusted to the best nonlinear regression models ($p < 0.05$) to calculate the inhibition parameters.

2.9 Estimation of the inhibition parameters IC₂₀, IC₅₀ and ki

The concentrations that inhibit the enzyme activity by 20 and 50% (IC₂₀, IC₅₀) were estimated for each inhibitor (specific inhibitors, pesticides and ions) according to Assis et al. (2012) using the nonlinear regression models obtained in the previous sections in the graphs of $\ln$ (natural log of inhibitor concentration) vs. enzymatic activity (%) for each inhibitor. The parameter k_i (dissociation constant of the) was determined according to the equation (CHENG and PRUSOFF, 1973):

$$k_i = \frac{IC_{50}}{1 + \left(\frac{[S]}{k_m}\right)}$$

Where IC₅₀ = concentration capable of inhibiting 50% of enzyme activity; [S] = represents substrate concentration; k_m = Michaelis-Menten constant.

3 Results and discussion

The kinetic parameters, maximum hydrolysis rate ($V_{\max}$) and the Michaelis-Menten constant (K_m) were analyzed using the substrates ASCh, PSCh and BSCh in increasing concentrations from 10 to 250 mmol.L⁻¹ (0.8 - 20.8 mmol.L⁻¹ final concentration). The $V_{\max}$ of ASCh and PSCh found for the enzymes of *M. charruana* were 22.6 ± 0.90 and 10.2 ± 4.94 mU.mg⁻¹ (nmol.min⁻¹.mg of protein⁻¹) and K_m of 0.23 ± 0.10 and 0.41 ± 0.57 , respectively (Figure 2a and 2b). Values of these parameters for several mollusk species are shown (Table 1). No activity was detected with the substrate BSCh. Hereafter, the results with selective inhibitors will confirm whether the activity with PSCh would be ascribed or not to a propionylcholinesterase (PChE) since it may occur in mollusks (GRIGORIEVA, 1973; TALESA et al., 1990).

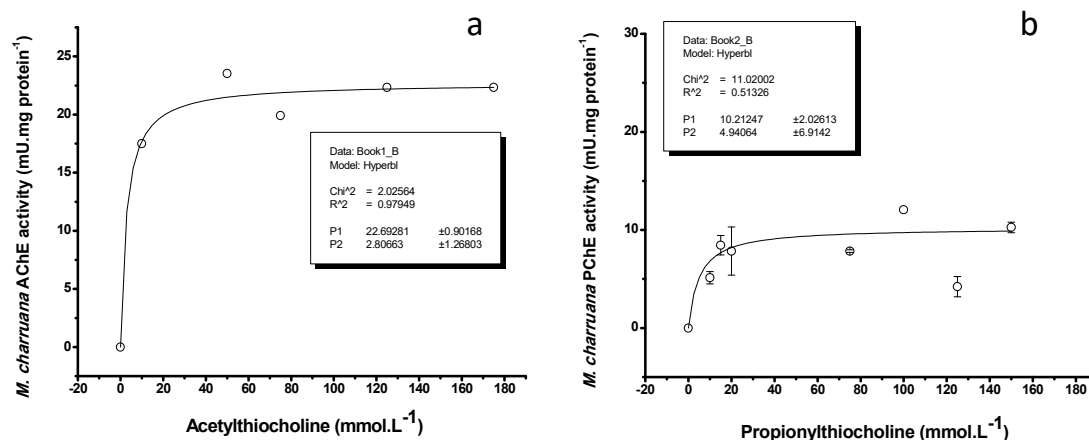


Figure 2. K_m and $V_{\max}$ values for ChEs of *M. charruana* using the substrates ASCh (a) and PSCh (b). Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

The optimal pH and temperature found for the *M. charruana* ChE were 8.5 and 48°C, respectively. The enzyme showed high thermostability, maintaining approximately 97.8% of activity after incubation at 60 °C for 30 min and after 15 min equilibration at room temperature (25 °C) (Figure 3a, 3b, 3c).

Table 1. Kinetic parameters (k_m and V_{max}), k_m ratios and V_{max} ratios of ChE specific substrates activities in different tissues of some mollusks species

Species (substrate)	k_m (mmol.L ⁻¹)	k_m ratio	V_{max} (mU/mg)	V_{max} ratio	Tissue	Reference
<i>Mytella charruana</i> (ASCh) A	0.23 ± 0.10	-	22.6 ± 0.90	-	whole body	Present study
<i>Mytella charruana</i> (PSCh) P	0.41 ± 0.57	1.78	10.2 ± 4.94	0.45	whole body	Present study
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (ASCh) A	0.43 ± 0.12	-	27.71 ± 1.15	-	viscera	Souza et al., 2018
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (BSCh) B	0.79 ± 0.31	1.83	5.90 ± 0.52	0.21	viscera	Souza et al., 2018
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (PSCh) P	0.30 ± 0.23	0.69	11.50 ± 1.15	0.41	viscera	Souza et al., 2018
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (ASCh) A	1.32 ± 0.20	-	53.57 ± 1.72	-	gills	Souza et al., 2018
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (BSCh) B	NA	-	NA	-	gills	Souza et al., 2018
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (PSCh) P	1.46 ± 1.20	1.11	10.12 ± 4.39	0.19	gills	Souza et al., 2018
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (ASCh) A	0.046 ± 0.003	-	1.92 ± 0.04	-	gills S9	Monserrat et al., 2002
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (ASCh) A	0.059 ± 0.008	-	5.84 ± 0.04	-	gills TX S9	Monserrat et al., 2002
<i>Crassostrea rhizophorae</i> (ASCh) A	3.08 ± 0.60	-	1,628 ± 1,071	-	adductor muscle	Domingos et al., 2007
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	0.078	-	23.18	-	gills*	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	0.018	-	4.92	-	gills**	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	-	-	18.78	-	hepatopancreas	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	-	-	6.71	-	hepatopancreas	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	-	-	4.05	-	mantle	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	-	-	20.25	-	mantle	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	-	-	2.16	-	labial palps	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	-	-	10.83	-	labial palps	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	-	-	4.60	-	striated adductor	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	-	-	2.30	-	striated adductor	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	-	-	3.50	-	smooth adductor	Bocquené et al., 1997
<i>Crassostrea gigas</i> (ASCh) A	-	-	2.69	-	smooth adductor	Bocquené et al., 1997
<i>Cerastoderma edule</i> (ASCh) A	5.57 ± 2.68	-	2,540 ± 480	-	pool***	Nilin, 2012
<i>Cerastoderma edule</i> (BSCh) B	6.64 ± 4.70	1.19	1,970 ± 400	0.77	pool***	Nilin, 2012
<i>Cerastoderma edule</i> (PSCh) P	0.94 ± 0.13	0.17	4,570 ± 150	1.80	pool***	Nilin, 2012
<i>Adamussium colbecki</i> (ASCh) A	-	-	2,290 ± 130	-	adductor muscle	Bonacci et al., 2006
<i>Adamussium colbecki</i> (BSCh) B	-	-	600.0 ± 50	0.26	adductor muscle	Bonacci et al., 2006
<i>Adamussium colbecki</i> (PSCh) P	-	-	1,570 ± 140	0.68	adductor muscle	Bonacci et al., 2006
<i>Ostrea edulis</i> (ASCh) A	0.09 ± 0.01	-	4.82 ± 0.29	-	gills	Valbonesi et al., 2003
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (ASCh) A	0.08 ± 0.01	-	18.36 ± 0.56	-	gills	Valbonesi et al., 2003
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (ASCh) A	0.03	-	≈ 2.7	-	whole body	Mora et al., 1999
<i>Corbicula fluminea</i> (ASCh) A	≈ 0.3	-	≈ 5.5	-	whole body	Mora et al., 1999
<i>Corbicula fluminea</i> (PSCh) P	0.07	2.33	≈ 6.0	1.10	whole body	Mora et al., 1999

ASCh – acetylthiocholine; BSCh – S-butyrylthiocholine; PSCh – propionylthiocholine; k_m ratio and V_{max} ratio = B/A or P/A; NA – no activity; S9 – fraction from sucrose gradient; TX S9 - fraction from sucrose gradient with triton X-100; *AChE-A; **AChE-B; ***pool of the tissues: muscle, foot, mantle, gills and digestive gland; ≈ approximated values observed in graphs axes.

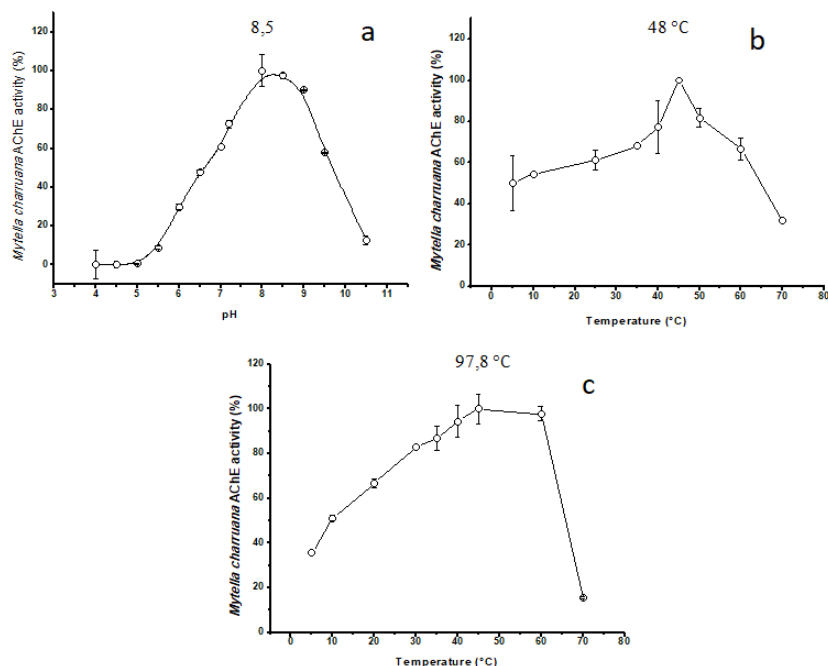


Figure 3. Optimum pH (a), optimum temperature (b) and thermal stability (c) of *M. charruana* ChE. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

The ChE activity of *M. charruana* was abruptly reduced in the presence of all selective inhibitors BW284c51, Iso-OMPA, neostigmine and eserine. However, as the enzyme was inhibited by both BW284c51 and Iso-OMPA (in addition to having activity in the presence of ASCh and PSCh substrates), it may be suggested that this enzyme has an active site with intermediate dimensions between those of AChE and BChE, also known as PChE or atypical AChE, as reported by Mora et al (1999) (Figure 4a-4d). However, according to the definitions of k_m ratio and V_{max} ratio, the PChE-like activity is probably related to AChE, since the k_m ratio was > 1 and V_{max} ratio was < 1 (Table 1) (PEZZEMENTI et al., 1991; RODRÍGUEZ-FUENTES and GOLD-BOUCHOT, 2004).

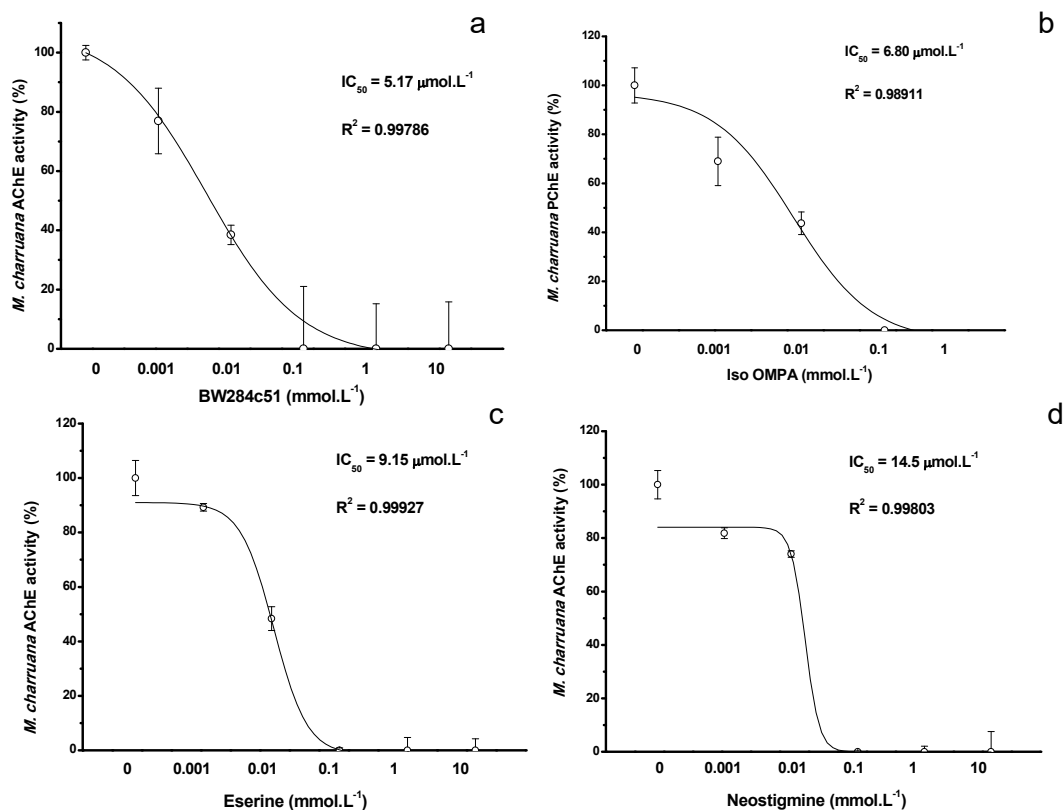


Figure 4. Effect of selective inhibitors on *M. charruana* ChE. (a) – BW284c51; (b) – Iso-OMPA; (c) – Eserine; (d) – Neostigmine. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

In addition, the median inhibitory concentration (IC_{50}) values related to specific inhibitors indicated greater inhibitory power by BW284c51, followed by Iso-OMPA, eserine and neostigmine showing that the dimensions of the active site are more closely related to the AChE active site. From now on, it will be assumed that the enzyme is AChE as well as for *Crassostrea rhizophorae* gill AChE obtained by Souza et al. (2018) (Table 2).

The following classes of pesticides were evaluated: carbamates - CBs (Figure 5a-5c), organophosphates - OPs (Figure 6a-6d), Benzoylureas and juvenile hormone analogs - JHA (Figure 7a-7c). The IC_{50} and k_i values for AChE of *M. charruana* exposed to pesticides showed inhibitory power in the following decreasing order: temephos > aldicarb > diflubenzuron > carbofuran > chlorpyrifos > pyriproxifen > methyl-paration > novaluron > carbaryl > cypermethrin > dichlorvos > diazinon.

Table 2. Comparison between the IC₅₀ values estimated for *M. charruana* and *C. rhizophorae* AChE in the presence of selective inhibitors.

Inhibitor	<i>C. rhizophorae</i> *	<i>M. charruana</i>
	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)	
BW284c51	61.2	5.17
Iso-OMPA	650	6.80
Neostigmine	450	14.5
Eserine	60	9.15

*Values from *C. rhizophorae* gills obtained by Souza et al. (2018).

Temephos was the strongest inhibitor of *M. charruana* AChE and according to WHO (1986a) it was commonly used in public health campaign, mainly against vectors (mosquitoes) of infectious diseases due to its strong inhibitory action on the activity of AChE from invertebrates, including mollusks and crustaceans. Recently, the use of temephos was interrupted in several countries due to the development of resistance by target organisms. However, strategies are being elaborated to recover its lethal potential (PORRETTA et al., 2008; MELO-SANTOS et al., 2010; LIMA et al., 2014). Following the order of inhibitory intensity per pesticide class, chlorpyrifos showed strong to moderate inhibitory effect against the enzyme possibly due to the biotransformation required by the OP subclass of organophosphothioates (thioesters; P=S) to achieve their full irreversible inhibitory potential, as well as diazinon and methyl-parathion which is considered an OP model to which it is possible to compare anticholinesterase loads in a given sample using equivalents of methyl-parathion (VALE, 1998; ASSIS et al., 2012; ARAÚJO et al., 2018). Dichlorvos belongs to the OP subclass of organophosphates (oxoesters; P=O) that does not need biotransformation and this would make it a more potent inhibitor. But due to the unusual dimensions of the active site of the AChE from *M. charruana* (close to those of a PChE), dichlorvos did not exert here the strong AChE inhibition as in other organisms (ASSIS et al., 2012).

In the present study, aldicarb was the second strongest inhibitor for the AChE from *M. charruana*. Carbamate pesticides are direct inhibitors of ChEs. They do not need any biotransformation to exert their inhibitory power (WHO, 1986b; THAM et al., 2009; ASSIS et al., 2012). Moreover, aldicarb is also highly toxic after formation of its sulfoxide and sulfone derivatives (RISHER et al., 1987; PERKINS and SCHLENK,

2000; ARAÚJO et al., 2018). According to Metcalf (1971), the carbamate carbofuran may exert high inhibitory effect associated with the high reactivity of its dimethyl benzofuranyl ring when interacting with residues in the active site of AChE and several enzymes from aquatic organisms were very sensitive to this pesticides (SOUZA et al., 2018; ARAÚJO et al., 2018; LOPES et al., 2019). The carbamate carbaryl was moderate to weakly inhibitory towards *M. charruana* AChE activity due to the lower reactivity of the naphthyl ring in comparison to carbofuran (METCALF, 1971; WHO, 1986b; LOPES et al., 2019).

The benzoylureas diflubenzuron and novaluron which are not considered anticholinesterasic compounds inhibited the *M. charruana* enzyme. Souza et al. (2018) reported inhibition of AChE from the mollusk *Crassostrea rhizophorae* by these benzoylureas and cited Cottage and Gunning (2004) about their interference on the active site of the enzyme: steric hindrance and dynamic inhibition by widening the gorge of the active site and disrupting its conformation.

Pyrethroids are not pointed as AChE inhibitors. They are synthetic compounds derived from pyrethrins first isolated from the flowers of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and their mode of action target receptor site-7 of the voltage-gated sodium channels and causing excitatory paralysis of insects followed by death (VAIS et al. 2001; DAVIES et al. 2007; SUPPIRAMANIAN et al., 2010). They exert influence on the sodium channels by modifying its gating kinetics to prolong the opening of the channels (BRADBERRY et al. 2005; DONG, 2007). Moreover, they shift the membrane potential, causing nerve cells hyperexcitability. Such impairments may lead to sublethal incapacitating effect known as ‘knockdown’ in insects (DAVIES et al. 2007). Kaviraj and Gupta (2014) reviewed in the literature that cypermethrin, a type II pyrethroid, may inhibit AChE from brain of fish but further studies are required for unequivocal evidence. In the present study, cypermethrin was moderate to weakly inhibitory to the AChE activity of *M. charruana* (Table 3).

Here, the juvenile hormone analog (JHA) pyriproxyfen was shown to inhibit AChE from *M. charruana*. The well-known mode of action of this pesticide is the disruption of insect growth by hindering the juvenile hormone signaling (DHADIALLA et al., 1998; HIRANO et al., 1998). However, AChEs from other species of aquatic organisms were also affected by this pesticide (ARAÚJO et al., 2018; AZEVEDO et al., 2021). According to molecular docking studies pyriproxyfen (both enantiomers)

blocked the catalytic gorge entrance of AChE from *Electrophorus electricus* (AZEVEDO et al., 2021).

In table 3 is shown a comparison between the IC₂₀, IC₅₀ and ki values related to the exposure of AChEs from *C. rhizophorae* and *M. charruana* to the pesticides under study. The *M. charruana* enzyme showed more sensitivity than that of *C. rhizophorae* in almost all cases (excepting carbaryl and diazinon). The inhibition of 20% of the AChE activity is considered the minimum inhibition threshold for the presence of anticholinesterasic compounds in a given sample (FAO, 2007). Most of the IC₂₀ values of *M. charruana* AChE activity are lower than the limit recommended in current regulation. Considering the maximum concentration of organophosphorus pesticides stipulated in Brazil by the National Council of Environment, Resolution no. 357/2005 (CONAMA, 2005) for Class 3 waters (irrigation and secondary contact, animal watering after mild treatment) (in methyl-parathion equivalents: 37 µg/L $\approx$ 1.66 µmol.L⁻¹), the *M. charruana* AChE showed potential as biomarker of the exposure to temephos and chlorpyrifos, since their respective IC₂₀ values (Table 3) were lower than the maximum concentration proposed, therefore being sensitive to low concentrations of these pesticides.

Such results suggest not only the suitability of the use of *M. charruana* AChEs as biomarkers of pesticides but evidenced deleterious effects exerted by such compounds on this organism with important degree of inhibition by their low concentrations. It is important that the results highlight that exposure to sublethal concentrations of these compounds may hinder neuronal function in this organism.

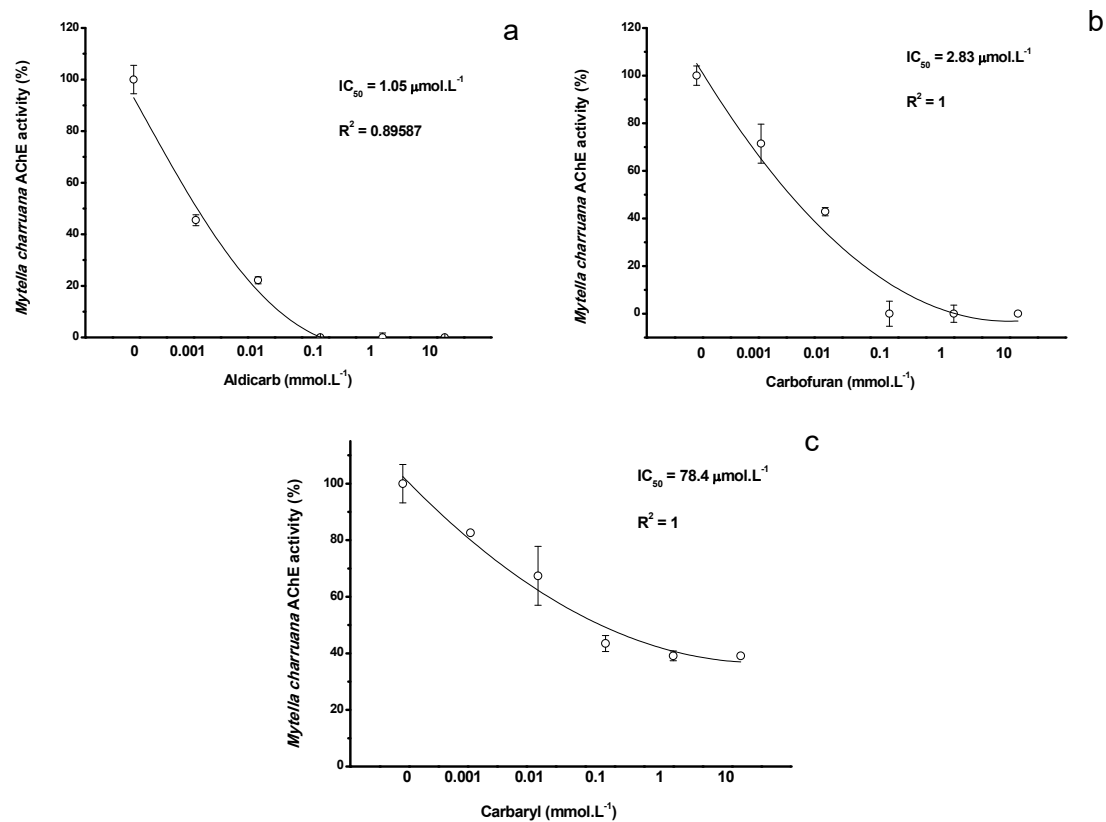


Figure 5. Effect of carbamate pesticides (a - aldicarb; b – carbofuran; c - carbaryl) on the AChE activity of *M. charruana*. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

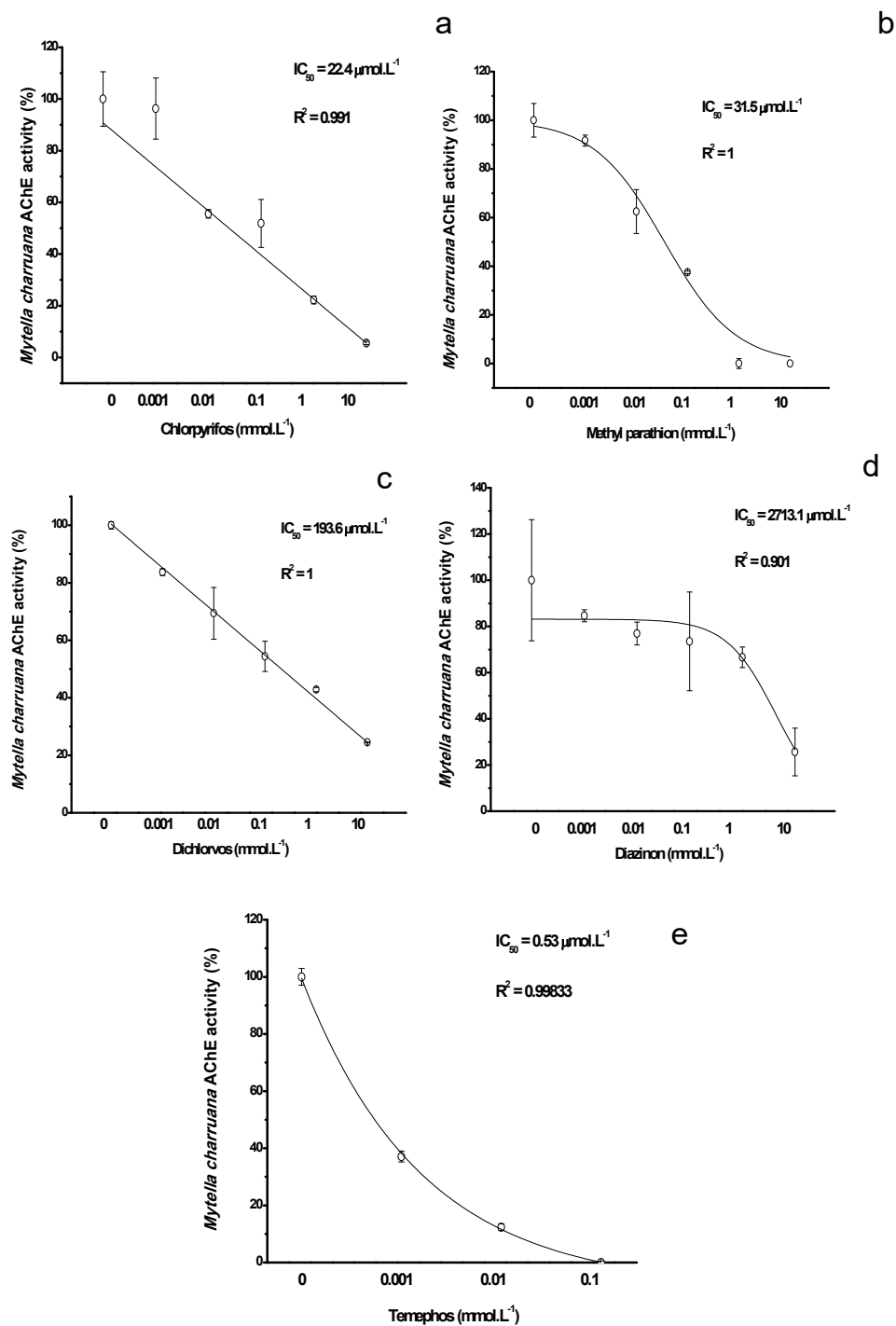


Figure 6. Effect of organophosphorus pesticides (a - chlorpyrifos; b – methyl-parathion; c – dichlorvos; d – diazinon; e - temephos) on the AChE activity of *M. charruana*. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

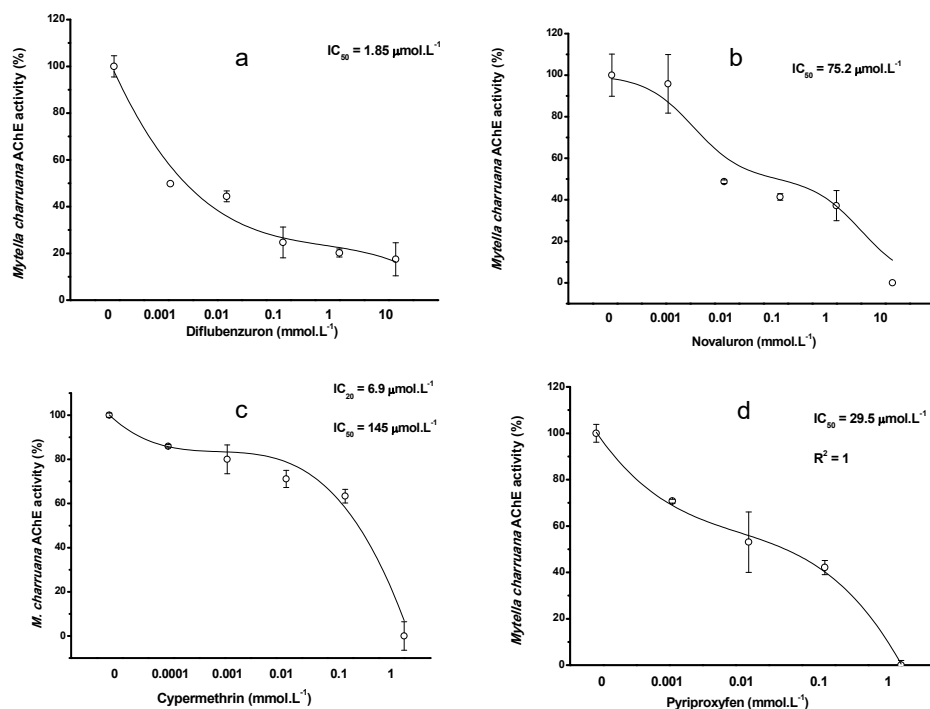


Figure 7. Effect of benzoylureas, pyrethroid and JHA pesticides (a - diflubenzuron; b – novaluron; c – cypermethrin; d - pyriproxyfen) on the AChE activity of *M. charruana*. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

Table 3. Comparison between estimates of IC_{50} of *M. charruana* and *C. rhizophorae* AChE in the presence of organophosphorus, carbamate, benzoylurea, pyrethroid and JHA pesticides.

Pesticide	<i>C. rhizophorae</i> *		<i>M. charruana</i>	
	IC_{20} (IC_{50}) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	ki ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC_{20} (IC_{50}) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	ki ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
aldicarb	1.50 (75)	1.56	0.19 (1.05)	3.88×10^{-3}
carbofuran	0.60 (170)	3.54	0.40 (2.83)	1.05×10^{-2}
carbaryl	0.10 (0.13)	2.71×10^{-3}	0.94 (78.4)	2.90×10^{-1}
dichlorvos	4.00 (430)	8.96	1.92 (193.6)	7.16×10^{-1}
diazinon	3.50 (62)	1.29	123.2 (2,713)	1.00
chlorpyrifos	23.0 (7,550)	157	0.44 (22.4)	8.28×10^{-2}
methyl-parathion	11.0 (1,600)	33.4	3.96 (31.5)	1.16×10^{-1}
temephos	1.50 (-)	-	0.17 (0.53)	1.96×10^{-3}
diflubenzuron	- (-)	-	0.23 (1.85)	6.84×10^{-3}
novaluron	8.00 (-)	-	1.80 (75.2)	2.78×10^{-1}
cypermethrin	- (-)	-	6.90 (145)	5.3×10^{-1}
pyriproxyfen	- (-)	-	0.34 (29.5)	1.09×10^{-1}

*Values from *C. rhizophorae* gills obtained by Souza et al. (2018).

Several studies reported the effect of ions on the activity of AChE of aquatic organisms. Ions have been reported to act on peripheral sites causing changes in the conformation and/or hydration state of the active site of AChE (OLSON and CHRISTENSEN, 1980; TOMLINSON et al., 1981; HUGHES and BENNETT, 1985; FRASCO et al., 2005, 2007; ASSIS et al., 2015). Thus, ions may influence the analysis of pesticides, when AChE is used as a biomarker or as sensor biocomponent. The effect of ions on AChE from all species and their concentrations should be taken into account in the analysis of OPs, CBs and other anticholinesterase agents (ASSIS et al., 2015).

The effect of heavy metals on the AChE activity of *M. charruana* was evaluated using the metal ions: mercury (Hg^{2+}), cadmium (Cd^{2+}), lead (Pb^{2+}), arsenic (As^{3+}), copper (Cu^{2+}) and zinc (Zn^{2+}). The IC_{50} values for AChE of *M. charruana* showed inhibitory power of metals in the following decreasing order: $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (Figure 8a-8f). Table 3 summarizes the inhibition parameters related to the exposure to the metal ions under study.

Here, 0.1 mmol.L^{-1} of Hg^{2+} inhibited almost 100% of AChE activity in *M. charruana*. Total enzyme inhibition by mercury at concentrations under 1 mmol.L^{-1} has been reported by other studies for the following species: *Cichla ocellaris*, *Colossoma macropomum*, *Rachycentron canadum*, *Oreochromis niloticus*, *Arapaima gigas*, *Electrophorus electricus* and *Parachromis managuensis* (SILVA et al., 2013; ASSIS et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016). These results corroborated the proposition of Tomlinson et al. (1981) that pointed Hg^{2+} as one of the strongest inhibitory ions against AChE. The Resolution no. 357/2005 of the Brazilian National Environment Council (CONAMA, 2005) states that a concentration of $1.8 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ ($\approx 0.009 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) of Hg^{2+} in Class 2 (human consumption after conventional treatment) freshwater/brackish waters can be harmful to aquatic biota. Moreover, the maximum concentration recommended by the Federal-Provincial-Territorial Committee on Health and the Environment of Canada (HEALTH CANADA, 2017) for mercury maximum concentration limit in drinking water is $1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ ($\approx 0.005 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) and the limit established by the National Primary Drinking Water Standards is $2 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ ($\approx 0.01 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) (USEPA, 2009). Therefore, according the IC_{20} value of Hg^{2+} in the present study ($\text{IC}_{20} = 0.68 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) the *M. charruana* AChE only would be indicated to become an *in vitro* biomarker in estuarine environments contaminated by this metal in case of concentrations exceeding the limits (by mining and industrial effluents).

Assis et al. (2015) and Araújo et al. (2016 and 2018) observed that As^{3+} strongly inhibited AChE activity in *C. macropomum*, *O. niloticus*, *R. canadum*, *E. electricus*, *Parachromis managuensis* and *Hoplosternum littorale*, but no effect on *A. gigas*. The IC_{20} value related to As^{3+} for *M. charruana* was $4.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, which is above the limits recommended by CONAMA Resolution no. 357/2005 for the concentration of this ion in Class 2 brackish waters ($69 \mu\text{g.L}^{-1} \approx 0.92 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Similar situation was observed for Cd^{2+} and Pb^{2+} since their inhibitory effect on *M. charruana* AChE was moderate to and not conclusive to propose this enzyme as biomarker of their exposure (Table 3).

The ions Cu^{2+} and Zn^{2+} showed weak AChE inhibition in the concentration range assessed in the present study. However, the IC_{20} of Zn^{2+} for *M. charruana* was lower than the maximum limit proposed by the USEPA National Secondary Drinking Water Standards ($5000 \mu\text{g.L}^{-1} \approx 76.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (USEPA, 2009) posing this enzyme as a potential biomarker in areas affected by Zn^{2+} -rich effluents. Moreover, the IC_{20} value related to Cu^{2+} was almost half that of the Zn^{2+} and the sensitivity of the enzyme activity was very suitable as biomarker according to the limit of concentration established by CONAMA 357/2005 for class 2 brackish waters ($122.75 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

The discrepancies in AChE behavior caused by exposure to these metals may also be associated with the metallothionein levels in this species. The metallothioneins are low molecular weight cytoplasm proteins (6–7 kDa) that complex metals due to the high content of cysteine residues in their structure ($\approx 30\%$) (KÄGI, 1993). These proteins store metal ions in non-toxic forms, regulate cell metabolism (mainly Cu^{2+} and Zn^{2+}) and adsorb metals in the intestine (OGA, 2008). The affinity of metallothioneins for metals occurs in the following sequence: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Metals with higher affinity can replace those with lower affinity in protein-binding sites (DAY et al., 1984; FUNK et al., 1987). The metallothioneins of *M. charruana* may be object of further studies analyzing their role in the resistance of this species to metal ions.

Table 4 – Inhibition parameters related to ions that exert significant inhibitory effect on some fish species.

Species	<i>M. charruana</i>		<i>P. managuensis</i>		<i>H. littorale</i>	
Metal ions	IC ₂₀ (IC ₅₀) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	ki ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	ki ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	ki ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Cd ²⁺	1.98 (158.0)	0.58	3,650.0	34.3	81.0	0.76
Cu ²⁺	29.0 (230.2)	0.85	770.0	7.25	61.0	0.58
Hg ²⁺	0.68 (2.76)	0.01	10.0	12.2	13.0	0.12
Zn ²⁺	61.1 (658.3)	2.43	12,960.0	122.0	4,575.0	4.3
Pb ²⁺	2.00 (18.7)	0.07	-	-	2,956.0	2.7
As ³⁺	4.00 (198.0)	0.73	-	-	88.0	0.83

The data of *P. managuensis* and *H. littorale* come from Araújo et al. (2016) and Araújo et al. (2018), respectively. (-) not observed in the concentration range.

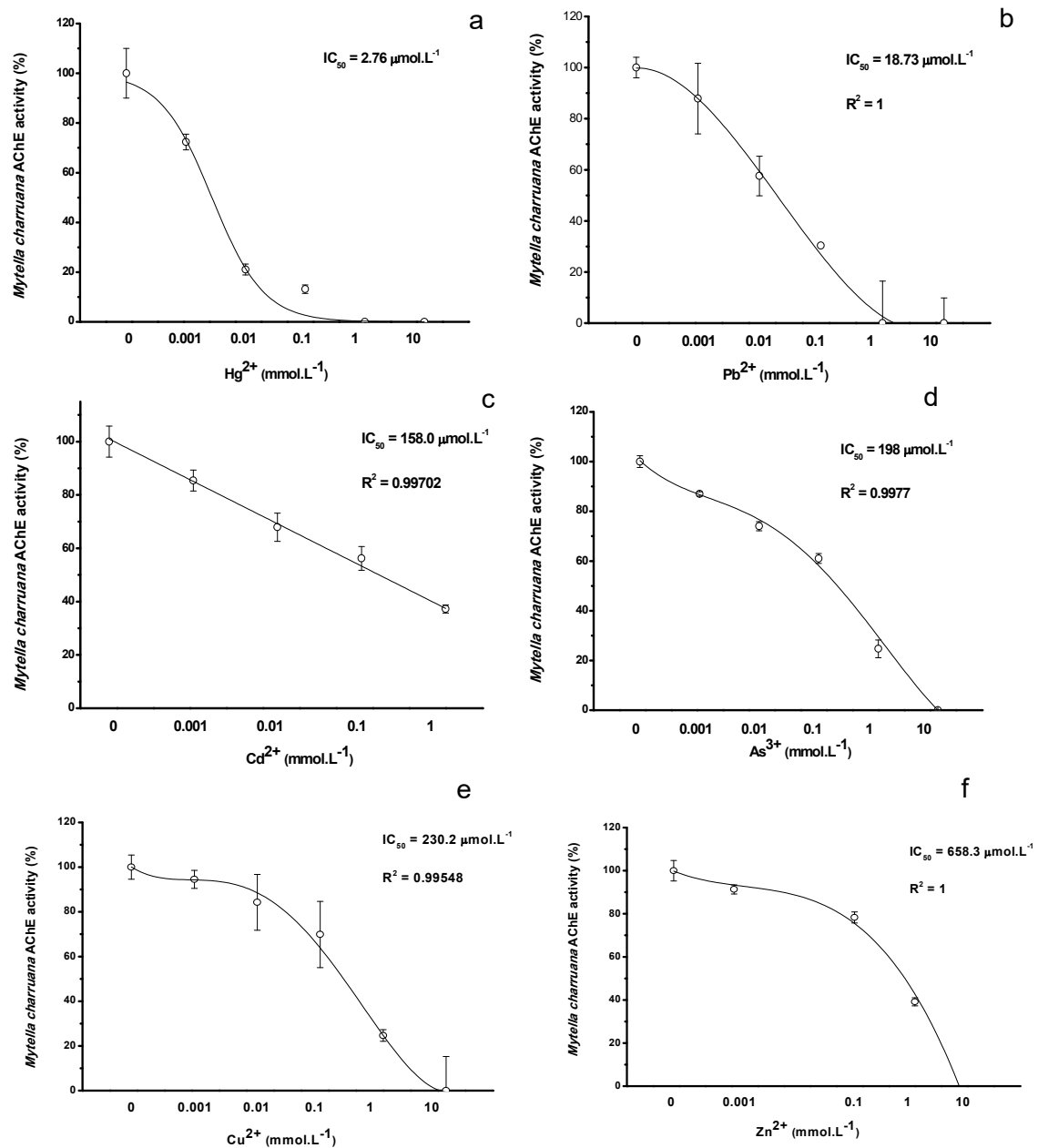


Figure 8. Effect of metals (a – Hg^{2+} ; b – Pb^{2+} ; c – Cd^{2+} ; d – As^{3+} ; e – Cu^{2+} ; f – Zn^{2+}) on the AChE activity of *M. charruana*. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

4 Conclusions

AChE was the predominant ChE in *M. charruana* and the physicochemical and kinetic properties of this enzyme as well as assay conditions were characterized. Temephos was the pesticide with the strongest inhibitory action, even at very low concentrations, followed by aldicarb and diflubenzuron. Therefore, the AChE of *M. charruana* presents potential to be used as *in vitro* biomarkers of exposure to temephos as well as mercury, zinc and copper in environmental samples of Class 2 brackish water.

Acknowledgments

The authors are grateful for financial support by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant no. PQ 2018-x], Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) [Grant no. CHAMADA PÚBLICA MCT/FINEP/AT – CARCINICULTURA 09/2010 Ref.: 1560/10] and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Grant no. PNP20130477 - 25001019034P2 - PNP2 - UFPE/Oceanografia and 88887.175810/2018-00]. Their gratitude also goes to the Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP) and to the Post-Graduation Programs in Biological Sciences (PPGCB) and Oceanography (PPGO) of UFPE.

5 References

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. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): from physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**. 177, 182–189, 2016.

ARAÚJO M.C., ASSIS, C.R.D., SILVA, K.C.C., SOUZA, K.S., AZEVEDO, R.S., ALVES, M.H.M.E., SILVA, L.C., SILVA, V.L., ADAM, M.L., CARVALHO JR., L.B., BEZERRA, R.S., OLIVEIRA, M.B.M. Characterization of brain

acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring. **Aquatic Toxicology**. 205, 213–226, 2018.

ASSIS, C.R.D.; LINHARES, A.G.; OLIVEIRA, V.M.; FRANÇA, R.C.P.; MACIEL CARVALHO, E.V.M.; BEZERRA, R.S.; CARVALHO JR, L.B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of the Total Environment**. v. 441, p. 141–150, 2012.

ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., OLIVEIRA, V.M., FRANC, A, R.C.P., SANTOS, J.F., MACIEL CARVALHO, E.V.M., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR., L.B. Effect of ions on the activity of brain acetylcholinesterase from tropical FSH. **Journal of Coastal Life Medicine**. 3, 505-514, 2015.

ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., CABRERA, M.P., OLIVEIRA, V.M., SILVA, K.C.C., MARCUSCHI, M., MACIEL CARVALHO, E.V.M., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR., L.B. Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure: new and forgotten insights. **Environmental Science and Pollution Research**. 25, 18364–18376, 2018.

AZEVEDO, R.D.S., FALCÃO, K.V.G., ASSIS, C.R.D., MARTINS, R.M.G., ARAÚJO, M.C., YOGUI, G.T., NEVES, J.L., SEABRA, G.M., MAIA, M.B.S., AMARAL, I.P.G., LEITE, A.C.R., BEZERRA, R.S. Effects of pyriproxyfen on zebrafish brain mitochondria and acetylcholinesterase. **Chemosphere**. 263, 128029, 2021.

ATSDR. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicologic information about insecticides used for eradicating mosquitoes (West Nile virus control)**. Atlanta, 85 pp., 2005.

BOCQUENÉ, G., GALGANI, F., TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Mar. Environmental Research**. 30, 75–89, 1990.

BOCQUENÉ, G., ROIG, A., FOURNIER, D. Cholinesterases from common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. **FEBS Letters**. 407, 261–266, 1997.

- BONACCI, S., CORSI, I., FOCARDI, S. Cholinesterase activities in the adductor muscle of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Antarctic Science**. 18, 15–22, 2006.
- BRADBERRY, S.M., CAGE, S.A., PROUDFOOT, A.T., VALE, J.A. Poisoning due to pyrethroids. **Toxicology Reviews**. 24, 93–106, 2005.
- BRIMIJOIN, S. Can cholinesterase inhibitors affect neural development? **Environmental Toxicology Pharmacology**. 19, 429–432, 2005.
- BRIMIJOIN, S., KOENIGSBERGER, C. Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. **Environmental Health Perspectives**. 107, 59–64, 1999.
- BRIMIJOIN, S., CHEN, V.P., PANG, Y.-P., GENG, L., GAO, Y. Physiological roles for butyrylcholinesterase: a BChE-ghrelin axis. **Chemico-Biological Interactions**. 259, 271–275, 2016.
- CHATTONET, A., LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochemical Journal**. 260, 625–634, 1989.
- CHENG, Y, PRUSOFF, W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. **Biochemistry Pharmacology**. 22, 3099–108, 1973.
- ÇOKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. **Turkish Journal of Biochemistry**. 28, 54-61, 2003.
- CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA), 2005. Resolução CONAMA nº 357/2005, Brasília, DF. Available at: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?Codlegi=459>.
- COTTAGE, E.L.A., GUNNING, R.V., 2004. Buprofezin and novaluron inhibit acetylcholinesterase activity in B-biotype *Bemisia tabaci*. In: SILMAN, I., SOREQ, H., ANGLISTER, L., MICHAELSON, D., FISHER, A. (Eds.), Cholinergic Mechanisms. CRC Press, New York.
- DAVIES, T.G., FIELD, L.M., USHERWOOD, P.N., WILLIAMSON, M.S. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB Life**. 59, 151–162, 2007.

- DAY, F.A., FUNK, A.E., BRADY, F.O. In vivo and ex vivo displacement of zinc from metallothionein by cadmium and by mercury. **Chemico-Biological Interactions**. 50, 159–174, 1984.
- DHADIALLA, T.S., CARLSON, G.R., LE, D.P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Annual Reviews of Entomology**. 43, 545–569, 1998.
- DOMINGOS, V., AZEVEDO, M., SILVA, M.D. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. **Environmental Research**. 105, 350–363, 2007.
- DONG, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. **Invertebrate Neuroscience**. 7, 17–30, 2007.
- FANSLOW, D.L., NALEPA, T.F., LANG, G.A. Filtration rates of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) on natural seston from Saginaw Bay, Lake Huron. **Journal of Great Lakes Research**. 21, 489–500, 1995.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Pesticides in Food Report. **FAO Plant Production and Protection Paper 191**. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy, 2007.
- FORGET, J.; LIVET, S.; LEBOULENGER, F. Partial purification and characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. 132, 85–92, 2002.
- FRASCO, M.F., FOURNIER, D., CARVALHO, F., GUILHERMINO, L. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. **Biomarkers**. 10, 360–375, 2005.
- FRASCO, M.F., COLLETIER, J.P., WEIK, M., CARVALHO, F., GUILHERMINO, L., STOJAN, J., FOURNIER, D. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. **FEBS J**. 274, 1849–1861, 2007.
- FULTON, M.H., KEY, P.B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 20, 37–45, 2001.
- FUNK, A.E., DAY, F.A., BRADY, F.O. Displacement of zinc and copper from copper-induced metallothionein by cadmium and by mercury: in vivo and ex vivo studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 86, 1–6, 1987.

- GNAGEY, A.L.; FORTE, M.; ROSENBERRY, T.L. Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. **Journal of Biological Chemistry**, 262, 13290–13298, 1987.
- GALIMANY, E., FREEMAN, C.J., LUNT, J., DOMINGOS, A., SACKS, P., WALTERS, L. Feeding competition between the native oyster *Crassostrea virginica* and the invasive mussel *Mytella charruana*. **Marine Ecology Progress Series**. 564, 57–66, 2017.
- GRIGORIEVA, G.M. Propionylcholinesterase in the nervous ganglia of the fresh-water pulmonate mollusc *Lymnaea stagnalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology part A**. 44, 1341–1352, 1973.
- HEALTH CANADA, 2017. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality - Summary Table. Water and Air Quality Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario.
- HIRANO, M., HATAKOSHI, M., KAWADA, H., TAKIMOTO, Y. Pyriproxyfen and other juvenile hormone analogues. **Reviews in Toxicology**. 2, 357–394, 1998.
- HUGHES, R.J., BENNETT, J. Effect of metal ions on the activity of acetylcholinesterase. **Biochemical Society Transactions**. 13, 219–220, 1985.
- KÄGI, J.H.R., 1993. In: SUZUKI, K.T., IMURA, N., KIMURA, M. (Eds.), Metallothionein III. Birkhäuser, Basel, pp. 29–55.
- KAVIRAJ, A., GUPTA, A. Biomarkers of type II synthetic pyrethroid pesticides in freshwater fish. **BioMed Research International**. Volume 2014, Article ID 928063, 7 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/928063>
- KELLAR, K.J. Overcoming inhibitions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, 13263–13264, 2006.
- LIMA, E.P., GOULART, M.O.F., ROLIM NETO, M.L. Evaluation of the role of ATP-binding cassette transporters as a defence mechanism against temephos in populations of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 109, 961-963, 2014.
- LOMBARDI, A.T., FERNANDEZ, M. Ecotoxicologia. In: BAPTISTA NETO, J. A. et al. Poluição marinha. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Parte V, Cap. 14, p.369-392.

LOPES, D.F.C., ASSIS, C.R.D., SANT'ANNA, M.C.S., SILVA, J.F., BEZERRA, R.S., FRÉDOU, F.L. Brain acetylcholinesterase of three perciformes: From the characterization to the in vitro effect of metal ions and pesticides. Brain acetylcholinesterase of three perciformes: From the characterization to the in vitro effect of metal ions and pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 173, 494–503, 2019.

MELO-SANTOS, M.A.V., VARJAL-MELO, J.J.M., ARAÚJO, A.P., GOMES, T.C.S., PAIVA, M.H.S., REGIS, L.N., FURTADO, A.F., MAGALHAES, T., MACORIS, M.L.G., ANDRIGHETTI, M.T.M., AYRES, C.F.J. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**. 113, 180–189, 2010.

MESECK, S.L., SENNEFELDER, G., KRISAK, M., WIKFORS, G.H. Physiological feeding rates and cilia suppression in blue mussels (*Mytilus edulis*) with increased levels of dissolved carbon dioxide. **Ecological Indicators**. 117, 106675, 2020.

METCALF, R.L. Structure-activity relationships for insecticidal carbamates. Bulletin of the World Health Organization. 4, 43–78, 1971.

MONSERRAT, J.M., BIANCHINI, A., BAINY, A.C. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. **Marine Environmental Research**. 54, 781–785, 2002.

MORA, P., MICHEL, X., NARBONNE, J.-F. Cholinesterase activity as a potential biomarker in two bivalves. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 7, 253–260, 1999.

MUSIG, Y., MUSIG, W., SATIENJIT, S. Filtration rates of tropical freshwater bivalve mollusks: *Pilsbryconcha excilis compressa*, *Ensis ingallsianus ingallsianus*, *Corbicula boudoni*, *Corbicula moreletiana*. **Kasetsart University Fisheries Research Bulletin**. 36, 23-29, 2012.

NARCHI, W., GALVÃO-BUENO, M.S. Anatomia funcional de *Mytella charruana* (D'Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). **Boletim de Zoologia**. 6, 113-145, 1983.

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

OGA, S. 2008. Fundamentos de Toxicologia, Terceira edição. Editora Atheneu, São Paulo.

OLSON, D.L., CHRISTENSEN, G.M., 1980. Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro). *Environ. Res.* 21, 327–335.

PERKINS, E., SCHLENK, D. Role of biotransformation in determining aldicarb toxicity in fish. **Marine Environmental Research.** 50, 79, 2000.

PEZZEMENTI, L., SANDERS, M., JENKINS, T., HOLLIMAN, D., 1991. In: MASSOULIÉ, J., BACOU, F., BARNARD, E., CHATONNET, A., DOCTOR, B., QUINN, D. (Eds.), *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology* (pp. 24–31). USA: American Chemical Society.

PORRETTA, D., GARGANI, M., BELLINI, R., MEDICI, A., PUNELLI, F., URBANELLI, S. Defence mechanisms against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the P-glycoprotein efflux pumps. *Medical and Veterinary Entomology.* 22, 48–54, 2008.

RILEY, B. The toxicology and treatment of injuries from chemical warfare agents. **Current Anaesthesia and Critical Care.** 14, 149-154, 2003.

RISHER, F.L., MINK, F.L., STARA, J.F. The toxicologic effects of the carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review. **Environmental Health Perspectives.** 72, 267–281, 1987.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G., GOLD-BOUCHOT, G. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. **Marine Environmental Research.** 50, 357–360, 2000.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G., GOLD-BOUCHOT, G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Environmental Research.** 58, 505–509, 2004.

SAAD, L.O.; CUNHA, C.G.; COLPO, K.D. How mollusk assemblages respond to different urbanization levels: characterization of the malacofauna in subtropical Brazilian mangroves. **Marine Biodiversity.** 49, 989–999, 2019.

SILMAN, I., SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology.** 5, 293–302, 2005.

- 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**. 126, 191–197, 2013.
- SOUZA, P.R., SOUZA, K.S., ASSIS, C.R.D., ARAÚJO, M.C., SILVA, K.C.C., SILVA, J.F.X., FERREIRA, A.C.M., SILVA, V.L., ADAM, M.L., CARVALHO JR., L.B., BEZERRA, R.S. Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. **Aquatic Toxicology**. 197, 109–121, 2018.
- SUPPIRAMANIAM, V., ABDEL-RAHMAN, E. A., BUABEID, M. A., PARAMESHWARAN, K. Ion Channels. **Comprehensive Toxicology**. 129–171, 2010.
- SYLVESTER, F., DORADO, J., BOLTOVSKOY, D., JUÁREZ, A., CATALDO, D. Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. **Hydrobiologia**. 534, 71–80, 2005.
- TALESA, V., CONTENTI, S., MANGIABENE, C., PASCOLINI, R., ROSI, G., PRINCIPATO, G.B. Propionylcholinesterase from *Murex brandaris*: Comparison with other invertebrate cholinesterases. **Comparative Biochemistry and Physiology part C**. 96, 39-43, 1990.
- OMLINSON, G., MUTUS, B., MCLENNAN, I. Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. **Canadian Journal of Biochemistry**. 59, 728–735, 1981.
- USEPA, 2009. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. National Primary Drinking Water Regulations. Washington, DC, USA. Available at: https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-06/documents/npwdr_complete_table.pdf.
- VAIS, H., WILLIAMSON, M.S., DEVONSHIRE, A.L., USHERWOOD, P.N. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. **Pest Managing Science**. 57, 877–888, 2001.
- VALBONESI, P., SARTOR, G., FABBRI, E. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as

sentinel organisms for biosurveillance programmes. **Science of the Total Environment**. 312, 79–88, 2003.

VALE, J.A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. **Toxicology Letters**. 102-103, 649–652, 1998.

VARÒ, I., NAVARRO, J.C., AMAT, F., GUILHERMINO, L. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 75, 61–72, 2003.

VARÒ, I., NAVARRO, J.C., NUNES, B., GUILHERMINO, L. Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. **Aquaculture**. 266, 87–96, 2007.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Organophosphorus insecticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria 63**, Geneva, 1986a.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Carbamate pesticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria 64**, Geneva, 1986b.

WoRMS - WORLD REGISTER OF MARINE SPECIES - *Mytella charruana* (d'Orbigny, 1842). Computer Generated Native Distribution Map for *Mytella charruana* (Charrua mussel), with modelled year 2050 native range map based on IPCC RCP8.5 emissions scenario. Available at: https://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular

YUAN, W.; WALTERS, L.J.; SCHNEIDER, K.R.; HOFFMAN, E.A. Exploring the survival threshold: a study of salinity tolerance of the nonnative mussel *Mytella charruana*. **Journal of Shellfish Research**. 29, 415–422, 2010.

4.3 CAPÍTULO III

Characterization of acetylcholinesterase of the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and its use as a biomarker in environmental monitoring in commercial shrimp farms

Este artigo será submetido à
revista



Qualis: A1

ISSN: 0147-6513

Fator de Impacto: 4,872

Corresponding author:

Ranilson de Souza Bezerra

Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica e Biofísica,
Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

E-mail address: Email: ransoube@uol.com.br

Characterization of acetylcholinesterase of the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and its use as a biomarker in environmental monitoring in commercial shrimp farms

Santos, G.P.C.¹; Assis, C.R.D.^{2,3}; Souza, D.L.⁴; Silva, M.A.⁴; Oliveira, V.M.⁴; Santos, J.F.⁴; Yogui, G.T.³; Bezerra, R.S.²;

¹ Instituto de Tecnologia de Pernambuco, Recife, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

³ Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

⁴ Departamento Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

Abstract

The consumption of aquatic organisms is increasing worldwide. Seawater and freshwater species contribute to achieve nutritional requirements following recommendations of international organizations, mainly in developing countries. Therefore, the quality of this food and its cultivation/capture environment is of great importance for food and environmental security. The shrimp *Litopenaeus vannamei* is the most important species of shrimp farming in the world. The abundance of shrimp residues makes it an ideal alternative for the supply of bioactive macromolecules, including biomarkers. Cholinesterases (ChEs; EC 3.1.1.x) are enzymes responsible for hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine and their rapid action modulates neuronal communication. Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) are primary targets for the action of various pesticides and heavy metals. To identify changes in enzymatic behavior caused by these and other substances, it is necessary to characterize their activity under normal conditions. This study aimed to characterize physical-chemical and kinetic parameters of the ChEs of three tissues of *L. vannamei* (eye, muscle and hepatopancreas) as well as to investigate the effect of organophosphate (dichlorvos, diazinon, chlorpyrifos, methylparathion and temephos), carbamates (carbaryl, carbofuran and aldicarb), benzoylureas (diflubenzuron and novaluron), pyrethroid (cypermethrin) and juvenile hormone analogue - JHA (pyriproxyfen) and the effect of heavy metals: mercury (Hg²⁺), cadmium (Cd²⁺), lead (Pb²⁺), arsenic (As³⁺), copper (Cu²⁺) and zinc (Zn²⁺) evaluating the potential of the enzyme as biomarker in two shrimp farm environments. The optimum pH found for the three tissues was around 9.0 and the optimum temperature

ranged from 35 to 45°C. The tissues retained 60, 70 and 90% (muscle, hepatopancreas and eye, respectively) of the activity after exposure of the extracts to 60°C for 30 min. The kinetic parameter k_m showed values of 0.9 and 1.7 mmol.L⁻¹ for ASCh (eye and muscle), 4.37 mmol.L⁻¹ of PSCh (eye) and 3.73 mmol .L⁻¹ of BSCh (hepatopancreas). V_{max} values were 49.6 and 146.0 mU.mg protein⁻¹ for muscle and eye (ASCh), 63.6 mU.mg protein⁻¹ for eye (PSCh) and 27.8 mU.mg protein⁻¹ for hepatopancreas (BSCh). ChEs extracted from the eye and muscle were the most inhibited by BW284c51 while the ChE present in the hepatopancreas was the most inhibited by Iso-OMPA. Such results confirm that the ChEs present in the eye and muscle correspond to AChE, whereas the ChE activity present in the hepatopancreas can be attributed to BChE. The exposure to pesticides on ChEs activity showed that, according to IC₂₀ and IC₅₀ values, the most inhibitory compounds were: carbofuran (eye), temephos (muscle) and aldicarb (hepatopancreas). The effect of metal ions on ChEs activity followed this order of inhibitory power: As³⁺ > Cd²⁺ > Pb²⁺ > Hg²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺ (eye); Pb²⁺ > Hg²⁺ > As³⁺ > Cd²⁺ > Zn²⁺ > Cu²⁺ (muscle); Hg²⁺ > Pb²⁺ > As³⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺. Regarding the monitoring tests in two shrimp farm environments (located at the estuarine complexes of Capibaribe and Formoso rivers: CERC and CERF, respectively), the *L. vannamei* AChE activity from eye did not differ significantly whereas the ChEs activities of muscle (AChE) and hepatopancreas (BChE) were strongly inhibited in both environments evidencing the presence of anticholinesterasic load in both environments. Physico-chemical and kinetic characteristics of *L. vannamei* cholinesterases were investigated and their peculiarities may be useful as experimental conditions for the use of these macromolecules in applications such as biomarkers of the presence of pesticides and heavy metals.

Keywords: biomarker; environmental monitoring; enzyme activity.

1 INTRODUCTION

Aquatic organisms and their products play a crucial role in global nutrition and food security. In low-income countries, their consumption is reinforced by these products containing valuable macro and micronutrients (vitamins, minerals, amino acids and essential fatty acids) required to solve some of the most serious and widespread nutritional deficiencies. In addition, evidence confirms the beneficial effects of seafood consumption for mental health and prevention of cardiovascular disease, stroke and age-related macular degeneration, among other diseases (FAO, 2018). Therefore, besides the high production of seafood, residues are produced in great amounts and may represent important sources for bioactive molecules with biotechnology applications, such as enzymes, adding sustainability to this economic activity.

Cholinesterases (ChE; EC 3.1.1.x) are enzymes of the group of serine esterases subdivided in acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) and a third activity known as propionylcholinesterase (PChE; 3.1.1.8) that act mainly on: 1) the breakdown of acetylcholine in the cholinergic synapses, conducting the nerve impulse responsible for neuronal communication (AChE); 2) detoxification of xenobiotics and hormones (BChE/PChE) (Nunes, 2011; Assis et al., 2014; Brimijoin et al., 2016). The inhibition of the main function (modulation of neurotransmission) by exposure to anticholinesterasic agents such as pesticides and metal ions leads to accumulation of the neurotransmitter in the synaptic cleft causing hyperstimulation of cholinergic receptors (Valbonesi et al., 2011; Nunes et al., 2014). The inhibitory effect of pesticides on ChEs activity is based on their interaction with the esteratic subsite of enzyme (phosphorylation for organophosphates and carbamoylation for carbamate pesticides), preventing the hydrolysis of substrate (WHO, 1986a and 1986b; Quinn, 1987; Tõugu, 2001; Assis et al., 2011). The interaction with metals occurs due to binding with peripheral sites and thiol groups affecting the hydration state of the active site of the enzyme (Tomlinson et al., 1980; Olson and Christensen, 1980; Hughes and Bennett, 1985; Marques and Yamanaka, 2008; Marques et al., 2011).

Pesticides and metal ions are largely employed in domestic, agriculture and industry environments. Estimates suggested that only 0.1% of the applied pesticides reach the target pests and the rest spreads throughout the environment (Hart and Pimentel, 2002). Concomitantly, metal ions such as arsenium and mercury reach the environmental matrixes by many sources: released from the earth's crust by volcanic

activity and dissolution by water as well as human activities such as industries and mining. These compounds/elements enter aquatic groundwater and aquatic ecosystems by rainwater, leaching, drainage, irrigation and run-off being absorbed by aquatic organisms and often bioaccumulating (Rodrigues et al., 2011). They represent high risk to human and environmental health. Thus, monitoring and controlling the presence of these compounds in the environments are of crucial importance (Assis et al., 2010).

In addition, early detection allows the identification of pollutants before they reach higher levels of biological organization (Jonsson and Aoyama, 2010). This assignment can be carried out by biomarkers which represent measurements of body fluids, cells or tissues indicating, in physiological, cellular or biochemical terms the presence of contaminants in the sentinel organism (Coimbra et al., 2013; Araújo et al., 2016). The ChE activity from a number of aquatic organisms species has been proposed as biomarkers in monitoring programs of water resources (Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot, 2000; Fulton and Key, 2001; Botté et al., 2012; Ghazala et al., 2014; Wang et al., 2015; Souza et al., 2018) due to their specificity and effective diagnostic method as well as their viability since such enzymes are located in discarded parts of the animals (Silva et al., 2013; Souza et al., 2018; Araújo et al., 2018; Lopes et al., 2019).

ChEs present high inter and intra-specific polymorphism, also differing between tissues. Therefore, it is of crucial importance to establish assay conditions and to characterize their activity in these conditions and perform tests of exposure to several compounds, inhibitors or not (Howcroft et al., 2001; Nigam et al., 2012; Rodríguez-Fuentes et al., 2008). In 2016, Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was the most produced crustacean in the world, representing 53% of world production (FAO, 2018). In Brazil, this species also predominates in shrimp farming, where it reached approximately 52 thousand tons in 2016, representing 19.3% of national aquaculture (IBGE, 2016). This benthonic species thrives in brackish and saltwater, bearing even low levels of oxygen and becoming invasive in the ecosystems close to the shrimp farms. This species present scavenging omnivorous habits and therefore, being subjected to bioaccumulation and constituting a suitable alternative to be used as source of ChEs (Van Wik and Scarpa, 1999; Saoud et al., 2003; García-de La Parra et al., 2006). This contribution aimed to characterize physicochemical and kinetic parameters of ChEs of *L. vannamei*, investigating the *in vitro* effect of pesticides and metal ions on its activity and investigating its potential as biomarker of these substances in two shrimp farm environments according to current national and international regulations.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Acetylthiocholine iodide, S-butyrylthiocholine iodide, propionylthiocholine iodide, tetraisopropyl pyrophosphoramidate (Iso-OMPA), 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide (BW284c51), neostigmine bromide, eserine, bovine serum albumin, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB), tris (hydroxymethyl) aminomethane, dimethyl sulfoxide (DMSO) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Analytical grade dichlorvos (98.8%), diazinon (99.0%), chlorpyrifos (99.5%), temephos (97.5%), methyl-parathion (99.7%), aldicarb (99.8%), carbofuran (99.9%), carbaryl (99.8%), novaluron (98.0%), diflubenzuron (99.7%), cypermethrin (98.9%) and pyriproxyfen (98.9%) were obtained from Riedel-de-Haën, Pestanal[®] (Seelze, Germany). HCl was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Glycine was acquired from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). Tissue homogenizer IKA RW-20 (IKA Works GmbH, Staufen, Germany). The microplate reader used was xMark[™] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The centrifuge was Legend XTR (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The Software for statistical analyzes was MicroCal[®] Origin[®] Version 8.0 (MicroCal, Northampton, MA, USA).

2.2 Sampling and Collection sites

L. vannamei specimens were collected in two shrimp farm environments. The first one was the estuarine complex of the Capibaribe river (CERC) in Recife, Pernambuco, Brazil (8° 4'43.00"S / 34°53'1.14"W). The economic activities in this Basin include food industry, non-metallic minerals, textiles, metallurgy, chemicals, pharmaceutical and veterinary products, sugar and alcohol, leather, plastics, mechanics, electrical material (CPRH, 2020). The second was the estuarine complex of Formoso river (CERF) in Rio Formoso, Pernambuco, Brazil (8° 39' – 8° 42'S / 35° 10' – 35° 05'W) where there are no records of discharge of industrial effluents. The places of collection are shown in Figure 1.

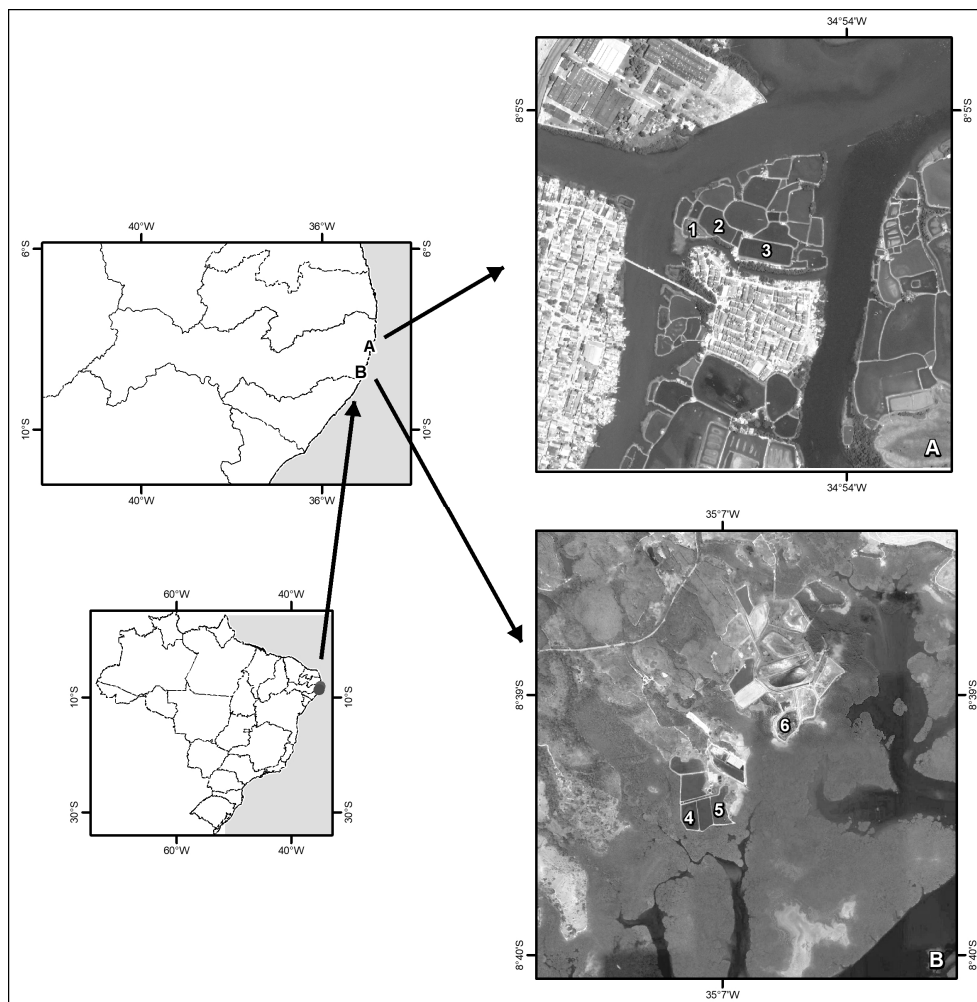


Figure 1. Collection sites of *Litopenaeus vannamei* in the estuarine areas of Capibaribe (A) and Formoso (B) rivers (CERC and CERF, respectively).

The *L. vannamei* specimens (8.2 ± 0.66 g CERC and 6.17 ± 0.97 g CERF) were collected in triplicate (three ponds in each shrimp farm, $n = 30$ individuals per pond $\therefore n = 90$ per farm). The tissues (eyes, muscle and hepatopancreas) were removed on site, pooled and kept on ice. At the laboratory, the tissues were stored in plastic tubes and frozen (-20°C) until cholinesterase extraction.

Water, sediment (of the ponds) and tissues were also collected for metal analysis. The sediment samples (± 2 kg) were collected with a plastic pipe sampler (ϕ 20 cm) in the superficial layer (0-20 cm), in triplicates for each *L. vannamei* pond. The sediment was stored in a plastic container, kept temporarily refrigerated until arrival at the laboratory, when they were frozen at -22°C for further analysis of trace metals.

Hydrobiological parameters of the water of ponds: dissolved oxygen (DO), oxygen saturation (DO%), pH, salinity, temperature and chlorophyll *a* were determined in CERC and CERF using a multiparameter probe YSI Pro Plus (YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA).

2.3 Acetylcholinesterase (AChE) extraction and activity

The activity of AChE was determined by the colorimetric method proposed by Assis et al. (2012). *L. vannamei* tissue samples were processed in a tissue homogenizer in 0.5 mol.L⁻¹ Tris-HCl buffer pH 8.0 to a concentration of 20 mg buffer per mL of tissue. Then, they were centrifuged at 1,000 x *g* for 10 minutes, collecting the supernatant (crude extract) and storing at -25 °C for the assays. Then, using 96-well microtiter plates 20 µL of the crude extract were added to the chromogenic reagent 0.25 mmol.L⁻¹ DTNB (200 µL) and the reaction started with the addition of 20 µL of the substrate (62 mmol.L⁻¹ acetylthiocholine iodide). The reaction product was read at 405 nm for 3 min in a microplate reader.

2.4 Kinetic parameters

The kinetic parameters Michaelis-Menten constant (k_m) and the maximum hydrolysis rate (V_{max}) were determined by assaying the enzymatic activity as described above with increasing concentrations (13 concentrations) of the substrates acetylthiocholine (ASCh), propionylthiocholine (PSCh) and S-butyrylthiocholine (BSCh) iodide from 10 - 250 mmol.L⁻¹ (0.8 - 20.8 mmol.L⁻¹ final concentration). The kinetic curves were adjusted to the Michaelis-Menten hyperbolic model ($p < 0.05$). The parameters V_{max} ratio (Relative Efficiency of Hydrolysis – REH) and k_m ratio were also determined to corroborate the results of specific substrates, considering k_m ratios ≥ 1 and V_{max} ratios < 1 as AChE whereas k_m ratios < 1 and V_{max} ratios ≥ 1 are considered as BChE and PChE characteristics (Pezzeменти et al., 1991; Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot, 2004; Assis et al., 2014).

2.5 physicochemical parameters

The optimal pH and temperature of the *L.vannamei* AChE were measured by assaying the enzymatic activity in buffers with different pH ranging from 4.0 to 9.0 and temperatures from 5 °C to 70 °C. Thermal stability was determined by subjecting the enzyme to the same temperatures for 30 min and, after 15 min at 25 °C (equilibration to room temperature), the remaining activity was determined.

2.6 Selective inhibition assays

The selective inhibitors BW284c51 (AChE inhibitor), Iso-OMPA (BChE inhibitor), neostigmine bromide and eserine (total cholinesterase inhibitors) were incubated (10 µL) with *L. vannamei* extract (10 µL) for 60 min, according to the method described by Assis et al. (2012). Inhibitor concentrations ranged from 0.001 to 10 mmol.L⁻¹ (serial dilution - 10x). After the incubation time, 200 µL of 0.25 mmol.L⁻¹ DTNB was added to the mixture and following the addition of 20 µL of 62 mmol.L⁻¹ acetylthiocholine substrate, the reaction started. The absorbance was followed at 405 nm for 180 seconds and the residual activity was determined considering the absence of the inhibitor as 100% activity. The data were adjusted to the nonlinear regression models with the best determination coefficient: exponential decay, sigmoidal (Boltzmann) and polynomial ($p < 0.05$) for calculations of the inhibition parameters.

2.7 Effect of pesticides

The extracts were incubated for 60 min at 25 °C with organophosphates (dichlorvos, diazinon, chlorpyrifos, methyl-paration and temephos), carbamates (carbaryl, carbofuran and aldicarb), benzoylureas (diflubenzuron and novaluron), pyrethroids (cypermethrin) and juvenile hormone analog - JHA (pyriproxifen), according to the method described by Assis et al. (2012). The insecticides were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted in distilled water to increasing concentrations from 0.001 to 10 mmol.L⁻¹ (0.00025 to 2.5 mmol.L⁻¹ for novaluron) through serial dilution (10x). The incubation was performed according to Assis et al (2012) and the residual activity was determined considering the absence of pesticides as 100% of activity. The data were fitted to nonlinear regression models

(according to section 2.6) with the best determination coefficient ($p < 0.05$), to calculate the inhibition parameters.

2.8 Effect of metal ions

The effects of the metal ions As^{3+} (NaAsO_2), Cd^{2+} (CdCl_2), Cu^{2+} (CuCl_2), Pb^{2+} (PbCl_2), Hg^{2+} (HgCl_2) and Zn^{2+} (ZnCl_2) were determined according to Bocquené et al., (1990) and Assis et al., (2015) similarly to tests with selective inhibitors and pesticides (concentrations ranging from 0.001 to 10 mmol.L^{-1} in 10x serial dilution, for each ion) with the exception that the incubation time of the *L. vannamei* AChE extract (10 μL) with the ions (10 μL) was 40 min (Bocquené et al., 1990; Assis et al., 2015). Data obtained were adjusted to the best nonlinear regression models ($p < 0.05$) to calculate the inhibition parameters.

2.9 Estimation of the inhibition parameters IC_{20} and IC_{50}

The concentrations that inhibit the enzyme activity by 20 and 50% (IC_{20} , IC_{50}) were estimated for each inhibitor (specific inhibitors, pesticides and ions) according to Assis et al. (2012) using the nonlinear regression models obtained in the previous sections in the graphs of $\ln$ (natural log of inhibitor concentration) vs. enzymatic activity (%) for each inhibitor.

2.10 Determination of metals

Ten metals (Al, As, Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Hg, Ni and Zn) were analyzed in water, sediment and in the tissues of *L. vannamei*. The acid digestion of As, Cd and Pb followed the 999.10 method described by the Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 20th Edition (AOAC, 2016). While Al, Cu, Cr, Ni and Zn followed Method 3030K and 3120 B of Standard Methods, 23rd Edition (SMEWW, 2017). For mercury, the 7473 method described by the United States Environmental Protection Agency - USEPA, (USEPA, 2007) was used. Digestion in a microwave oven was performed according to the DMA 80 PC / T640 / 1640, Revision 10 method, described in DMA Milistore SRL - Application Book (DMA, 2011). The reference material used after the ISO 34: 2012 Guide of the Brazilian Technical Standards Agency (ABNT).

3 RESULTS AND DISCUSSION

Hydrobiological parameters of the collection sites are shown in Table 1. Dissolved oxygen in both environments (CERC and CERF) was within the range of optimum concentration ($> 3 \text{ mg.L}^{-1}$) according to Boyd (2018). Salinity, pH, temperature are also in the optimum range for *L. vannamei* (Saoud et al., 2003; Zhang et al., 2006; Palomares and Pauly, 2020), excepting chlorophyll *a* that was lower than the optimum range recommended by Cavalcanti (2003). Significant differences between parameters in CERC and CERF were only observed for salinity and chlorophyll *a* with lower values for both in CERC which is an urban estuary subjected to industrial and agricultural effluents and with higher flow in relation to CERF.

Table 1. Hydrobiological variables of *L. vannamei* shrimp ponds located at the estuarine complex of Capibaribe river (CERC), an urban area subjected to domestic effluents, and estuarine complex of Formoso river (CERF), a rural area with less pollution by domestic effluents.

Collection site	DO (mg.L^{-1})	%DO (%)	pH	Salinity (‰)	Temperature (°C)	Chlorophyll <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
CERC	$5,4 \pm 2,04 \text{ a}$	$74,1 \pm 30,5 \text{ a}$	$7,7 \pm 0,27 \text{ a}$	$5,9 \pm 3,54 \text{ a}$	$28,0 \pm 0,13 \text{ a}$	$18,0 \pm 12,22 \text{ b}$
CERF	$5,1 \pm 0,75 \text{ a}$	$68,0 \pm 8,44 \text{ a}$	$7,7 \pm 0,68 \text{ a}$	$13,0 \pm 0,63 \text{ b}$	$28,0 \pm 0,29 \text{ a}$	$51,0 \pm 20,53 \text{ a}$
OR	$\geq 5,0$	-	6,5 – 8,5	0.5 - 40	23.3 - 29	50 – 200

OR - Optimum range (Boyd, 2000; Saoud et al., 2003; Boyd, 2018; Palomares and Pauly, 2020).

Kinetic parameters, maximum rate of hydrolysis (V_{max}) and the Michaelis-Menten constant (k_m) were determined using the specific substrates ASCh, PSCh and BSCh in thirteen increasing concentrations from 10 to 250 mmol.L^{-1} (0.8 - 20.8 mmol.L^{-1} final concentration). The values of V_{max} and k_m for the ChEs of the three tissues of *L. vannamei* (eye, muscle and hepatopancreas) with these substrates indicated that in the eye and muscle the predominant enzyme is AChE whereas in the hepatopancreas the only cholinesterase present is BChE (Table 2). Values of these parameters for *L. vannamei* and other shrimp species are also shown Table 2. No activity was detected with the substrate BSCh in the eye and the muscle. Activity with PSCh was observed in the eye, however 2.3-fold lower than the activity with ASCh.

García de La Parra et al. (2006) observed AChE, PChE-like and BChE-like activity in eye and muscle of *L. vannamei* and with predominance of the activity using the substrate ASCh. Tu et al., (2006) found these three ChEs activities in *Penaeus monodon*.

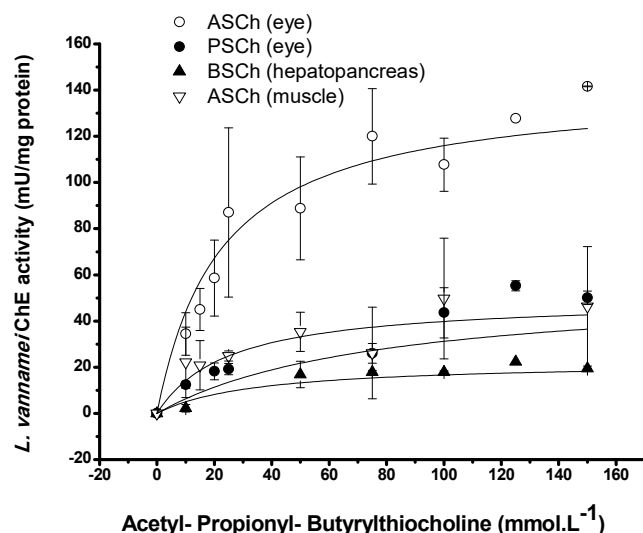


Figure 2. Activity of *L. vannamei* ChEs from three tissues (eye, muscle and hepatopancreas) using the substrates acetylthiocholine (ASCh), propionylthiocholine (PSCh) and butyrylthiocholine (BSCh). Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

The optimal pH found for the three *L. vannamei* ChEs were 9.0 (eye, muscle and hepatopancreas) within a narrow range (Figure 3A-C) and the optimal temperature were 35°C (eye), 45°C (muscle and hepatopancreas) (Figure 4A-C). Such difference between the optimal temperatures of these tissues may be ascribed to differences in the disulfide bond profile of the enzymes (MacPhee-Quigley et al., 1986).

Table 2. Kinetic parameters (k_m and V_{max}), k_m ratios and V_{max} ratios of ChE specific substrates activities in different tissues of some Peneid and Palaemonid species

Species (substrate)	k_m (mmol.L ⁻¹)	k_m ratio	V_{max} (mU.mg ⁻¹)	V_{max} ratio	Tissue	Reference
<i>Litopenaeus vannamei</i> (ASCh) A	0.89 ± 0.27	-	145.98 ± 10.4	-	eye	Present study
<i>Litopenaeus vannamei</i> (PSCh) P	4.37 ± 2.50	4.91	63.63 ± 11.05	0.43	eye	Present study
<i>Litopenaeus vannamei</i> (BSCh) B	-	-	-	-	eye	Present study
<i>Litopenaeus vannamei</i> (ASCh) A	1.70 ± 0.89	-	49.62 ± 7.64	-	muscle	Present study
<i>Litopenaeus vannamei</i> (PSCh) P	-	-	-	-	muscle	Present study
<i>Litopenaeus vannamei</i> (BSCh) B	-	-	-	-	muscle	Present study
<i>Litopenaeus vannamei</i> (ASCh) A	-	-	-	-	hepatopancreas	Present study
<i>Litopenaeus vannamei</i> (PSCh) P	-	-	-	-	hepatopancreas	Present study
<i>Litopenaeus vannamei</i> (BSCh) B	3.73 ± 1.89	4.19	27.80 ± 4.67	0.19	hepatopancreas	Present study
<i>Litopenaeus vannamei</i> (ASCh) A	-	-	19.6 ± 4.26	-	eye	García-de La Parra et al., 2006
<i>Litopenaeus vannamei</i> (PSCh) P	-	-	15.26 ± 1.4	0.78	eye	García-de La Parra et al., 2006
<i>Litopenaeus vannamei</i> (BSCh) B	-	-	1.66 ± 0.37	0.08	eye	García-de La Parra et al., 2006
<i>Litopenaeus vannamei</i> (ASCh) A	-	-	6.09 ± 1.17	-	muscle	García-de La Parra et al., 2006
<i>Litopenaeus vannamei</i> (PSCh) P	-	-	5.12 ± 0.89	0.84	muscle	García-de La Parra et al., 2006
<i>Litopenaeus vannamei</i> (BSCh) B	-	-	2.54 ± 0.2	0.41	muscle	García-de La Parra et al., 2006
<i>Penaeus monodon</i> (ASCh) A	0.0013 ± 0.0007	-	549 ± 17	-	gills	Tu et al., 2009
<i>Penaeus monodon</i> (PSCh) P	0.22 ± 0.07	169.23	399 ± 31	0.72	gills	Tu et al., 2009
<i>Penaeus monodon</i> (BSCh) B	0.18 ± 0.09	138.46	376 ± 29	0.68	gills	Tu et al., 2009
<i>Penaeus monodon</i> (ASCh) A	0.032 ± 0.002	-	3185 ± 52	-	muscle	Tu et al., 2009
<i>Penaeus monodon</i> (PSCh) P	0.24 ± 0.07	7.5	2134 ± 75	0.67	muscle	Tu et al., 2009
<i>Penaeus monodon</i> (BSCh) B	0.05 ± 0.02	1.56	2011 ± 55	0.63	muscle	Tu et al., 2009
<i>Metapenaeus monocerus</i> (ASCh) A	-	-	123.0 ± 1.9	-	thoracic ganglion	Reddy et al., 1990
<i>Palaemonetes intermedius</i> (ASCh) A	-	-	56.50	-	whole body	Key et al., 2003
<i>Palaemonetes pugio</i> (ASCh) A	-	-	59.21	-	whole body	Key et al., 2003
<i>Macrobrachium malcolmsonii</i> (ACh) A	-	-	181.33 ± 10.55	-	brain	Bhavan and Geraldine, 2001
<i>Macrobrachium malcolmsonii</i> (ACh) A	-	-	12.93 ± 1.98	-	hepatopancreas	Bhavan and Geraldine, 2001
<i>Macrobrachium malcolmsonii</i> (ACh) A	-	-	47.13 ± 9.06	-	gills	Bhavan and Geraldine, 2001
<i>Macrobrachium malcolmsonii</i> (ACh) A	-	-	73.95 ± 10.51	-	muscle	Bhavan and Geraldine, 2001

ASCh – acetylthiocholine; BSCh – S-butyrylthiocholine; PSCh – propionylthiocholine; k_m ratio and V_{max} ratio = B/A or P/A; – no activity.

The ChEs activities of *L. vannamei* muscle and eye were strongly inhibited by the AChE specific inhibitor BW284c51 whereas they were weakly inhibited by the BChE inhibitor Iso-OMPA (Figures 5A-B and 6A-B and Table 3). The enzyme from *L. vannamei* hepatopancreas was not inhibited by BW284c51 and was strongly inhibited by Iso-OMPA (Figure 7A-B and Table 3). The total ChEs inhibitor eserine inhibited the enzymes from the three tissues evidencing that all of them are cholinesterases (Figures 5C, 6C and 7C).

In addition, according to the definitions of k_m ratio and V_{max} ratio, the PChE activities found in eye may be ascribed to AChE, since its k_m ratio was > 1 and V_{max} ratio was < 1 . Occurred the same with the BChE activity of hepatopancreas (k_m ratio was > 1 and V_{max} ratio was < 1), however it was not strongly inhibited by BW284c51 while it was profoundly inhibited by Iso-OMPA (Table 2 and Table 3) (PEZZEMENTI et al., 1991; RODRÍGUEZ-FUENTES and GOLD-BOUCHOT, 2004).

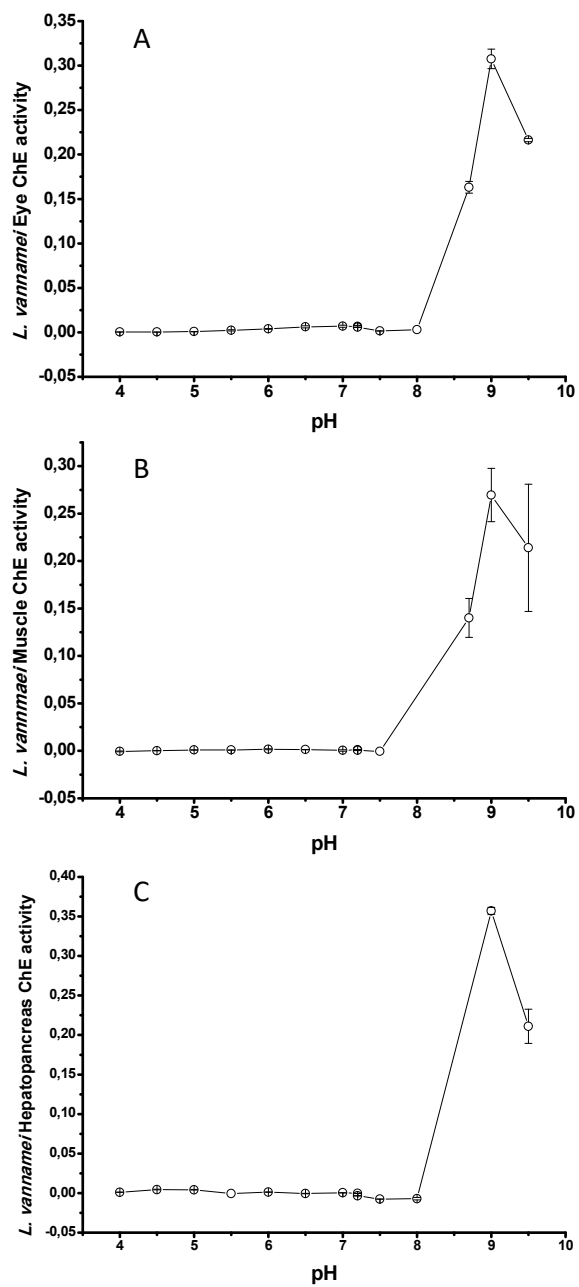


Figure 3. Optimum pH of *L. vannamei* ChEs from three tissues: (A) eyes; (B) muscle; (C) hepatopancreas. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

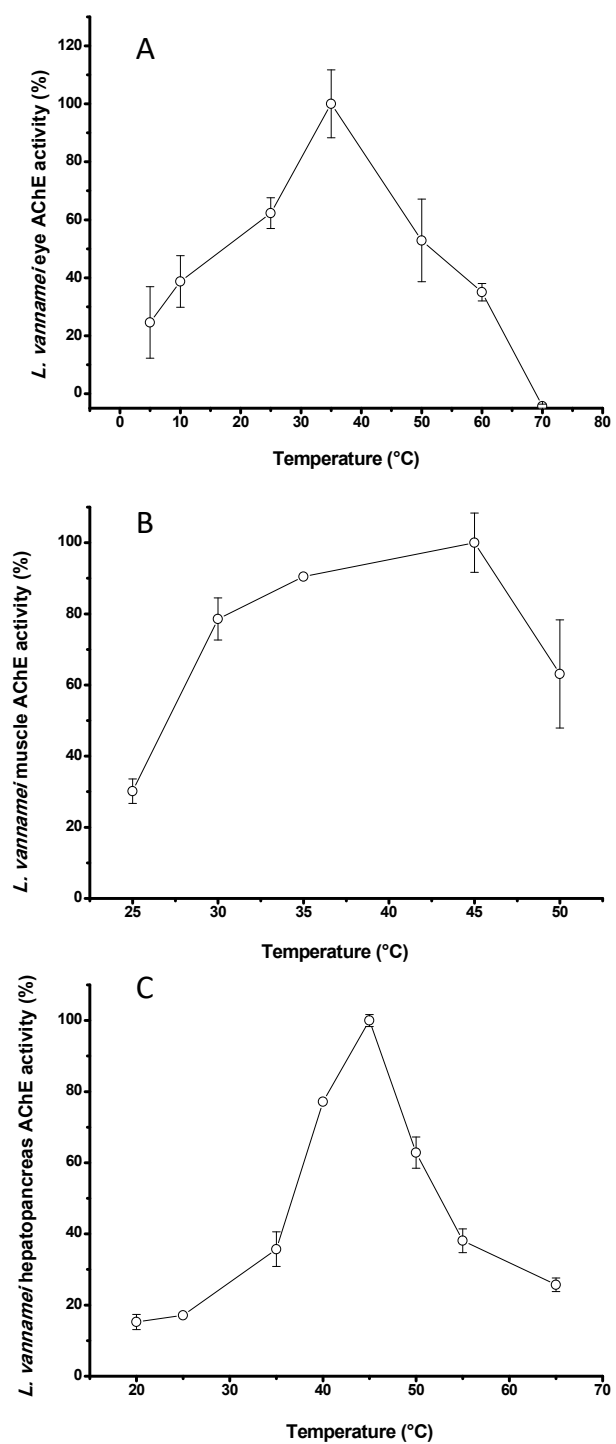


Figure 4. Optimal temperatures of *L. vannamei* ChEs from three tissues: (A) eyes; (B) muscle; (C) hepatopancreas. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

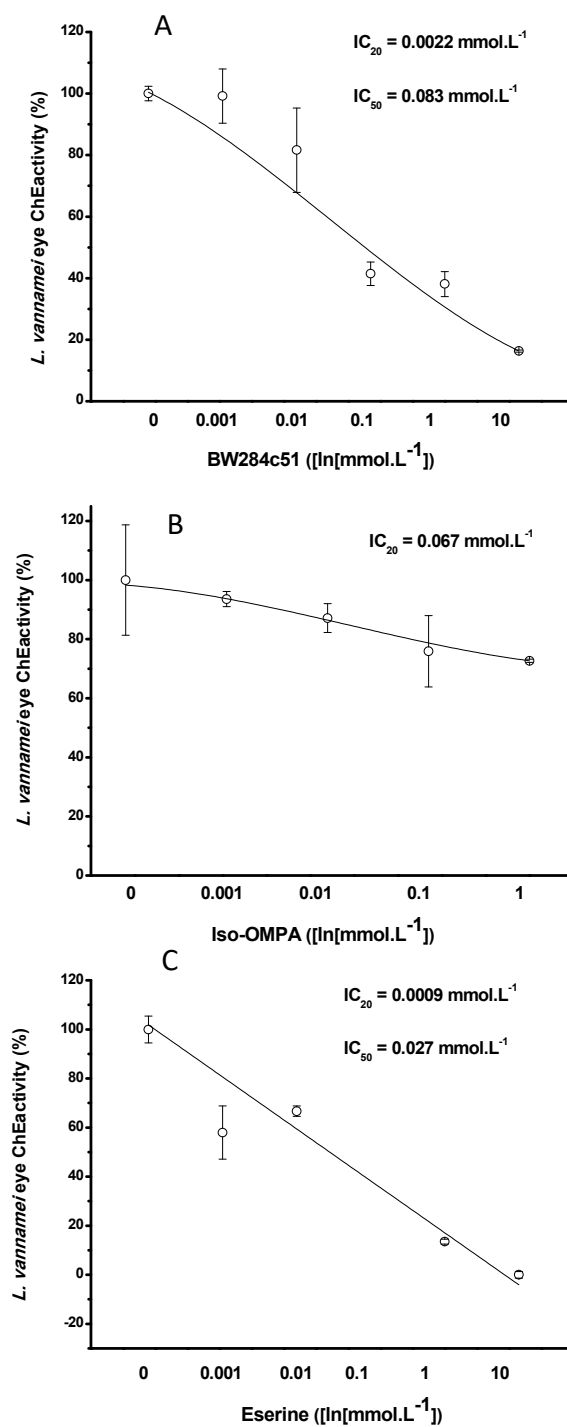


Figure 5. Effect of selective inhibitors on *L. vannamei* eye ChE activity. (A) – BW284c51; (B) – Iso-OMPA; (C) – Eserine. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

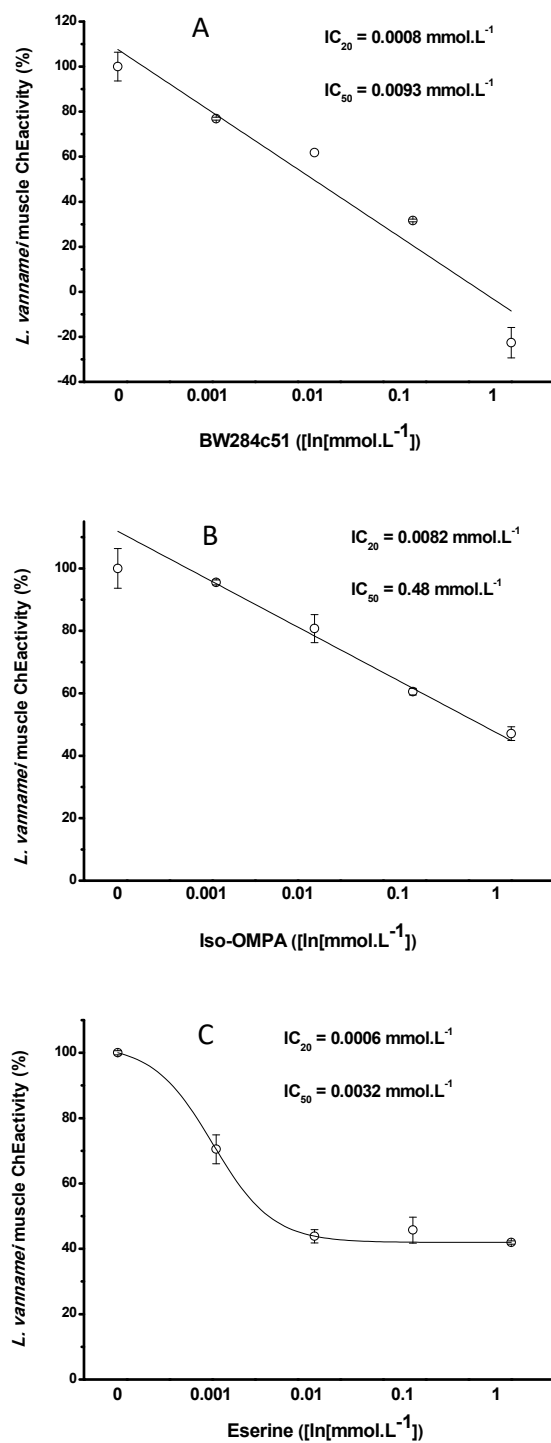


Figure 6. Effect of selective inhibitors on *L. vannamei* muscle ChE activity. (A) – BW284c51; (B) – Iso-OMPA; (C) – Eserine. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

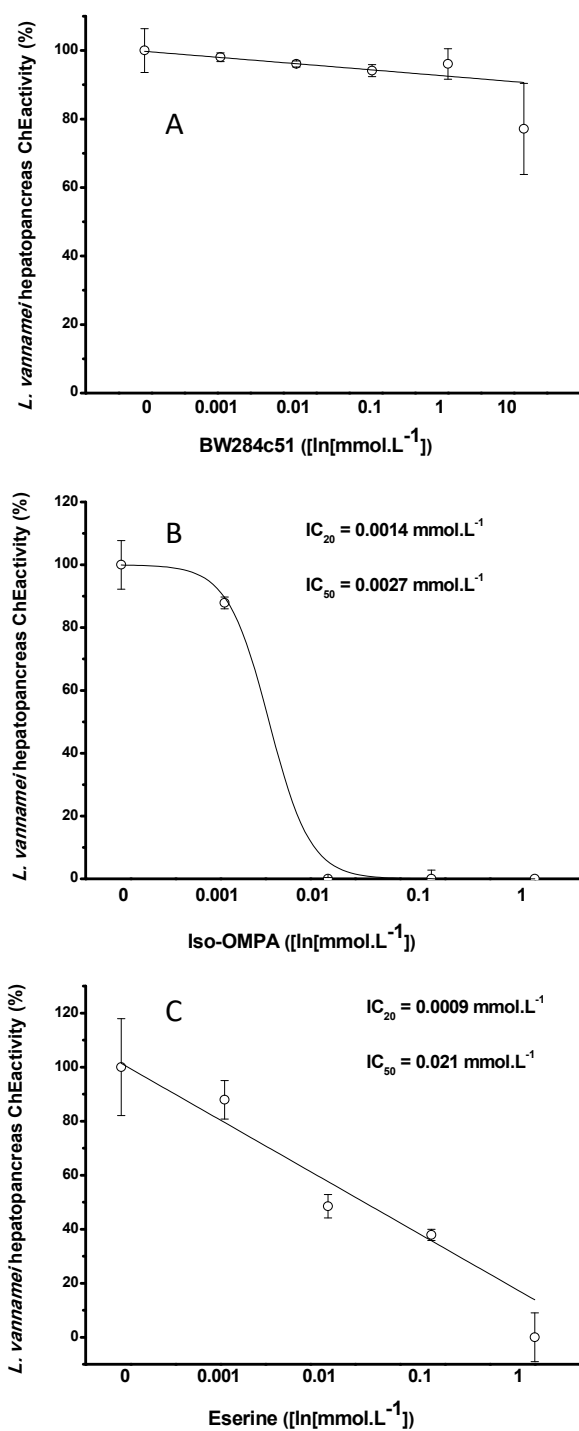


Figure 7. Effect of selective inhibitors on *L. vannamei* hepatopancreas ChE activity. (A) – BW284c51; (B) – Iso-OMPA; (C) – Eserine. Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

Exposure of the enzymes of the three tissues (eye, muscle and hepatopancreas) to pesticides, of the following classes, were performed: carbamates (CBs) - aldicarb, carbaryl and carbofuran (Figure 8A-8C); organophosphates (OPs) – chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, methyl-parathion and temephos (Figure 9A-9C), Benzoylureas and juvenile hormone analogs (JHA) – diflubenzuron, novaluron and pyriproxyfen (Figure 10A-10C). The IC₅₀ values for the ChEs of *L. vannamei* exposed to pesticides showed sensitivity in the following decreasing order: carbofuran > carbaryl > dichlorvos > diazinon > aldicarb > diflubenzuron > temephos > pyriproxyfen > methyl-parathion > chlorpyrifos > novaluron (**eye**); temephos > aldicarb > pyriproxyfen > novaluron > dichlorvos > diflubenzuron > diazinon > chlorpyrifos > methyl-parathion > carbofuran > carbaryl (**muscle**); aldicarb > chlorpyrifos > temephos > carbofuran > methyl-parathion > diazinon > pyriproxifen > diflubenzuron (**hepatopancreas**) (Tabela 4).

Table 3. Comparison between the IC₅₀ values estimated for *L. vannamei* AChE in the presence of selective inhibitors.

Inhibitor	Eye		Muscle
	Hepatopancreas		
	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)		
BW284c51	83	9.3	-
Iso-OMPA	-	480	2.7
Eserine	27	3.2	21

The carbamate carbofuran exerted the most inhibitory effect on AChE from *L. vannamei* eye. CBs pesticides do not need biotransformation to achieve their full inhibitory power (WHO, 1986b; Tham et al., 2009; Assis et al., 2012). Due to the ramifications of its dimethyl benzofuranyl ring, carbofuran interacts strongly with residues in the active site of AChE (Metcalf, 1971). Several ChEs from aquatic organisms showed to be extremely sensitive to carbofuran (Souza et al., 2018; Araújo et al., 2018; Lopes et al., 2019). Here, aldicarb was the strongest inhibitor for the BChE from *L. vannamei* hepatopancreas. Besides the intrinsic inhibitory power of aldicarb it also forms sulfone and sulfoxide derivatives highly toxic (Risher et al., 1987; Perkins and Schlenk, 2000; Araújo et al., 2018). The CB carbaryl strongly inhibited the AChE from eye while was weakly inhibitory in relation to AChE from muscle due to the lower

reactivity of the naphthyl ring in the active site of the enzyme (Metcalf, 1971; WHO, 1986b; Lopes et al., 2019). Figure 8A-8C shows the effect of CB pesticides on the activity of the ChEs under study.

In the present study, temephos was the strongest inhibitor of *L. vannamei* muscle AChE. Recently, this pesticide was widely used in public health campaign against vectors of infectious diseases due to its strong inhibitory action on the AChE activity from arthropods, mainly crustaceans (WHO, 1986a). The use of temephos has caused the development of resistance by target organisms and methodologies are being tested to recover its lethal potential (Porretta et al., 2008; Melo-Santos et al., 2010; Lima et al., 2014). Temephos is from the OP subclass of organophosphorothioates (thio form; P=S) which require biotransformation to achieve their full irreversible inhibitory potential, as well as chlorpyrifos, diazinon and methyl-parathion (Vale, 1998; Assis et al., 2012; Araújo et al., 2018). Although dichlorvos belongs to the OP subclass of organophosphates (oxo form; P=O) and does not need biotransformation it did not showed an inhibitory power similar to that against ChEs from several aquatic organisms (Assis et al., 2012). The effect of OPs pesticides on the enzymes of *L. vannamei* are shown in Figure 9A-9C.

The benzoylureas diflubenzuron and novaluron did not inhibit strongly any ChEs of *L. vannamei* (Figure 10A-10C). Souza et al. (2018) and Araújo et al. (2018) reported inhibition of AChE from the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* and from the armored catfish *Hoplosternum littorale*, respectively, by these benzoylureas. The interference of benzoylureas on the active site of ChEs includes disruption in the conformation of the active site gorge by steric hindrance and dynamic inhibition (Cottage and Gunning, 2004). The only *L. vannamei* ChE strongly inhibited by the juvenile hormone analog (JHA) pyriproxyfen was the one from muscle (Figure 10B). This pesticide disrupts the insect growth by hindering the signaling of the juvenile hormone (Dhadialla et al., 1998; Hirano et al., 1998). However, AChEs from other species of aquatic organisms were also affected by this pesticide (Araújo et al., 2018; Azevedo et al., 2021).

The comparison between the values of IC₂₀ and IC₅₀ related to the exposure of ChEs from *L. vannamei* tissues to the pesticides under study are demonstrated in Table 4. Twenty percent of inhibition of the ChE activity is the lowest inhibition limit for the presence of anticholinesterasic compounds in a given sample (FAO, 2007). Some of the IC₂₀ values of *L. vannamei* ChEs activities are below the limit recommended in current

regulation. The maximum concentration limit (MCL) of OPs pesticides recommended by the Brazilian National Council of Environment, Resolution no. 357/2005 (CONAMA, 2005) for Class 3 waters (irrigation and secondary contact, animal watering after mild treatment) (in methyl-parathion equivalents: $37 \mu\text{g.L}^{-1} \approx 1.66 \mu\text{mol.L}^{-1}$), the *L. vannamei* eye AChE showed potential as biomarker of the exposure to dichlorvos and diazinon whereas for the enzymes of the other tissues presented potential as biomarker for dichlorvos and temephos (muscle) and chlorpyrifos and temephos (hepatopancreas), since their respective IC_{20} values (Table 4) were below the MCL proposed, evidencing the high sensitivity of these enzymes to such pesticides.

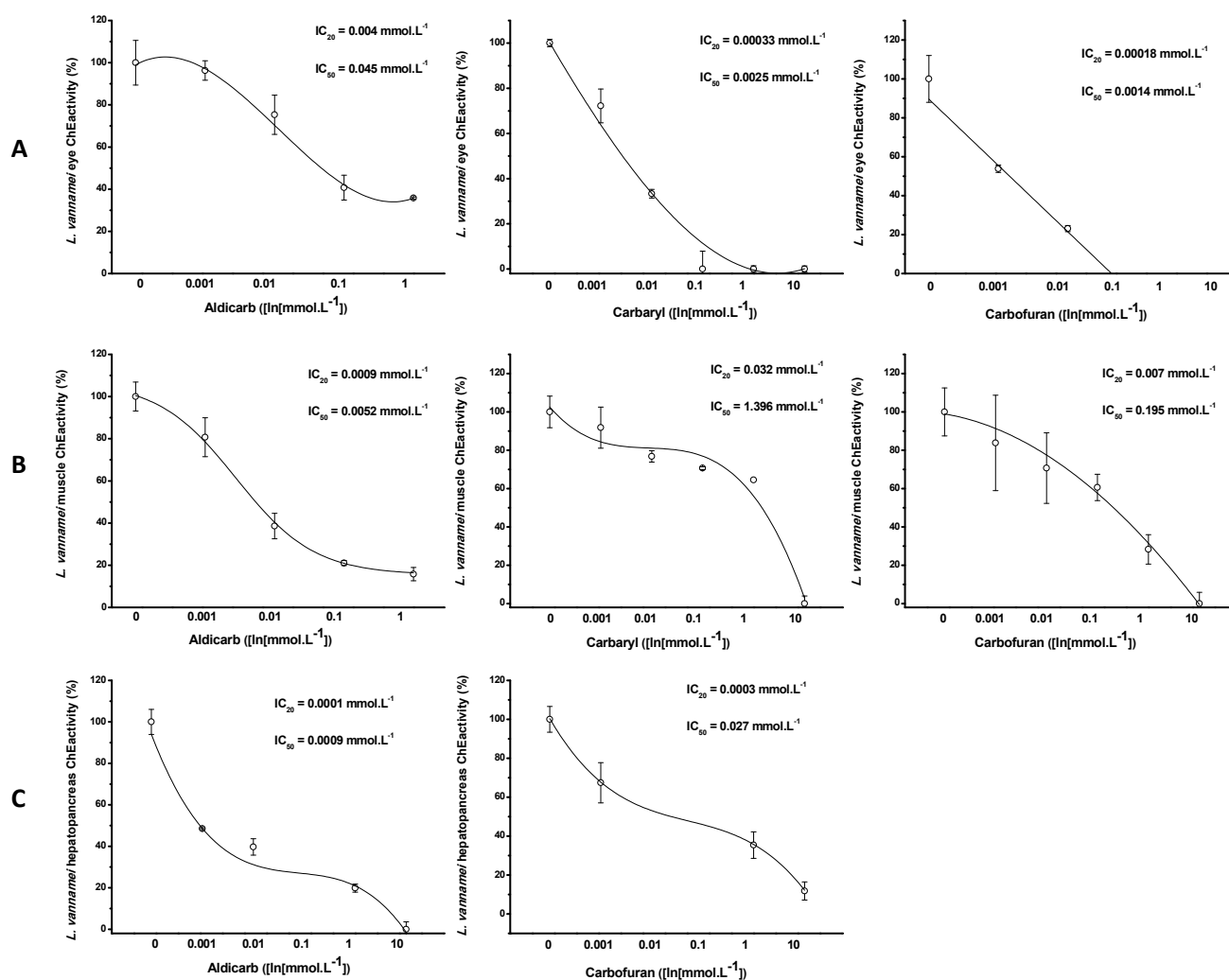


Figure 8. Effect of carbamate pesticides on *L. vannamei* ChEs activities from three tissues. (A) – Eye; (B) – Muscle; (C) – Hepatopancreas. Pesticides in the following order (left to right): aldicarb, carbaryl and carbofuran (Excepting for hepatopancreas: aldicarb, carbofuran); Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

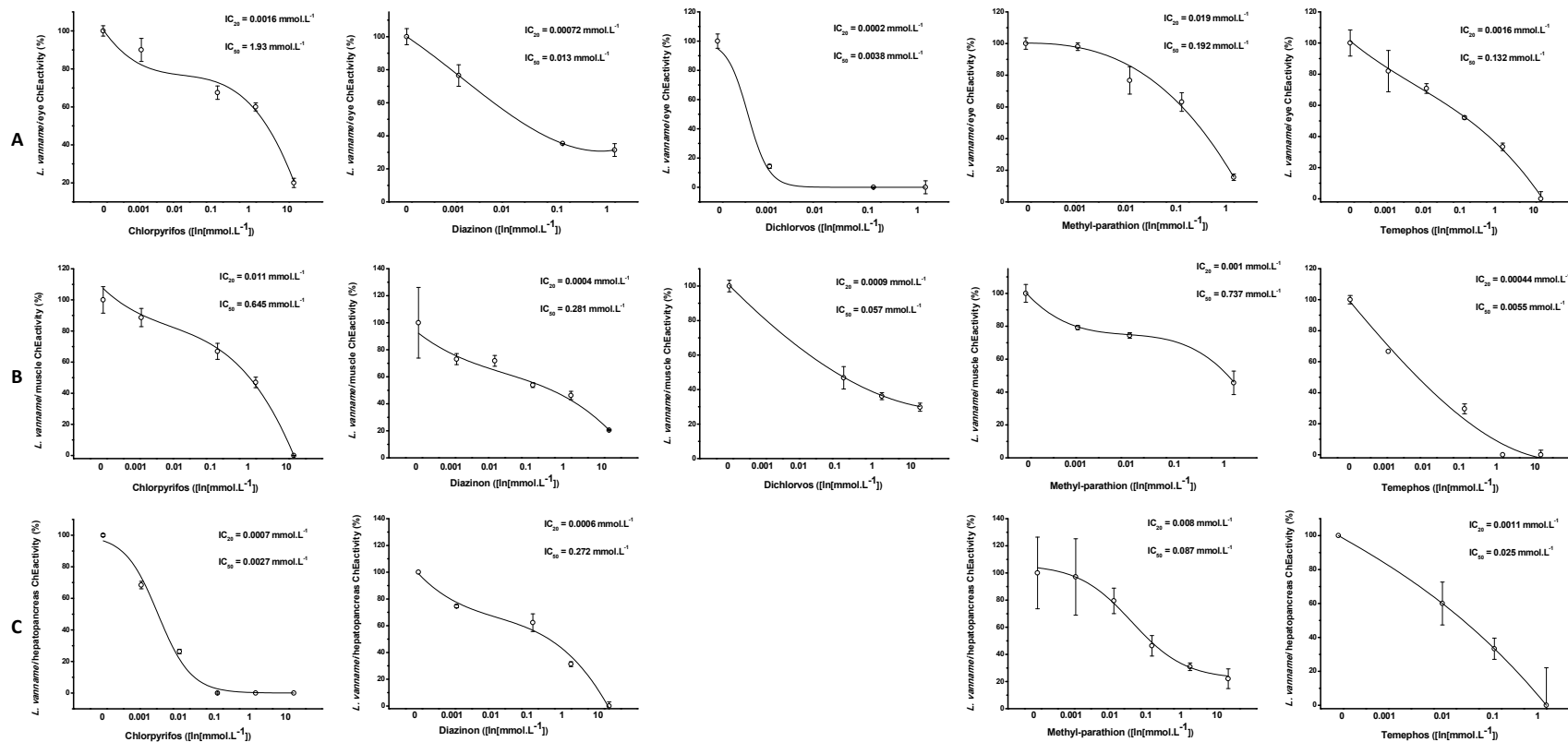


Figure 9. Effect of organophosphorus pesticides on *L. vannamei* ChEs activities from three tissues. (A) – Eye; (B) – Muscle; (C) – Hepatopancreas. Pesticides in the following order (left to right): chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, methyl-parathion and temephos (dichlorvos not assayed for hepatopancreas); Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

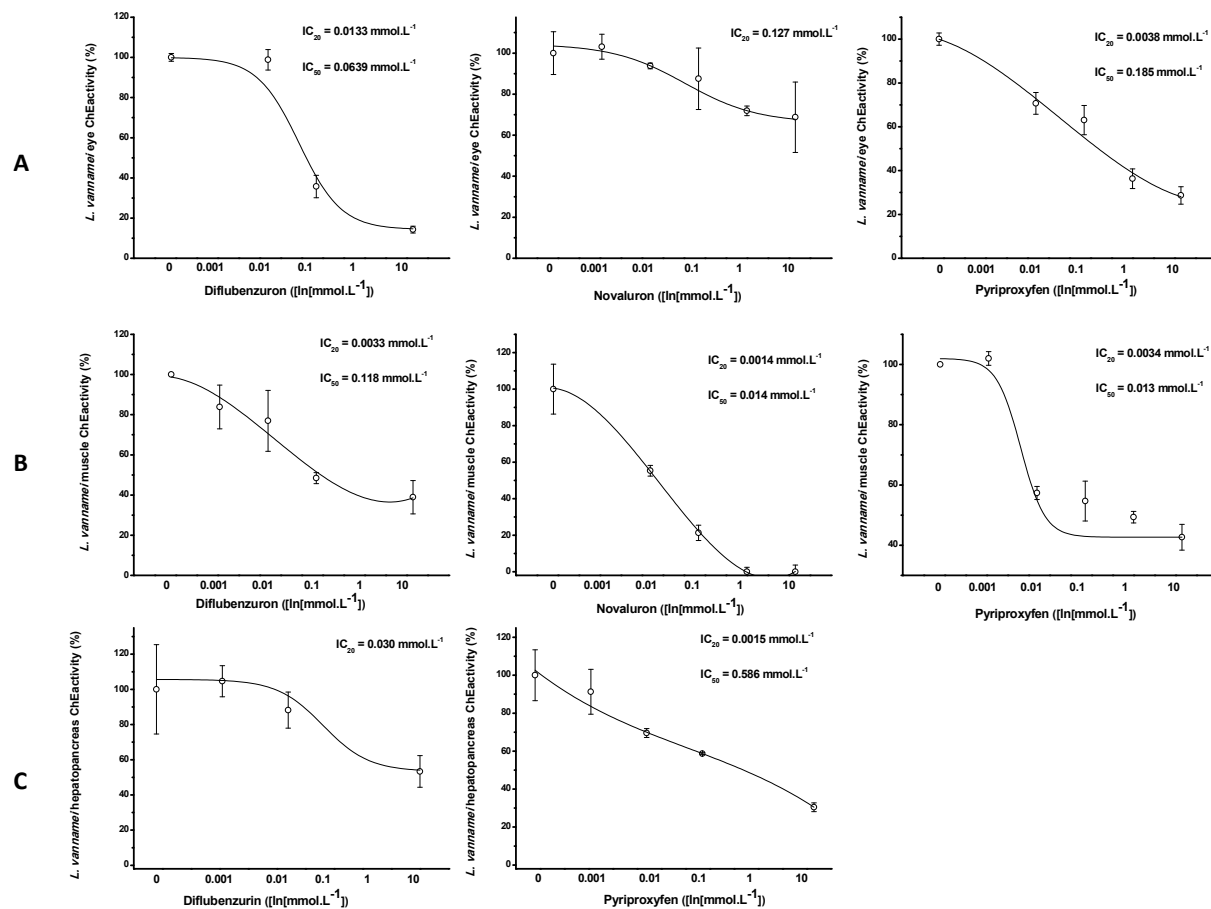


Figure 10. Effect of benzoylureas and JHA pesticides on *L. vannamei* ChEs activities from three tissues. (A) – Eye; (B) – Muscle; (C) – Hepatopancreas. Pesticides in the following order (left to right): diflubenzuron, novaluron and pyriproxyfen (excepting for hepatopancreas: diflubenzuron and pyriproxyfen); Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

Table 4. Comparison between estimates of IC₂₀ and IC₅₀ of *L.vannamei* ChEs from three tissues of in the presence of organophosphorus, carbamate, benzoylurea, pyrethroid and JHA pesticides.

Pesticide	Eye	Muscle	Hepatopancreas
	IC ₂₀ (IC ₅₀) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC ₂₀ (IC ₅₀) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC ₂₀ (IC ₅₀) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
aldicarb	4.0 (45.0)	0.9 (5.2)	0.1 (0.9)
carbofuran	0.18 (1.4)	7.0 (1,190)	0.3 (27.0)
carbaryl	0.3 (2.5)	32.0 (1,390)	- (-)
dichlorvos	0.2 (3.8)	0.9 (57.0)	- (-)
diazinon	0.7 (13.0)	0.4 (281.0)	0.6 (272.0)
chlorpyrifos	1.6 (1,930)	11.0 (645.0)	0.7 (2.7)
methyl-parathion	19.0 (192.0)	1.0 (737.0)	8.0 (87.0)
temephos	1.6 (132.0)	0.44 (5.0)	1.1 (25.0)
diflubenzuron	13.3 (63.0)	3.3 (118.0)	30.0 (-)
novaluron	127.0 (-)	1.4 (14.0)	- (-)
pyriproxyfen	3.8 (185.0)	3.4 (13.0)	1.5 (586.0)

(-) not observed in the concentration range.

The effect of metal ions on the activity of ChEs of aquatic organisms have been reported to exert their effects on peripheral sites causing conformational changes affecting the hydration state of the active site of the enzyme (Olson and Christensen, 1980; Tomlinson et al., 1981; Hughes and Bennet, 1985; Frasco et al., 2005, 2007; Assis et al., 2015). The effect of metal ions on ChEs from all species should be taken into account in the analysis of OPs, CBs and other anticholinesterase agents since these ions may interfere in the analysis of pesticides, when ChEs are used as a biomarker (Assis et al., 2015).

L. vannamei ChEs sensitivity to metal ions was evaluated with the following ions: mercury (Hg^{2+}), cadmium (Cd^{2+}), lead (Pb^{2+}), arsenic (As^{3+}), copper (Cu^{2+}) and zinc (Zn^{2+}). The IC₅₀ values for ChEs of *L. vannamei* showed inhibitory power of metals in the following decreasing order: $\text{As}^{3+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ (**eye**); $\text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cd}^{2+}$ (**muscle**); $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cu}^{2+}$ (**hepatopancreas**) (Figure 11A-11C). Table 5 summarizes the inhibition parameters related to the exposure to the metal ions under study.

These results confirmed the findings of Assis et al. (2015) and Tomlinson et al. (1981) that pointed Hg^{2+} , Pb^{2+} and As^{3+} as the main inhibitory ions against ChEs. The Resolution no. 357/2005 of the Brazilian National Environment Council (CONAMA, 2005) recommends a maximum concentration of $1.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($\approx 0.009 \mu\text{mol.L}^{-1}$) of Hg^{2+} in Class 2 (human consumption after conventional treatment) freshwater/brackish waters to avoid damage to aquatic biota. Moreover, the maximum concentration recommended by the Federal-Provincial-Territorial Committee on Health and the Environment of Canada (Health Canada, 2017) for mercury maximum concentration limit in drinking water is $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($\approx 0.005 \mu\text{mol.L}^{-1}$) and the limit established by the National Primary Drinking Water Standards is $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($\approx 0.01 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (USEPA, 2009). Therefore, according to all the IC_{20} values (eye, muscle and hepatopancreas) of Hg^{2+} in the present study (Table 5) the *L. vannamei* ChEs only could be used as *in vitro* biomarker in the context of Hg^{2+} concentrations exceeding the limits. Similar situation was observed for Cd^{2+} and Pb^{2+} since their inhibitory effects on *L. vannamei* ChE were moderate to and not conclusive to propose this enzyme as biomarker of their exposure (Table 5).

The IC_{20} value related to As^{3+} for *L. vannamei* eye AChE was $0.58 \mu\text{mol.L}^{-1}$, which is below the limits recommended by CONAMA Resolution no. 357/2005 for the concentration of this ion in Class 2 brackish waters ($69 \mu\text{g.L}^{-1} \approx 0.92 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Therefore, the enzyme from eye may be proposed as *in vitro* biomarker of this metal ion.

Copper and zinc showed to be weak inhibitors of AChE in the concentration range assessed in the present study. However, the IC_{20} of Zn^{2+} for *L. vannamei* muscle enzyme was below (Table 5) the maximum limit proposed by the USEPA National Secondary Drinking Water Standards ($5000 \mu\text{g.L}^{-1} \approx 76.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (USEPA, 2009) so that this enzyme may be a potential biomarker in areas affected by effluents with high concentrations of Zn^{2+} . Moreover, the IC_{20} values related to AChE from muscle and BChE from hepatopancreas exposed to Cu^{2+} were very low (Table 5) and the sensitivity of these enzymes was very suitable as biomarker according to the limit of concentration established by CONAMA 357/2005 for class 2 brackish waters ($122.75 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Table 5 – Inhibition parameters related to ions that exert significant inhibitory effect on ChEs of three tissues of *L. vannamei*.

Tissues Metal ions	Eye		Muscle		Hepatopancreas	
	IC ₂₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC ₂₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC ₂₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Cd²⁺	4.1	23.5	30.4	370.9	nd	nd
Cu²⁺	1,360	4,340	63.7	-	9.0	1,130
Hg²⁺	61.4	246.1	17.4	58.4	0.7	4.1
Zn²⁺	nd	nd	9.6	-	303.0	-
Pb²⁺	46.8	179.6	14.5	41.0	4.1	16.6
As³⁺	0.58	6.00	24.1	4,590	6.0	64.0

Nd – not determined; (-) not observed in the concentration range.

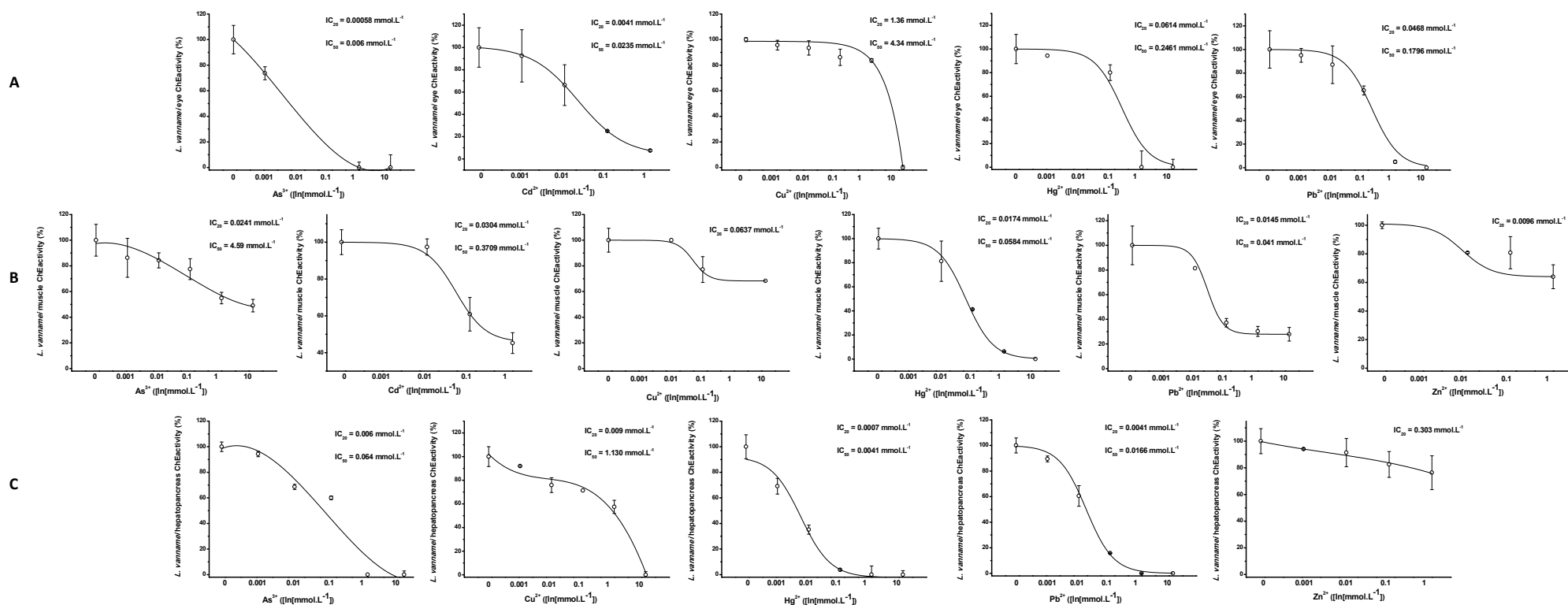


Figure 11. Effect of metal ions on *L. vannamei* ChEs activities from three tissues. (A) – Eye; (B) – Muscle; (C) – Hepatopancreas. Metal ions in the following order (left to right): As^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} (excepting for eyes: absence of Zn^{2+} and hepatopancreas: absence of Cd^{2+}); Assays were performed in quadruplicate. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

The results of the monitoring of two shrimp farming environments based on AChE activity with samples of *L. vannamei*, did not indicate a significant difference ($p < 0.05$) between the sampling points (CERC and CERF). However, a large difference was observed when comparing the activities per tissue ($p < 0.05$). The enzyme from the eye did not show any inhibition whereas the enzymes from muscle and hepatopancreas were almost completely inhibited by an anticholinesterasic load present in both environments (Figure 12).

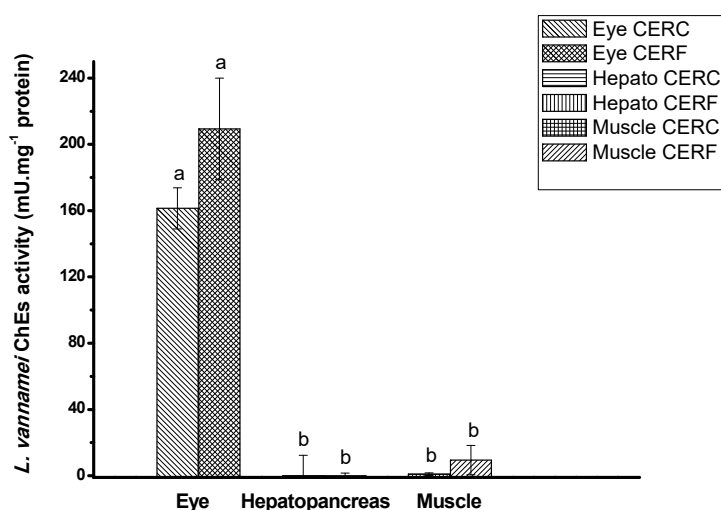


Figure 12. Comparison between ChE activities of three tissues of *L. vannamei* from two collection sites (estuarine complexes of Capibaribe and Formoso rivers: CERC and CERF, respectively). Assays were performed in quadruplicate. Data were expressed as mean $\pm$ SD and were analyzed by ANOVA followed by Tukey and Bonferroni tests ($p < 0.05$).

The differences found in metal concentrations (in sediment and in animals) between the collection sites (Table 6 and Table 7) showed to be not important to cause differences in the enzyme activities between the sites. However, other anticholinesterasic compounds not determined (such as pesticides) seems to have caused the strong inhibition observed in the AChE from muscle and BChE from hepatopancreas since the metal concentrations did not exceed the Probable Effect Limit

(PEL) in any collection site. Therefore, another class of inhibitors may be present in both environments and further studies are required to investigate these findings.

The results indicate that the enzyme activity reflected the presence of an anticholinesterasic load in both environments and is a promising biomarker with potential to describe the pollution status in a water body. Data on the reduction of *in vitro* AChE activity exposed to pesticides and metal ions, indicate that these classes of pollutants in estuarine environments are capable of causing neurotoxic damage to the shrimp *Litopenaeus vannamei* at sublethal concentrations.

Table 6. Metal concentrations (mg.kg⁻¹) in sediment from *L. vannamei* cultivation nurseries at the complex of Capibaribe river (CERC) and estuarine complex of Formoso river (CERF).

Collection site	Al	As	Cd	Pb	Cu	Cr	Mn	Hg	Ni
CERC	7358 ± 5781 a	0.69 ± 1.19 a	0.77± 0.21 a	15.3± 11.0a	17.2±3.20a	27.2±4.16a	58.3±4.60a	0.14±0.05 a	6.79±1.33a
CERF	1446 ± 850 a	1.10 ± 1.11 a	0.19 ± 0.17b	3.69± 1.20a	< LQ b	7.61±1.74b	11.9±5.64 b	0.03±0.00 b	0.76±1.32b
TEL/PEL	-	7.24/41.6	0.68/4.21	-	30.2/112	52.3/160	-	0.13/0.70	15.9/42.8

LQ – limit of quantification; TEL - Threshold Effect Limit; PEL - Probable Effect Limit

Table 7. Metal concentrations (mg.kg⁻¹) in *L. vannamei* shrimp from the complex of Capibaribe river (CERC) and estuarine complex of Formoso river (CERF).

Collection site	Al	As	Cd	Pb	Cu	Cr	Mn	Hg	Ni	Zn
CERC	39.27 ± 50.45 a	1.09 ± 1.24 a	<LD	0.08 ± 0.14 a	8.37 ± 7.69 b	0.08± 0.14b	0.28 ± 0.49 b	0.01 ± 0.01 a	<LD	12.92 ± 11.50 a
CERF	54.33 ± 45.75 a	0.35 ± 0.02 a	<LD	0.05 ± 0.05 a	22.93 ± 3.18 a	<LD a	1.38 ± 0.03 a	0.00 ± 0.01 a	<LD	13.93 ± 0.23 a
MAL		1.0*	0.50*	0.50*	20.0**	0.9**		0.50*		50.0**

MAL – maximum allowed limit; LD – limit of detection; RDC 42/2013*: As, Cd, Pb and Hg ; EPA (1996)**: Cu, Cr and Zn.

4 CONCLUSIONS

AChE was the predominant ChE in *L. vannamei* eye and muscle whereas BChE is the enzyme present in hepatopancreas. Physicochemical and kinetic properties of these enzymes were characterized as well as their optimal assay conditions were determined. Some pesticides inhibited the ChEs of *L. vannamei* in concentrations below the recommended limits present in national and international regulations. Dichlorvos and diazinon were the pesticides with the strongest inhibitory action on AChE from eye whereas dichlorvos and temephos were the most inhibitory for the muscle AChE. Chlorpyrifos and temephos exerted the strongest effect on BChE from hepatopancreas. Therefore, the ChEs of *L. vannamei* presents potential to be used as *in vitro* biomarkers of exposure to these pesticides as well as arsenic, zinc and copper in environmental samples of Class 2 brackish water.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for financial support by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant no. PQ xxxxxx/2018-x], Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) [Grant no. CHAMADA PÚBLICA MCT/FINEP/AT – CARCINICULTURA 09/2010 Ref.: 1560/10] and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Grant no. PNP20130477 - 25001019034P2 - PNP2 - UFPE/Oceanografia and 88887.175810/2018-00]. Their gratitude also goes to the Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP) and to the Post-Graduation Programs in Biological Sciences (PPGCB) and Oceanography (PPGO) of UFPE.

5 REFERENCES

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. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): from physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**. v177, p 182–189, 2016.

ARAÚJO, G. F. Modelagem de fontes de matéria orgânica para bivalves e sua contaminação por organoclorados no sistema estuarino do Rio Capibaribe, Pernambuco. Dissertação (Mestrado). Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2018. 94 p.

ASSIS, C.R.D.; LINHARES, A.G.; OLIVEIRA, V.M.; FRANÇA, R.C.P.; MACIEL CARVALHO, E.V.M.; BEZERRA, R.S.; CARVALHO JR, L.B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of the Total Environment**. v. 441, p. 141–150, 2012.

ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., OLIVEIRA, V.M., FRANC, A, R.C.P., SANTOS, J.F., MACIEL CARVALHO, E.V.M., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR., L.B. Effect of ions on the activity of brain acetylcholinesterase from tropical FSH. **Journal of Coastal Life Medicine**. p 505-514, 2015.

BHAVAN, P.S., GERALDINE, P. Biochemical Stress Responses in Tissues of the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on Exposure to Endosulfan. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 70, 27–41, 2001.

BOCQUENÉ, G., GALGANI, F., TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Mar. Environ. Res.** V 30 (2), p 75–89, 1990.

BOYD, C.E. A qualidade da água para aquicultura de viveiros. In: BOYD, C.E. (Ed.) Manejo da qualidade da água na aquicultura e no cultivo de camarão. Recife: Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC, p. 87-158, 2000.

BOYD, C.E. 2018. Dissolved oxygen dynamics. Global Aquaculture Advocate. <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/category/health-and-welfare/>

CPRH. COMPANHIA PERNAMBUCANA DE MEIO AMBIENTE. Plano de gestão, Zoneamento Ecológico Econômico Costeiro – ZEEC – APA de Guadalupe, Litoral Sul de Pernambuco. Recife: CPRH, 1998. 60 p.

GARCÍA-DE LA PARRA, L.M., BAUTISTA-COVARRUBIAS, J.C., RIVERA-DE LA ROSA, N., BETANCOURT-LOZANO, M., GUILHERMINO, L. Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 65, 372–380, 2006.

KEY, P.B., FULTON, M.H., HARMAN-FETCHO, J.A., MCCONNELL, L.L. Acetylcholinesterase Activity in Grass Shrimp and Aqueous Pesticide Levels from South Florida Drainage Canals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 45, 371–377, 2003.

LOMBARDI, A.T.; FERNANDEZ, M. Ecotoxicologia. In: BAPTISTA NETO, J. A. et al. Poluição marinha. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Parte V, Cap. 14, p.369-392

LIONETTO, M.G., CARICATO, R., CALISI, A., GIORDANO, M.E., SCHETTINO, T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **Biomed Research international**. 8 p, 2013.

MACPHEE-QUIGLEY, K., VEDVICK, T.S., TAYLOR, P., TAYLOR, S.S. Profile of the disulfide bonds in acetylcholinesterase. **Journal of Biological Chemistry**. 261, 13565-13570, 1986.

PALOMARES, M.L.D., PAULY, D. Editors. 2020. SeaLifeBase. World Wide Web electronic publication. www.sealifebase.org, version (07/2020).

REDDY, M.S., RAO, K.V.R., Methyl parathion-induced alterations in the acetylcholinesterase and phosphatases in a Penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 45, 350-357, 1990.

SAAD, L.O; CUNHA, C.G; COLPO, K.D. How mollusk assemblages respond to different urbanization levels: characterization of the malacofauna in subtropical Brazilian mangroves. **Marine Biodiversity**, 49:989–999, 2019.

SAOUD, I.P., DAVIS, D.A., ROUSE, D.B. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. **Aquaculture**. 217, 373-383, 2003.

TU, H.T., SILVESTRE, F., SCIPPO, M.-L., THOME, J.-P., PHUONG, N.T., KESTEMONT, P. Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 72, 1463–1470, 2009.

VAN WYK, P.; SCARPA, J. Water quality requirements and management. In: VAN WYK, P.; DAVIS-HODGKINS, M.; LARAMORE, R.; MAIN, K. L.; MOUNTAIN, J.; SCARPA, J. (eds). **Cultivando camarão marinho em sistemas de recirculação de água doce**. 1. ed. Flórida: Departamento de Agricultura e Serviços ao Consumidor da Flórida - Harbor Branch Oceanic Institute, 1999.

WEBSTER, L., ROOSE, P., BERSUDER, B., KOTTERMAN, M., HAARICH, M., VORKAMP, K., Determination of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediment and biota. **ICESTech. Mar. Environ. Sci.** V 53, p 18, 2013.

YUAN, W.; WALTERS, L.J.; SCHNEIDER, K.R.; HOFFMAN, E.A. Exploring the survival threshold: a study of salinity tolerance of the nonnative mussel *Mytella charruana*. **Journal of Shellfish Research**. v 29, p 415–422, 2010.

ZANARDI-LAMARDO, E.; NÓBREGA, A. S. DE C.; SANTOS, R. H. DE A.; MACIEL, D. C. Fontes e níveis de contaminação do sistema estuarino do rio Capibaribe (Pernambuco/Brasil). **Tropical oceanography**. vol. 44 n.2, p.118-131, 2016.

ZHANG, P., ZHANG, X., LI, J., HUANG, G. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture**. 256, 579–587, 2006.

5 CONCLUSÕES GERAIS DA TESE

Sazonalmente fatores de estresse ambiental no SERC ocasionam declínio na qualidade da água, em níveis críticos de oxigênio dissolvido e salinidade para sobrevivência do *M. charruana*. Os metais traços no sedimento tornam-se mais elevados no período seco e as concentrações de mercúrio (Hg) e cobre (Cu) estiveram acima dos limites TEL e ERL em 90% das amostras, indicando maior possibilidade de efeitos adversos aos organismos por estes contaminantes no verão, porém não houve bioacumulação de metais para os tecidos de *M. charruana* a partir da contaminação no sedimento. A variação sazonal não influenciou nas concentrações dos compostos organoclorados e os únicos pesticidas encontrados nos bivalves foram os metabólitos do DDT, indicando que a introdução desse contaminante no estuário do Capibaribe não é recente. O inseticida piretroide, cipermetrina, foi encontrado em apenas uma amostra do bivalve e indicam presença do composto em esgotos domésticos sem tratamento lançados ao SERC. AChE foi o ChE predominante em *M. charruana* e o pesticida temefós apresentou maior ação inibitória nos testes in vitro, mesmo em concentrações muito baixas, seguido do aldicarbe e do diflubenzuron, porém estes pesticidas não foram encontrados nos tecidos dos espécimes de *M. charruana* capturados no estuário. A AChE de *M. charruana* foi caracterizada e mostrou potencial como biomarcador de pesticidas e íons metálicos em estuários. Menor percentual da atividade da enzima no período seco, reforça os possíveis efeitos adversos aos organismos por metais no verão. As concentrações de metais traços e compostos organoclorados no tecido comestível do sururu *M. charruana* foi inferior aos limites críticos estabelecidos por regulamentações nacionais e internacionais, indicando que é seguro o consumo humano do molusco oriundo do estuário do Rio Capibaribe.

REFERÊNCIAS

- ABEL, P.D. **Water Pollution Biology**. Chichester, UK: Ellis Horwood, 1989.
- ADESUYI, Adeola Alex; NJOKU, Kelechi Longinus; AKINOLA, Modupe Olatunde. Assessment of Heavy Metals Pollution in Soils and Vegetation around Selected Industries in Lagos State, Nigeria. **Journal Of Geoscience And Environment Protection**, [S.L.], v. 3, n. 7, p. 1-1, 07 set. 2015.
- AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE. **Relatório de monitoramento da qualidade da água de bacias hidrográficas do estado de Pernambuco em 2018**. Recife, CPRH, 2020, 141p. Disponível em: www.cprh.gov.pe.br. Acesso em: 17 out. 2020.
- AHEARN G. A.; MANDAL P. K.; MANDAL A. Mecanismos de sequestro e desintoxicação de metais pesados em crustáceos: uma revisão. **Journal of comparative physiology B**, v 174, n. 6. p. 439-452. 2004.
- ALFONSO, Lorenzo-Flores; GERMÁN, Giácoman Vallejos; CARMEN, Ponce Caballero María del; HOSSEIN, Ghoveisi. Adsorption of organophosphorus pesticides in tropical soils: the case of karst landscape of northwestern yucatan. **Chemosphere**, [S.L.], v. 166, p. 292-299, jan. 2017.
- ALONGI, Daniel M. The Impact of Climate Change on Mangrove Forests. **Current Climate Change Reports**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 30-39, 30 jan. 2015.
- ALONGI, Daniel M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 331-349, set. 2002.
- ALVES, S. R.; SILVA, J. J. O. Avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos. In.: Peres, F.; Moreira, J. C. (org.). **É veneno ou é remédio?: Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 137-156.
- AMAND, LST., GAGNON, R., PACKARD, TT. and SAVENKOFF, C., 1999. Effects of inorganic mercury on the respiration and the swimming activity of shrimp larvae, *Pandalus borealis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, vol. 122, p. 33-43

ANANDRAJ, A.; MARSHALL, D. J.; GREGORY, M. A.; MCCLURG, T. P. Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.L.], v. 132, n. 3, p. 355-363, jul. 2002.

ANDRAL, Bruno *et al.* Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 49, n. 9-10, p. 704-712, nov. 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Gestão 2005–2010: Principais realizações**. 1.ed. Brasília, 2010.

ARAÚJO, Gabriela Figueiroa de. **Modelagem de fontes de matéria orgânica para bivalves e sua contaminação por organoclorados no sistema estuarino do Rio Capibaribe, Pernambuco**. 2018. 94 f. Dissertação (Mestrado de oceanografia), Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

ASSIS, Caio Rodrigo Dias de. Effect of ions on the activity of brain acetylcholinesterase from tropical fish. **Journal Of Coastal Life Medicine**, [S.L.], v. 3, n. 7, p. 505-514, 19 jun. 2015.

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

ASTORGA-RODRÍGUEZ, Jesús Efrén *et al.* Lead and Cadmium Levels in Mussels and Fishes from Three Coastal Ecosystems of NW Mexico and Its Potential Risk due to Fish and Seafood Consumption. **Toxicology And Environmental Health Sciences**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 203-211, set. 2018.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological profile for cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA, 2012.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Priority List of Hazardous Substance and disease registry. Atlanta, GA: U.S. Department of Health an Human Services, 2016.

BABARRO, J. M. F.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J.; LABARTA, U. 2000. Comportamento alimentar do mexilhão-semente *Mytilus gallorprovincialis*: parâmetros ambientais e origem da semente. *Journal of Shellfish Research*. v. 19. 195–201 p., 2000.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. Tradução Marco Tadeu Grassi et al. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.

BAMBANG, Y.; THUET, P.; CHARMANTIERDAURES, M.; TRILLES, J.P.G.; CHARMANTIER. **Effect of copper on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Decapoda)** *Aquat. Toxicol.*, 33 (1995), pp. 125-139.

BAYEN, Stéphane. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: a review. **Environment International**, [S.L.], v. 48, p. 84-101, nov. 2012.

BEEBY, Alan. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 112, n. 2, p. 285-298, abr. 2001.

BEYER, Jonny *et al.* Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. **Marine Environmental Research**, [S.L.], v. 130, p. 338-365, set. 2017.

BENTO, E. S. Aspectos etnoecológicos da carcinicultura no parque dos manguezais e Ilha de Deus. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente)- Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2012, 187 f.

BINELLI, Andrea et al. DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 69, n. 2, p. 175-188, ago. 2004.

BOCQUENÉ, G., ROIG, A., FOURNIER, D. Cholinesterases from common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. **FEBS Letters**. 407, 261–266, 1997.

BONACCI, Stefano *et al.* Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 49, n. 5-6, p. 445-455, set. 2004.

BOYLE, E. *et al.* On the chemical mass-balance in estuaries. **Geochimica Et Cosmochimica Acta**, [S.L.], v. 38, n. 11, p. 1719-1728, nov. 1974.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. **Development of a National Implementation Plan in Brazil as a First Step to Implement the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs)**. Brasília: 2006. 46p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Inventário Nacional de Áreas Contaminadas por Poluentes Orgânicos Persistentes**. Brasília: 2015. 92 p.

BRIGGS, M. S. F.; SUBASINGHE, R.; PHILLIPS, M. Introduction and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Ásia and the Pacific. **Rap publication – fao**, Bangkok, n. 10, p. 92, 2004.

BRODSKY S.; WALTERS L. J.; HOFFMAN E.; SCHNEIDER K. Thermal tolerances of the invasive mussel *Mytella charruana*. In: **Proceedings of the Society for Integrative and Comparative Biology Annual Meeting**. Boston MA. 2009.

BUNCE, N. **Environmental chemistry**. 2. ed, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 376 p. 1999.

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P. A;

BERTOLETTI (Eds). **Ecotoxicologia Aquática**. São Carlos: Editora Rimma, 2006. p. 56-88.

CACECI, Thomas **et al.** Ultrastructure of the hepatopancreas of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea: decapoda). **Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom**, [S.L.], v. 68, n. 2, p. 323-337, maio 1988.

CCME. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life. **Protocol for the derivation of Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life**. [S.L.]: Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999. 35 p.

CHANG L. W.; MAGOS L.; SUZUKI T. (Edt). **Toxicology of Metals**. Boca Raton. FL, USA: CRC Press; 1996

CHATURVEDI, K.; KUMAR, A.; MISHRA, A. SYNTHESIS. Antibacterial and antifungal properties of novel organophosphorus compounds. **Der Pharma Chemica**. v. 6, n. 3, p 27-32, 2014.

CHEGGOUR, M.; CHAFIK, A.; FISHER, N. S.; BENBRAHIM, S. Metal concentrations in sediments and clams in four Moroccan estuaries. **Marine Environmental Research**, [S.L.], v. 59, n. 2, p. 119-137, mar. 2005.

CIDREIRA-NETO, Ivo Raposo Gonçalves; RODRIGUES, Gilberto Gonçalves. Racismo Ambiental e a Pesca Artesanal: o caso da ilha de deus, Pernambuco. Guaju **Revista Brasileira de Desenvolvimento Territorial Sustentável**, Matinhos - PR, v. 4, n. 2, p. 125-141, 18 dez. 2018.

COLOVIC MB, KRSTIC DZ, LAZAREVIC -PASTI TD, BONDZIC AM, VASIC VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(3):315 –35.

COOPER, Naomi L.; BIDWELL, Joseph R. Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 76, n. 3-4, p. 258-267, mar. 2006.

COTTAGE, E. L. A.; GUNNING, R. V. Buprofezin and novaluron inhibit acetylcholinesterase activity in B-biotype *Bemisia tabaci*. In: Silman, I., Soreq, H., Anglister, L., Michaelson, D., Fisher, A. (Eds.), **Cholinergic Mechanisms**. New York: CRC Press, 2007.

DAFFORN, Katherine A *et al*. The challenge of choosing environmental indicators of anthropogenic impacts in estuaries. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 163, p. 207-217, abr. 2012.

DALL, W.; MORIARTY, D. J. W. Functional aspects of nutrition and digestion. In: Mantel, L.H. (Ed.). The biology of crustacea. **Internal anatomy and physiological regulation**, vol. 5. New York: Academic Press, p. 215–261, 1983.

DAVID, José Augusto de Oliveira; FONTANETTI, Carmem S. The Role of Mucus in *Mytella falcata* (Orbigny 1842) Gills from Polluted Environments. **Water, Air, And Soil Pollution**, [S.L.], v. 203, n. 1-4, p. 261-266, 25 fev. 2009.

DAVIES, P. E.; COOK, L. S. J. Catastrophic macroinvertebrate drift and sublethal effects on brown trout, *Salmo trutta*, caused by cypermethrin spraying on a Tasmanian stream. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 27, n. 3-4, p. 201-224, dez. 1993.

DAVUTLUOGLU, Orkun I. et al. Heavy metal content and distribution in surface sediments of the Seyhan River, Turkey. **Journal Of Environmental Management**, [S.L.], v. 92, n. 9, p. 2250-2259, set. 2011.

DI GIULIO RT, HINTON DE. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group; 2008. 431–433 p

DIAS, Armando Cavalcante Franco **et al.** Abundance and Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in Anthropogenically Affected Brazilian Mangrove Sediments. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 78, n. 22, p. 7960-7967, 31 ago. 2012.

DUARTE-RESTREPO, Edison; JARAMILLO-COLORADO, Beatriz E.; DUARTE-JARAMILLO, Laura. Effects of chlorpyrifos on the crustacean *Litopenaeus vannamei*. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 1-2, 13 abr. 2020.

DURUIBE, J. O. **et al.** Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**, [S. L.], v. 2, n. 5, p. 112-118, mai 2007.

ECOBICHON D. J. Toxic effects of pesticides. In: Amdur MO, Donl J, Klassen CD, editors. **Casarett and Doull's toxicology**. 4. ed. New York: Pergamon Press. p. 2-18, 1991.

ERICKSON, M. D. **Analytical chemistry of PCBs**. 2 ed. New York: Lewis Publishers, 1997, 667 p.

ERSOY, Beyza; ÇELİK, Mehmet. Essential elements and contaminants in tissues of commercial pelagic fish from the Eastern Mediterranean Sea. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 89, n. 9, p. 1615-1621, jul. 2009.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world Fisheries and Aquaculture**. Rome, IT: FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2012.

FARRINGTON, John W. **et al.** Edward D. Goldberg's proposal of “the Mussel Watch”: reflections after 40 years. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 110, n. 1, p. 501-510, set. 2016.

FIKIRDEŞICI-ERGEN, Şeyda. Correlation profile of the heavy metal distribution in the *Pontastacus leptodactylus* tissues. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.L.], v. 92, n. 2, 2020.

FIRAT, Ö. **et al.** Concentrations of Cr, Cd, Cu, Zn and Fe in crab *Charybdis longicollis* and shrimp *Penaeus semisulcatus* from the Iskenderun Bay, Turkey. **Environmental Monitoring And Assessment**, [S.L.], v. 147, n. 1-3, p. 117-123, 20 dez. 2007.

GAINZA, Oreste; ROMERO, Jaime. Effect of mannan oligosaccharides on the microbiota and productivity parameters of *Litopenaeus vannamei* shrimp under intensive cultivation in Ecuador. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-12, 17 fev. 2020.

GALVÃO, Petrus Magnus Amaral **et al.** Bioacumulação de metais pesados em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal Of Aquatic Science And Technology**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 59-66, 18 fev. 2010.

GARCÍA-DE LA PARRA, L. M., BAUTISTA-COVARRUBIAS, J. C., RIVERA-DE LA ROSA, N., BETANCOURT-LOZANO, M., & GUILHERMINO, L. (2006). Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(3), 372–380.

GEORGE, S. G.; PIRIE, B. J. S.; COOMBS, T. L. The kinetics of accumulation and excretion of ferric hydroxide in *Mytilus edulis* (L.) and its distribution in the tissues. **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 71-84, jul. 1976.

GESTEIRA, T. C. V.; PAIVA, M. P. Impactos ambientais dos cultivos de camarões marinhos no Nordeste do Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.36, n. 1-2, p.23-38, 2003.

GIRI, C. et al. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology And Biogeography**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 154-159, 17 ago. 2010.

GONZALEZ, J-L.; THOUVENIN, B.; DANGE, C. Rôle des particules sur le comportement et la spéciation de métaux traces: exemple du cadmium. **La Houille Blanche**, [S.L.], n. 4, p. 56-62, ago. 2007.

HAMILTON, S. E.; CASEY, D. Creation of a high spatio-temporal resolution global database of continuous mangrove forest cover for the 21st century (CGMFC-21). **Global Ecology And Biogeography**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 729-738, 21 mar. 2016.

HEATH R, CLAASSEN M. The Use of Indigenous Fish Species for the Determination of Pesticide and Heavy Metal Loads. Pretoria.; 1999.

HE, Zhenli L.; YANG, Xiaoe E.; STOFFELLA, Peter J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. **Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology**, [S.L.], v. 19, n. 2-3, p. 125-140, dez. 2005.

HEDGECOTT, S. Prioritization and Standards for Hazardous Chemicals. **Handbook Of Ecotoxicology**, [S.L.], p. 832-857, 1994. Blackwell Publishing Ltd.

HOGARTH, P. J. **The Biology of Mangroves and Seagrasses**. Oxford, MA, USA: Oxford University Press, 2007.

HOODA, P. S. Assessing bioavailability of soil trace elements. In: Hooda, P.S. (Ed.), **Trace Elements in Soil**. [S.L.], p. 227-265, 15 abr. 2010. John Wiley & Sons, Ltd.

IBGE – INSTITUTO DE BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **População para Região Metropolitana da Cidade de Recife 2020**. Recife, 2020. Disponível em: cidades.ibge.gov.br/Brasil/pe/recife/panorama. Acesso em: 17 out. 2020.

INOUE, K.; Oliveira, G. H. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para Doença de Alzheimer. **Infarma**, v 15, n. 11-12, p 80. 2004.

JEBALI, J.; BANNI, M.; GUERBEJ, H.; ALMEIDA, E. A.; BANNAOUI, A.; BOUSSETTA, H.. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. **Fish Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 93-98, mar. 2006.

JOHNSON, Karyn N.; VAN HULTEN, Marielle C.W.; BARNES, Andrew C. “Vaccination” of shrimp against viral pathogens: phenomenology and underlying mechanisms. **Vaccine**, [S.L.], v. 26, n. 38, p. 4885-4892, set. 2008.

JOSHI, Prasad Ramesh **et al.** Gas phase reaction of phosphorus trichloride and methanol: matrix isolation infrared and dft studies. **Journal Of Molecular Structure**, [S.L.], v. 1100, p. 80-87, nov. 2015.

KARALLIEDDE L.; EDDLESTON M.; MURRAY V. The global picture of organophosphate insecticide poisoning. In: **Organophosphates and Health**, 1 ed, Imperial college press, 2001. 431-471 p.

KHALID, S., SHAHID, M., NIAZI, N. K., MURTAZA, B., BIBI, I., & DUMAT, C. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, 182, 247–268, 2017. doi:10.1016/j.gexplo.2016.11.021

KIBRIA, G.; HAROON, A. K. Y.; NUGEGODA, D.; ROSE, G. **Climate change and chemicals: environmental and biological aspects**. New Delhi: New India Publishing Agency, 2010. 460 p.

KIBRIA, Golam, et al. Trace/heavy metal pollution monitoring in estuary and coastal area of Bay of Bengal, Bangladesh and implicated impacts. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 105, n. 1, p. 393-402, abr. 2016.

KIBRIA, G.; LAU, T. C.; WU, R.. Innovative ‘Artificial Mussels’ technology for assessing spatial and temporal distribution of metals in Goulburn–Murray catchments waterways, Victoria, Australia: effects of climate variability (dry vs. wet years). **Environment International**, [S.L.], v. 50, p. 38-46, dez. 2012.

KIRBY MF, MORRIS S, HURST M, KIRBY SJ, NEALL P, TYLOR T, et al. The Use of Cholinesterase Activity in Flounder (*Platichthys flesus*) Muscle Tissue as a Biomarker of Neurotoxic Contamination in UK Estuaries. *Mar Pollut Bull.* 2000;40(9):780–91

KRISHNAKUMAR, P. K., QURBAN, M. A., & SASIKUMAR, G. Biomonitoring of Trace Metals in the Coastal Waters Using Bivalve Molluscs. *Trace Elements - Human Health and Environment*, 2018. doi:10.5772/intechopen.76938

LAABS, Volker **et al.** Pesticides in Surface Water, Sediment, and Rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. **Journal Of Environmental Quality**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 1636-1648, set. 2002.

LAM PKS, GRAY JS. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar Pollut Bull* 46: 182–186

LARA, W. H.; BARRETO, H. H. C.; INOMATA, O. N. K.; MONTONE, R.; WEBER, R. R. Organohlorine residues in Antartic Penguins. **Pesquisa Antártica Brasileira**, [S.L.] v. 2 n. 1, p. 1-6, 1990.

LEE, S. Y. Tropical mangrove ecology: physical and biotic factors influencing ecosystem structure and function. **Austral Ecology**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 355-366, ago. 1999.

LEE, Shing Yip **et al.** Ecological role and services of tropical mangrove ecosystems: a reassessment. **Global Ecology And Biogeography**, [S.L.], v. 23, n. 7, p. 726-743, 6 mar. 2014.

LEES, David. Viruses and bivalve shellfish. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 59, n. 1-2, p. 81-116, jul. 2000.

LETICIA AG, GERARDO GB. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008;71(3):787–97.

LI, Li; ZHENG, Binghui; LIU, Lusan. Biomonitoring and Bioindicators Used for River Ecosystems: definitions, approaches and trends. **Procedia Environmental Sciences**, [S.L.], v. 2, p. 1510-1524, 2010.

LIGNOT JH, CHARMANTIER G, COCHARD JC. 1998. Effect of an organophosphorus insecticide, Fenitrothion, on survival, osmoregulation, and acetylcholinesterase activity in different life stages of two penaeid shrimp: *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *J Shellfish Res* 17:1251–1258

LIVINGSTONE D. R.; CHIPMAN J. K.; LOWE D.M.; MINIER C.; PIPE R. K. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: Recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis*). **International Journal of Environment and Pollution**. V 13, p 56-91, 2000.

LONG, E. R., MACDONALD, D. D., SMITH, S. L. & CALDER, F. D. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. **Environmental Management**, 19, 81-97, 1995.

LOPES, Danilo Francisco Corrêa et al. Brain acetylcholinesterase of three perciformes: from the characterization to the in vitro effect of metal ions and pesticides. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 173, p. 494-503, mai 2019.

LOPES, Fernanda Moreira *et al.* Glyphosate Adversely Affects Danio rerio Males: acetylcholinesterase modulation and oxidative stress. **Zebrafish**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 97-105, abr. 2017.

MARSDEN, I. D; RAINBOW, P. S. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology—the amphipod example? **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, [S.L.], v. 300, n. 1-2, p. 373-408, mar. 2004.

MATO, Yukie **et al.** Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 318-324, jan. 2001.

MCCLUGGAGE D. Heavy Metal Poisoning, **NCS Magazine**. Columbus, U.S.A: The bird hospital, 1991.

MÉNDEZ, Lia; ACOSTA, Baudilio; RACOTTA, Ilie. Mineral Concentrations in Muscle and Hepatopancreas of Newly Caught Wild and Hatchery-Exhausted Spawners of Pacific White Shrimp, *Penaeus vannamei*. **Journal Of Applied Aquaculture**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 17-26, 8 fev. 1999.

MIRANDA FILHO, K. C.; MONTONE, R. C.; FILMANN, G. Compostos organoclorados. In: BAPTISTA NETO, J. A. *et al.* **Poluição marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 5, p.97-150

MIRANDA, D. A. **Bifenilas policloradas (PCBs) e pesticidas organoclorados em Scomberomorus cavalla**: pescado de importância econômica na Região Metropolitana do Recife - PE. 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2015.

MONSERRAT, J. M.; GERACITANO, L. A.; BIANCHINI, A. Current and Future Perspectives Using Biomarkers to Assess Pollution in Aquatic Ecosystems. **Comments On Toxicology**, [S.L.], v. 9, n. 5-6, p. 255-269, set. 2003.

MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A.; REBELO, M. Toxicity and Anticholinesterase Effect of Formulated Methyl Parathion to the Estuarine Crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae) Pre-exposed to Sesamol. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, [S.L.], v. 118, n. 3, p. 329-334, nov. 1997.

MONTONE, R.C. **Poluentes orgânicos prioritários**: organoclorados no ambiente marinho. VII Congresso brasileiro de ecotoxicologia. Vitória –ES: [s.n.], 2002, 63 p.

MOON, E.; KUIVILA, K. M. Effects of salinity on the abiotic hydrolysis of select pesticides. In: **fifth biennial states of the estuary conference**, San Francisco: USGS, 2001.

MORA, Pascal; MICHEL, Xavier; NARBONNE, Jean-François. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 253-260, out. 1999.

MORTON, Brian. Do the Bivalvia demonstrate environment-specific sexual strategies? A Hong Kong model. **Journal Of Zoology**, [S.L.], v. 223, n. 1, p. 131-142, jan. 1991.

MOURA, Jéssica Alessandra da Silva. **Poluentes orgânicos persistentes no sedimento do estuário do Capibaribe, Recife, Pernambuco**. 2016. 79 f. Monografia (Graduação) - Curso de Oceanografia, Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

MURCHIE, Laura W. et al. High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 257-270, set. 2005.

NACHMANSOHN, D.; ROTHENBERG, M. A. Studies on cholinesterase I. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. **The Journal of Biological Chemistry**, [S.L.], p. 58-653, 1945.

NAMMALWAR, P. **Heavy metals pollution in the marine environment**. Science Reporter. v. 20, n. 3, p. 158-160, 1983.

NGUYEN, Van-Huy; SMITH, Siwaporn Meejoo; WANTALA, Kitirote; KAJITVICHYANUKUL, Puangrat. Photocatalytic remediation of persistent organic pollutants (POPs): a review. **Arabian Journal Of Chemistry**, [S.L.], mai. 2020.

NHAN, Dang Duc **et al.** Chlorinated pesticides and PCBs in sediments and molluscs from freshwater canals in the Hanoi region. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 112, n. 3, p. 311-320, maio 2001.

NOOKALA, T.; YALLAPRAGADA, P.R.; VELAGA, M.K.. **Tolerance of *Penaeus vannamei* post larvae on exposure to copper** Int. J. Toxicol. Appl. Pharmacol., 4 (2014), pp. 33-38.

NYBAKKEN W.J.; BERTNESS M.D. **Marine Biology**: an Ecological Approach. Internetal Edition, 6. ed. Pearson, 2005. 592 p.

N.J. TUROCZY, B.D. MITCHELL, A.H. LEVINGS, V.S. RAJENDRAM. **Cadmium, copper, mercury, and zinc concentrations in tissues of the king crab *Pseudocarcinus gigas* from southeast Australian Waters.** Environ. Int., 27 (2001), pp. 327-334

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1988. 434 p.

ODUM, E.P. and BARRET, G.W. **Fundamentos de Ecologia**. São Paulo: Cengage Learning, 2013, 612 p.

OLIVEIRA-SILVA, Jefferson José **et al.** Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 130-135, abr. 2001.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Les dioxines et leurs effets sur la santé**. Centre des médias. Annexe technique à la recommandation “Dioxines”. Ministère de l'Environnement, Aide-mémoire n. 225, p. 7, 2014.

PARIATAMBY, Agamuthu; KEE, Yang Ling. Persistent Organic Pollutants Management and Remediation. **Procedia Environmental Sciences**, [S.L.], v. 31, p. 842-848, 2016.

PEHKONEN, Simo O.; ZHANG, Qi. The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: a critical review. **Critical Reviews In Environmental Science And Technology**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 17-72, jan. 2002.

PEPLOW D. **Environmental impacts of mining in eastern washington, center for water and watershed studies fact sheet**. Seattle: University of Washington, 1999.

PERIĆ, LORENA; BURIC, PETRA. The effect of copper and chlorpyrifos co-exposure on biomarkers in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Chemosphere**, [S.L.], v. 225, p. 126-134, jun. 2019.

PEDERSON, S.N.; UNDEBYE, A.-K.; DEPLEDGE, M.H.. **Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab *Carcinus maenas* exposed to trace metals** Aquat. Toxicol., 37 (1997), pp. 183-200.

PERNAMBUCO. GOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO. **Plano hidroambiental da bacia hidrográfica do rio Capibaribe**: Tomo III - Planos de investimentos. Projetos Técnicos. Recife, 2010. 286p. Disponível em: sirh.srh.pe.gov.br. Acesso em: 17 out. 2020.

PHILLIPS, David J. H.; RAINBOW, Philip S. Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. **Marine Environmental Research**, [S.L.], v. 28, n. 1-4, p. 207-210, jan. 1989.

PIPE, Richard K.; COLES, Jackie A. Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 581-595, nov. 1995.

PRINTRAKOON C.; WELLS F. E.; CHITRAMVONG Y. Distribution of molluscs in mangroves at six sites in the upper Gulf of Thailand. **Raffles bulletin of zoology**. V. 18, p 247–257, 2008.

PRITCHARD, D. W. What is estuary: Physical viewpoint. In: LAUFF, G. H. (Ed.) **Estuaries**. Washington: American Association for the Advancement of Science, 1967. p. 3-5

RAINBOW, P. S. Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. In: LANGSTON, W. J.; BEBIANNO. M. (Edt). **Metal metabolism in aquatic environments**. London: Chapman and Hall; 1998. p. 285–319

RAMOS-CARREÑO, S., VALENCIA-YAÑEZ, R., CORREA-SANDOVAL, F., RUÍZ-GARCÍA, N., DÍAZ-HERRERA, F., & GIFFARD-MENA, I. (2014). White spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to low and high salinity. *Archives of Virology*, 159, 2213–2222. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2052-0>.

RAINBOW, P. Biomonitoring of trace metals in the Gulf of Gdansk, using mussels (*Mytilus trossulus*) and barnacles (*Balanus improvisus*). **Water Research**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 1823-1829, 1 abr. 2000.

RAINBOW, P. S.; BLACKMORE, G. Barnacles as biomonitors of trace metal availabilities in Hong Kong coastal waters: changes in space and time. **Marine Environmental Research**, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 441-463, jun. 2001.

REDDY, P. M.; PHILIP, G. H. In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 619-626, abr. 1994.

RESENDE, M.; CURI, N.; REZENDE, S. B.; CORRÊA, G. F. **Pedologia**: base para distinção de ambientes. 4.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 338p.

RIVA, Consuelo **et al.** The Case of Pollution of Lake Maggiore: a 12-year study with the bioindicator mussel *Dreissena polymorpha*. **Water, Air, & Soil Pollution**, [S.L.], v. 210, n. 1-4, p. 75-86, 9 out. 2009.

RODRÍGUEZ-FUENTES G, ARMSTRONG J, SCHLENK D. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal waste water outfall in Southern California. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008;69(3):466– 71.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 81-113, abr. 1992.

RÖNNBÄCK, Patrik. The ecological basis for economic value of seafood production supported by mangrove ecosystems. **Ecological Economics**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 235-252, mai. 1999.

ROSENBERRY, B. World shrimp farming 2005. In: **Shrimp News International**. San Diego, California, USA: 2005. p. 270.

SAAD, L.O.; CUNHA, C.G.; COLPO, K.D. How mollusk assemblages respond to different urbanization levels: characterization of the malacofauna in subtropical Brazilian mangroves. **Marine Biodiversity**. 49, 989–999, 2019.

SALMO S. G; TIBBETTS I.; DUKE, N. C. Colonization and shift of mollusc assemblages as a restoration indicator in planted mangroves in the Philippines. **Biodiversity And Conservation**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 865-881, 10 dez. 2016.

SALOMÃO, M. S. M. B. **et al**. Particulate heavy metal transport in the lower Paraíba do Sul River basin, southeastern, Brazil. **Hydrological Processes**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 587-593, mar. 2001.

SANTONA, L; CASTALDI, P; MELIS, P. Evaluation of the interaction mechanisms between red muds and heavy metals. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 136, n. 2, p. 324-329, 21 ago. 2006.

SAOUDI, Abdessattar **et al**. Serum levels of organochlorine pesticides in the French adult population: the french national nutrition and health study (enns), 2006-2007. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 472, p. 1089-1099, fev. 2014.

SCHAEFFER-NOVELLI, Yara. Perfil dos ecossistemas litoraneos brasileiros, com especial enfase sobre o ecossistema manguezal. **Publicação Especial do Instituto Oceanografico**, São Paulo, n. 7, p. 1-16, 1989.

SERICANO, J.L. **et al**. Trace organic contamination in the Americas: an overview of the us national status & trends and the international mussel watch programmes. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 31, n. 4-12, p. 214-225, abr. 1995.

SILVA, E. **et al**. Distribution of trace elements in tissues of shrimp species *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) from Bahia, Brazil. **Brazilian Journal Of Biology**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 194-204, 22 jan. 2016.

SILVA, Kaline Catiely Campos **et al.** Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 126, p. 191-197, jan. 2013.

SILVA, M. F. O.; COSTA, L. M. A indústria de defensivos agrícolas. **Caderno BNDS Setorial**. v 35, 233-276 p. mar. 2012.

SOUZA, P.R., SOUZA, K.S., ASSIS, C.R.D., ARAÚJO, M.C., SILVA, K.C.C., SILVA, J.F.X., FERREIRA, A.C.M., SILVA, V.L., ADAM, M.L., CARVALHO JR., L.B., BEZERRA, R.S. Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. **Aquatic Toxicology**. 197, 109–121, 2018.

SOUZA, Paula Rayane de. **et al.** Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: a highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 197, p. 109-121, abr. 2018.

STANDAERT, D. G.; YOUNG, A. B. Opioides, analgesia e tratamento da dor. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2006. Cap. 20.

STEFANO, Bonacci; ILARIA, Corsi; SILVANO, Focardi. Cholinesterase activities in the scallop *Pecten jacobaeus*: characterization and effects of exposure to aquatic contaminants. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 392, n. 1, p. 99-109, mar. 2008.

STENYAKINA, A. **et al.** Food availability and sex reversal in *Mytella charruana*, an introduced bivalve in the southeastern United States. **Molecular Reproduction And Development**, [S.L.], v. 77, n. 3, p. 222-230, 2009

SZABÓ, A.; NEMCSÓK, J.; ASZTALOS, B.; RAKONCZAY, Z.; KÁSA, P.; HIEU, Le Huu. The effect of pesticides on carp (*Cyprinus carpio* L). Acetylcholinesterase and its biochemical characterization. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 39-45, fev. 1992.

TAVARES TM, ROCHA VC, PORTE C, BARCELO D, ALBAIGES J. Application of the mussel watch concept in studies of hydrocarbons, PCBs and DDT in the brazilian bay of Todos os Santos (Bahia). **Mar Pollut Bull.** [S.L.], v 19, p 575-578, 1988.

TOMLINSON, D. L. **et al.** Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. **Helgoland Marine Research**, [S.L.], v. 33, n. 1-4, p. 566-575, mar. 1980.

TORO, Beatriz; NAVARRO, Jorge M.; PALMA-FLEMING, Hernán. Relationship between bioenergetics responses and organic pollutants in the giant mussel, *Choromytilus chorus* (Mollusca: mytilidae). **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 257-269, mai. 2003.

UMAR, A.M.; AISAMI, A. Acetylcholinesterase Enzyme (AChE) as a Biosensor and Biomarker for Pesticides: A Mini Review. *Bulletin of Environmental Science & Sustainable Management (BESSM)*, V 4, 7-12, 2020

UNEP. Stockholm Convention: protecting human health and the environment from persistent organic pollutants. [S.L.]: Secretariat of the Stockholm Convention, United Nations Environment Programme, 2019. Disponível em: <http://www.pops.int>. Acesso em 18 ago. 2020.

VAEZZADEH, Vahab **et al.** Mangrove Oyster (*Crassostrea belcheri*) as a Biomonitor Species for Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Sediment of the West Coast of Peninsular Malaysia. **Polycyclic Aromatic Compounds**, [S.L.], v. 39, n. 5, p. 470-485, 9 ago. 2017.

VALDÉS-RAMÍREZ, Gabriela; FOURNIER, Didier; RAMÍREZ-SILVA, Maria Teresa; MARTY, J.-L. Sensitive amperometric biosensor for dichlorovos quantification: application to detection of residues on apple skin. **Talanta**, [S.L.], v. 74, n. 4, p. 741-746, 15 jan. 2008.

VAN WYK, P.; SCARPA, J. Water quality requirements and management. In: VAN WYK, P.; DAVIS-HODGKINS, M.; LARAMORE, R.; MAIN, K. L.; MOUNTAIN, J.; SCARPA, J. (eds). **Cultivando camarão marinho em sistemas de recirculação de água doce**. 1. ed. Flórida: Departamento de Agricultura e Serviços ao Consumidor da Flórida - Harbor Branch Oceanic Institute, 1999.

VIOQUE-FERNÁNDEZ, A. **et al.** Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 168, n. 3, p. 260-268, fev. 2007.

VIDAL-LIÑÁN, L., BELLAS, J., SORIANO, J. A., CONCHA-GRAÑA, E., MUNIATEGUI, S., & BEIRAS, R. Bioaccumulation of PCB-153 and effects on molecular biomarkers acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase in *Mytilus galloprovincialis* mussels. *Environmental Pollution*, 214, 885–891, 2016.

VOGT, Günter; QUINTIO, Emilia T.. Accumulation and excretion of metal granules in the prawn, *Penaeus monodon*, exposed to water-borne copper, lead, iron and calcium. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 28, n. 3-4, p. 223-241, abr. 1994.

WADE, T. L.; CANTILLO, A. Y. **Use of Standards and Reference Materials in the Measurement of Chlorinated Hydrocarbon Residues**. Chemistry Workbook. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77. Silver Spring: U.S. Department of Commerce: 59 p. 1994

WADE, T. L.; CANTILLO, A. Y. Use of Standards and Reference Materials in the Measurement of Chlorinated Hydrocarbon Residues. Chemistry Workbook. **NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77**. Silver Spring: U.S. Department of Commerce, 1994. 59 p.

WAID, J. S. **PCBs and the Environment, Vol. III**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1987.

WANG, W. X. Interactions of trace metals and different marine food chains. **Marine Ecology Progress Series**, [S.L.], v. 243, p. 295-309, 2002.

WAS – WORLD AQUACULTURE SOCIETY. **Diagnosis of shrimp disiese**. Baton Rouge: 1999. CD-ROM.

WEFERLING, Norbert; ZHANG, Shuan Ming; CHIANG, Cho Hsien. Commercial Organophosphorus Chemicals: status and new developments. **Procedia Engineering**, [S.L.], v. 138, p. 291-301, 2016.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Metabolismo dos fármacos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2006. Cap. 6.

WHITEHEAD, Andrew; ANDERSON, Susan L.; RAMIREZ, Alberto; WILSON, Barry W. Cholinesterases in Aquatic Biomonitoring: assay optimization and species-specific

characterization for a california native fish. **Ecotoxicology**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 597-606, 30 jun. 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Carbamates pesticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria**. Genebra, 64 p., 1986.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Organophosphorus insecticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria**. Genebra, 63 p, 1986 .

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1986. Organophosphorus Insecticides: A General Introduction. Environmental Health Criteria 63. Geneva.

WOLFF, M. S.; TONIOLO, P. G. Environmental organochlorine exposure as a potential etiologic factor in breast cancer. **Environmental Health Perspectives**, [S.L.], v. 103, n. 7, p. 141-145, out. 1995.

WON, S. J. The Freshwater Mussel (*Elliptio complanata*) as a Sentinel Species: vitellogenin and steroid receptors. **Integrative And Comparative Biology**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 72-80, 1 jan. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Trace Elements in Human Nutrition and Health**. Switerland: Geneva: World Health Organization; 1996. 361 p.

WU, Jui-Pin; CHEN, Hon-Cheng. Metallothionein induction and heavy metal accumulation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to cadmium and zinc. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.L.], v. 140, n. 3-4, p. 383-394, mar. 2005.

WU, Rudolf S. S.; LAU, T.C.; FUNG, Wendy K.M.; KO, P.H.; LEUNG, Kenneth M. Y. An 'artificial mussel' for monitoring heavy metals in marine environments. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 145, n. 1, p. 104-110, jan. 2007.

XAVIER, Diego de Arruda **et al.** Determination of geochemical background values on a tropical estuarine system in a densely urban area. Case study: capibaribe estuary, northeastern brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 123, n. 1-2, p. 381-386, out. 2017.

XUAN, Ruijing **et al.** Oxygen consumption and metabolic responses of freshwater crab *Sinopotamon henanense* to acute and sub-chronic cadmium exposure. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 89, p. 29-35, mar. 2013.

YETIMOGLU, E. K.; KAHRAMAN, M.V.; ERCAN, Ö.; AKDEMIR, Z.S.; APOHAN, N. K. N-vinylpyrrolidone/acrylic acid/2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid based hydrogels: synthesis, characterization and their application in the removal of heavy metals. **Reactive And Functional Polymers**, [S.L.], v. 67, n. 5, p. 451-460, mai. 2007.

YILMAZ A. B.; YILMAZ, L. Influences of sex and seasons on levels of heavy metals in tissues of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* de Hann, 1844). **Food Chemistry**, [S.L.], v. 101, n. 4, p. 1664-1669, 2007.

YILMAZ, A. B.; YILMAZ, L. Influences of sex and seasons on levels of heavy metals in tissues of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* de Hann, 1844). **Food Chemistry**, [S.L.], v. 101, n. 4, p. 1664-1669, 2007.

YOGUI, G. T., TANIGUSHI, S., SILVA, J., MIRANDA, D. A., MONTONE, R. C. The legacy of man-made organic compounds in surface sediments of Pina Sound and Suape Estuary, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 66, p. 58-72, 2018.

YOGUI, G. T.; LEONEL, J.; COMBI, T. Poluentes orgânicos persistentes. In: Cavalcante, R.M. (Ed.). **Contaminantes Orgânicos em Ambientes Aquáticos**. Foz de Iguaçu: Edições UFC. 2020

YOGUI, Gilvan Takeshi **et al.** The legacy of man-made organic compounds in surface sediments of Pina Sound and Suape Estuary, northeastern Brazil. **Brazilian Journal Of Oceanography**, [S.L.], v. 66, n. 1, p. 58-72, mar. 2018.

YUAN W.; WALTERS L. J.; HOFFMAN E. A.; SCHNEIDER K. R. Limits on survival: Examining salinity tolerance in the non-native charru mussel, *Mytella charruana*. In: **Proceedings of the Society for Integrative and Comparative Biology Annual Meeting**. Boston MA: 2009. 2-21 p.

YUAN, Wei S. **et al.** Synergistic Effects of Salinity and Temperature on the Survival of Two Nonnative Bivalve Molluscs, *Perna viridis* (Linnaeus 1758) and *Mytella charruana* (d'Orbigny 1846). **Journal Of Marine Biology**, [S.L.], v. 2016, p. 1-14, 2016.

YUAN, Wei; WALTERS, Linda J.; SCHNEIDER, Kimberly R.; HOFFMAN, Eric A. Exploring the Survival Threshold: a study of salinity tolerance of the nonnative mussel *Mytilus charruana*. **Journal Of Shellfish Research**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 415-422, ago. 2010.

ZABEL, T. **Diffuse sources of pollution by heavy metals** Water Environ. J., 7 (1993), pp. 513-520.

ZANARDI-LAMARDO, Eliete **et al.** Fontes e níveis de contaminação do sistema estuarino do rio Capibaribe (Pernambuco/Brasil). **Tropical Oceanography**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 118-131, 30 nov. 2016.

ZITTLE, Charles A.; DELLAMONICA, Edward S.; CUSTER, Jonathan H. Purification of human red cell acetylcholinesterase. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 43-49, jan. 1954.

ANEXOS

Anexo I - Pesticidas analisados em *Mytella charruana*

1-(3,4-dichlorophenyl)urea); 2,6-dichlorobenzamide; 3,4,5-Trimethacarb; Acephate; Aldicarb sulfone; Amidosulfuron; Asulam; Atrazine desisopropyl; Atrazine; Bitertanol; Butocarboxim sulfoxide; Butocarboxim; Carbendazin; Carbofuran; Carbosulfan; Carboxin; Chlordimeform; Chlorthiamid; Chlortoluron; Cicluron; Clodinafop-propargyl; Clomazone; Clopyralid; Clothianidin; Cyanazine; Cyanofenphos; Daminozide; Dazomet; Demeton-O+S; Demeton-S-methyl sulfoxide; Desmetryn; Dimefuron; Dinotefuran; Ethiofencarb sulfone; Fenpropidin; Fenuron; Flonicamid; Fluazafop-P-butyl; Flubendiamide; Fluormethuron; Fomesafen; Formetanate; Imazapyr; Imazethapyr; Imibenconazole desbenzyl; Mesotrione; Methamidophos; Methiocarb sulfone; Methomyl; Monuron; Napropamide; Nicotina; Nitenpyram; Ofurace; Omethoate; Oxamyl oxime; Oxamyl; Paraoxon ethyl; Pendimethalin; Piracarbolid; Pirimicarb desmethyl; Pirimiphos-ethyl; Pyrazosulfuron ethyl; Pyridaphenthion; Pyridate; Quinoclamine; Quizalofop-ethyl; Simetryn ; Spinosad A; Spinosad D; Sulprofos; Tau Fluvalinato; Tebutam; 1-naphthalene acetamid; 2,3,5,6-Tetrachloroaniline; 2,4-D; 2-Ethylhexyl diphenyl phosphate; 2-Phenylphenol; 3,4-Dichloroaniline; 3-Hydroxycarbofuran; Abamectin; Acetamiprid; Acetochlor; Acibenzolar-S-methyl; Aclonifem; Alachlor; Aldicarb sulfoxide; Aldicarb; Aldrin; Alloxidim; Ametryn; Aminocarb; Amitrol; Anilazine; Aspon(Philstrom); Atrazine desethyl; Azaconazole; Azamethiophos; Azinphos ethyl; Azinphos methyl; Azoxystrobin; Benalaxyl; Bendiocarb; Bensulfuron methyl; Bentazone; Benzoximate; Bifenazate; Bifenox; Bifenthrin; Bioaletrina; Boscalid; Bromacil; Bromophos ethyl; Bromophos-methyl; Bromopropylate; Bromuconazole; Bupirimate; Buprofezin; Butachlor; Cadusafos; Carbaryl; Carbetamide; Carbofuran-3-hydroxy; Carbophenothion; Carfentrazone ethyl; Carpropamid; Chinomethionate; Chlorantranilipore; Chlorbromuron; Chlorfenapyr; Chlorfenvinphos; Chlorfluazuron; Chloridazon; Chlorimuron ethyl; Chlorothalonil; Chloroxuron; Chlorpropham; Chlorpyrifos; Chlorpyrifos-methyl; Chlorsulfuron; Chlorthiophos; Chlozolate; Cianosulfuron; Cinosulfuron; Clethodim; Clofentezine; Coumaphos; Cumyluron; Cyazofamid; Cycloate; Cycloxydim; Cyflufenamid; Cyfluthrin; Cyhexatin; Cymoxanil; Cypermethrin; Cyproconazole; Cyprodinil; Daimuron; DDT; DDE; Deltamethrin; Demeton-S-methyl; Desmedipham; Diafenthiuron; Dialifos; Diazinon; Dichlofenthion; Dichloran; Dichlorvos; Diclofluanid; Dicrotophos; Dieldrin; Diethofencarb; Difenoconazole; Difenoxuron; Diflubenzuron; Diflufenican; Dimethachlon; Dimethenamid; Dimethoate; Dimethomorph; Dimoxystrobin; Diniconazole; Dioxacarb; Dioxathion; Disulfoton; Disulfoton-sulfone; Diuron; DMSA; DMST; DNOC; Dodemorph; Dodine; Doramectina; Emamectin benzoate; Endosulfan I (alpha isomer); Endosulfan II (beta isomer); Endosulfan sulfate; Endrin; EPN; Epoxiconazole; Eprinomectin; EPTC; Esfenvalerate; Esprocarb; Etaconazole; Ethidimuron; Ethiofencarb sulfoxide;

Ethiofencarb; Ethion; Ethiprole; Ethirimol; Ethofumesate; Ethoprophos; Ethoxyquin; Etobenzamid;
 Etofenprox; Etridiazole; Etrinfos; Famoxadone; Fenamidone; Fenamiphos; Fenarimol; Fenazaquin;
 Fenbuconazole; Fenbutatin oxide; Fenfuram; Fenhexamid; Fenitrothion; Fenobucarb; Fenoprobe;
 Fenoxaprop-ethyl; Fenoxycarb; Fenciclonil; Fenpropathrin; Fenpropimorph; Fenpyroximat; Fenthion;
 Fenthion-sulfoxide; Fenvalerate; Fipronil; Flamprop-isopropyl; Flamprop-methyl; Flazasulfuron;
 Fluazinam; Flucythrinate; Fludioxonil; Flufenacet; Flufenoxuron; Fluoroglycofenethyl; Fluoxastrobin;
 Fluquinconazole; Flusilazole; Flusulfamide; Fluthiacetmethyl; Flutolanil; Flutoxypr meptyl;
 Flutriafol; Fluxapyroxade; Fonofos; Forato; Forchlorfenuron; Fosthiazate; Fuberidazole; Furalaxyl;
 Furathiocarb; Halofenozide; Haloxyp-methyl; HCH-alpha, beta e delta ; Heptachlor; Heptenophos;
 Hexachlorobenzene; Hexaconazole; Hexaflumuron; Hexythiazox; Imazalil; Imazosulfuron;
 Imibenconazole; Imidacloprid; Indoxacarb; Ioxynil; Iprodione; Iprovalicarb; Isazophos; Isocarbamide;
 Isocarbofos; Isafenphos; Isoprocab; Isoprothiolone; Isoproturon; Isoxaflutole; Isoxathion; Ivermectin;
 Karbutilate; Kresoxim methyl; Lactofen; Lambda-cyhalothrin; Lindano; Linuron; Lufenuron;
 Malaoxon; Malathion; Mandipropamid; MCPA; Mecarbam; Mefenacet; Mepanipyrim; Mephosfolan;
 Mepronil; Metaflumizone; Metalaxyl; Metamitron; Metconazole; Methabenzthiazuron; Methfuroxam;
 Methidathion; Methiocarb sulfoxide; Methiocarb; Methoprotetryne; Methoxyfenozide; Metobromuron;
 Metolachlor; Metosulam; Metoxuron; Metrafenone; Metribuzin; Metsulfuron methyl;
 Mevinphos(cis,trans); Mirex; Monocrotophos; Monolinuron; Moxidectin; Myclobutanil; Naled;
 Neburon; Norflurazon; Novaluron; Noviflumuron; Nuairimol; Oxadixyl; Oxycarboxin; Oxyfluorfen;
 Paclobutrazol; Parathion; Parathion-methyl; Penconazole; Pencycuron; Permethrin(cis,trans);
 Phenmedipham; Phenthoate; Phorate; Phorate sulfoxide; Phosalone; Phosmet; Phosphamidon;
 Phoxim; Picoxystrobin; Piperonyl butoxide; Pirimicarb; Pirimiphos-methyl; Prochloraz; Procymidone;
 Profenofos; Promecarb; Prometon; Prometryn; Propachlor; Propamocarb; Propanil; Propargite;
 Propazine; Propetamphos; Propiconazole(1,2); Propoxur; Propyzamide-pronamide; Proquinazid;
 Prosulfocarb; Prosulfuron; Prothioconazole; Pymetrozine; Pyraclostrobin; Pyrazophos; Pyridaben;
 Pyrifeno; Pyrimethanil; Pyriproxifen; Quinalphos; Quinmerac; Quinoxifen; Quintozene;
 Rimsulfuron; Rotenone; Siduron; Simazine; Spinetoram; Spirodiclofen; Spiromesifen; Spirotetramat;
 Spiroxamine; Sulfentrazone; Sulfosulfuron; Sulfotep; Tebuconazole; Tebufenozide; Tebufenpyrad;
 Tebuthiuron; Teflubenzuron; Tefluthrin; Temephos; Tepraloxym; Terbufos; Terbumeton;
 Terbutylazine; Terbutryn; Tetraconazole; Tetradifon; Thiabendazole; Thiacloprid; Thiamethoxam;
 Thidiazuron; Thifensulfuron methyl; Thiobencarb; Thiodicarb; Thiofanox sulfone; Thiofanox
 sulfoxid; Thiofanox; Thiophanate methyl; Tolclofos methyl; Tolifluanide; Triadimefon; Triadimenol;
 Triasulfuron; Triazophos; Trichlorfon; Tricyclazole; Tridemorph; Trifloxystrobin; Trifloxysulfuron;
 Triflumizole; Triflumuron; Trifluralin; Triflusulfuron-methyl; Triforine; Triticonazole; Uniconazole;
 Vamidothion Sulfone; Vamidothion Sulfoxido; Vamidothion; Vinclozolin; Zoxamide.