

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

CÉLIO FREIRE MARIZ JR

**Toxicidade de frações de óleo intemperizado e seus
mecanismos utilizando peixes como organismos
modelo: evidências laboratoriais e de campo no litoral
de Pernambuco**

RECIFE

2025

CÉLIO FREIRE MARIZ JR

**Toxicidade de frações de óleo intemperizado e seus
mecanismos utilizando peixes como organismos
modelo: evidências laboratoriais e de campo no litoral
de Pernambuco**

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

Área de Concentração: Biologia Animal

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

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

RECIFE

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Mariz Jr, Célio Freire.

Toxicidade de frações de óleo intemperizado e seus mecanismos utilizando peixes como organismos modelo: evidências laboratoriais e de campo no litoral de Pernambuco / Celio Freire Mariz Jr. - Recife, 2025.

172f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2025.

Orientação: Paulo Sérgio Martins Carvalho.

Coorientação: Eliete Zanardi-Lamardo.

Inclui referências e anexos.

1. Derrame de óleo; 2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos; 3. Intemperismo; 4. Radiação Ultravioleta; 5. Biomarcadores; 6. Fases iniciais de vida. I. Carvalho, Paulo Sérgio Martins. II. Zanardi-Lamardo, Eliete. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CÉLIO FREIRE MARIZ JR

**Toxicidade de frações de óleo intemperizado e seus
mecanismos utilizando peixes como organismos
modelo: evidências laboratoriais e de campo no litoral
de Pernambuco**

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

BANCA EXAMINADORA:

Aprovada em: 09 /05 /2025

Documento assinado digitalmente



PAULO SERGIO MARTINS DE CARVALHO

Data: 14/05/2025 12:52:12-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Paulo Sergio Martins de Carvalho
Departamento de Zoologia
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente



MONICA LUCIA ADAM

Data: 13/05/2025 13:04:53-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Mônica Lúcia Adam
Departamento de Engenharia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná



Documento assinado digitalmente

LILIA PEREIRA DE SOUZA SANTOS

Data: 14/05/2025 11:44:54-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Lília Pereira de Souza Santos
Departamento de Oceanografia
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente



AFONSO CELSO DIAS BAINY

Data: 12/05/2025 13:56:59-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Afonso C. D. Baily
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente

LILIAN LUND AMADO

Data: 12/05/2025 12:01:33-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Lillian Lund Amado
Núcleo de Ecologia Aquática e Pesca da Amazônia – Universidade Federal do Pará

Dr. Giovanni A. Paiva dos Santos
Departamento de Zoologia
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Cristiane M. Varela de Araujo
Departamento de Morfologia e Fisiologia
animal - Universidade Federal Rural de
Pernambuco

Dedico esta tese a meus pais e à minha avó Cleide. Minha avó, que não pôde estar presente durante meu doutorado, segue se fazendo presente em meu coração.

AGRADECIMENTOS

O título de doutor tem sido esperado por mim há muito tempo e chegar até aqui é realmente emocionante. O doutorado me trouxe tanto conhecimento relacionado a minha área que de longe foi uma das melhores experiências da minha vida.

Gostaria de começar agradecendo meus pais que foram e são minhas inspirações de pessoas trabalhadoras e que me apoiam em todas as decisões que eu tomo, o que em si já é motivo para agradecer. A minha irmã e meu sobrinho que são muito especiais para mim. Aos amigos que fiz no laboratório e se tornaram amigos para a vida toda. Maria, meu amor, que é uma grande amiga e que esteve comigo em tantos momentos bons e ruins, porque perrengue com amigos nunca é perrengue de verdade. Na verdade, é motivo para umas boas risadas. Shay que se tornou uma grande amiga e foi um prazer acompanhá-la durante a gestação do bebê labecotóxico, Olívia. Letícia que chegou tarde no nosso grupo, mas que em um curto período se tornou uma pessoa muito especial para mim. Gostaria de agradecer a meu orientador e amigo, Paulo, que foi fundamental para meu crescimento profissional e pessoal e que seguiu acreditando em mim mesmo quando eu já tinha desistido de acreditar. Foi o responsável por minha viagem aos EUA para o desenvolvimento da minha pesquisa e do meu conhecimento profissional. Não terei como pagar o esforço que foi feito por mim durante esses quatro anos de doutorado, os dois anos de mestrado e os três anos de estágio. Bota tempo nisso.

Esse agradecimento final vai para o pessoal do OrganoMar, em especial a professora Eliete, que também é minha coorientadora, uma excelente pessoa e que contribuiu muito para meus trabalhos desde a minha graduação. Roxanny, grande amiga também do OrganoMar, agradeço a amizade sincera e a ajuda. Um agradecimento especial a todos os estagiários do LABECOTOX que auxiliaram no desenvolvimento dos experimentos e projetos todos estes anos, em especial meus antigos coorientandos João e a Bruna que foram os mais próximos.

Nunca imaginei que chegaria até aqui, mas eu cheguei e eu só tenho que agradecer a todas as pessoas que acreditaram em mim. Meu mais sincero obrigado.

RESUMO

A costa brasileira foi afetada por um derramamento de óleo que causou impactos nos ecossistemas aquáticos costeiros entre 2019 e 2020. A toxicidade, baseada em parâmetros de desenvolvimento, morfológicos, bioquímicos e comportamentais, foi medida em laboratório em estágios embrio-larvais de *Danio rerio* expostos a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes em frações acomodadas em água (FAA) de amostras do óleo que atingiu a costa. Também foram avaliados em campo biomarcadores de exposição, bioquímicos e de genotoxicidade na carapeba *Eugerres brasilianus* residente em 3 estuários impactados pelo derrame de óleo. Uma primeira abordagem em laboratório avaliou a toxicidade em *D. rerio* expostos a FAAs decorrentes do óleo que atingiu a costa em três níveis de intemperismo natural, óleo emulsificado submerso semelhante a “mousse” (FAA-OM) da Praia do Paiva, e duas amostras após 51 dias de intemperismo adicional depositados na areia da Praia da Ponta do Xaréu (FAA-OS) e aderidos a rochas (FAA-OR). A análise da composição de HPAs das FAAs indicou uma tendência clara de diminuição de naftalenos parentais e alquilados e aumento de fenantrenos comparando FAA-OM menos intemperizado e FAA-OS e FAA-OR mais intemperizados. A exposição a FAA-OS e FAA-OR mais intemperizadas foram indutores mais potentes de atraso no desenvolvimento do zebrafish, sugerindo que fenantrenos parentais e alquilados são relevantes para este atraso. No entanto, a exposição a FAA-OM menos intemperizada foi um indutor mais potente de falha no enchimento da bexiga natatória do que a FAA-OS e FAA-OR mais intemperizados, sugerindo que naftalenos parentais e alquilados são relevantes como causa desta falha. Diminuições nas frequências cardíacas e aumento nas deformidades cardíacas e esqueléticas foram observados em larvas expostas a todas FAAs. As menores concentrações de efeito observadas (CEO) para diferentes parâmetros de toxicidade de desenvolvimento estão dentro das concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ambientalmente relevantes e espécies locais podem ter sido afetadas. Uma segunda abordagem em laboratório abordou potenciais mecanismos de expressão gênica cruciais para o desenvolvimento da bexiga natatória afetados pela exposição das fases embriolarvais de *Danio rerio* a FAA-OM. A exposição a concentrações de 4,49 e 17,9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{HPAt L}^{-1}$ resultou na diminuição em 48 horas após a fertilização (hpf) da expressão dos genes responsáveis pelo desenvolvimento do tecido do epitélio (*hb9* e *sox2*), mesênquima (*has2*), mesotélio (*elovl1a*) da bexiga natatória, e pelo comportamento de “swim-up” quando a larva enche a bexiga inicialmente abocanhando ar (*sox2*). Essa diminuição da expressão destes genes correlacionou-se com alta frequência de bexigas natatórias não infladas em 96 e

168 hpf, chegando a 100% em larvas expostas a concentrações mais altas (35,9 e 71,8 $\mu\text{g-}\Sigma\text{HPAt L}^{-1}$). Os níveis de enzimas antioxidantes SOD e CAT foram inibidos, enquanto GST e GSH aumentaram nas larvas expostas. A velocidade e distância média de natação também foram reduzidas em larvas expostas à menor concentração testada. Os resultados sugerem que a FAA-OM pode inibir a transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento da bexiga natatória e no comportamento de natação adequado, impactando potencialmente a viabilidade e o sucesso das larvas em desenvolvimento e, conseqüentemente, o recrutamento de peixes. Uma terceira abordagem em laboratório avaliou o efeito na toxicidade para as fases iniciais de vida do *Danio rerio* após exposição a combinação da radiação ultra-violeta (UV) natural solar que é intensa na região equatorial onde ocorreu o derrame de óleo, em conjunto com os HPAs presentes na FAA-OM. A radiação UV da luz solar aumentou o potencial tóxico da exposição a FAA-OM, sendo que a concentração letal para 20% dos organismos expostos (LC20) diminuiu de 29,11 $\mu\text{g-}\Sigma\text{HPAt L}^{-1}$ na ausência de radiação UV (FAA-OM) para 8,42 $\mu\text{g-}\Sigma\text{HPAt L}^{-1}$ na exposição combinada (FAA-OM-UV). A exposição combinada à FAA-OM-UV também aumentou a toxicidade baseada em efeitos subletais, reduzindo a CEO, expressos por atrasos no desenvolvimento embrionário, pelo aumento da frequência de patologias e deformidades, pela diminuição do comprimento total e da área ocular. Os parâmetros bioquímicos indicaram indução de estresse oxidativo, possivelmente correlacionado com o aumento na frequência de patologias e atraso no desenvolvimento dos peixes. Na abordagem de campo focada em juvenis da espécie *Eugerres brasiliensis* coletados em 3 complexos estuarinos impactados pelo derrame de óleo dois anos após o pico do acidente, foram observados diferentes padrões de exposição a HPAs provenientes do óleo avaliada com base nos HPAs biliares, e de alterações biológicas com base em biomarcadores bioquímicos e de genotoxicidade. EROD e GST, relacionados à biotransformação de fase 1 e 2, respectivamente, apresentaram maior atividade em peixes do estuário de Barra de Catuama (BCEC), onde foi verificada menor bioconcentração de HPAs biliares. Por outro lado, EROD e GST apresentaram menor atividade em peixes dos estuários de Suape (SEC) e Rio Formoso (FRES), onde foi verificada maior bioconcentração de HPAs biliares. Foi verificada uma maior similaridade de efeitos nos peixes de FRES e SEC. A enzima SOD, importante na defesa antioxidante, mostrou-se inversamente proporcional às alterações nucleares, sugerindo que tais alterações podem estar relacionadas à inibição dessa enzima.

Palavras-chave: derrame de óleo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, intemperismo, radiação ultravioleta, biomarcadores, fases iniciais de vida.

ABSTRACT

The Brazilian coast was affected by oil spill that caused impacts on coastal aquatic ecosystems between 2019 and 2020. Toxicity, based on developmental, morphological, biochemical, and behavioral endpoints, was measured in the laboratory in *Danio rerio* early life stages (ELS) exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present in water-accommodated fractions (WAFs) of oil samples that reached the coast. Exposure biomarkers, biochemical and genotoxicity, were also evaluated in the field in the mojarra *Eugerres brasiliensis* residing in 3 estuaries impacted by the oil spill. An initial laboratory approach assessed toxicity in *D. rerio* exposed to WAFs resulting from the oil that reached the coast at three levels of natural weathering: submerged emulsified oil similar to "mousse" (WAF-OM) from Paiva beach, and two samples after 51 days of additional weathering deposited on the sand of Ponta do Xaréu beach (WAF-OS) and adhered to rocks (WAF-OR). The analysis of the PAH composition of the WAFs indicated a clear trend of decreasing parental and alkylated naphthalenes and increasing phenanthrenes when comparing less weathered WAF-OM and more weathered WAF-OS and WAF-OR. Exposure to more weathered WAF-OS and WAF-OR were more potent inducers of delayed zebrafish development, suggesting that parental and alkylated phenanthrenes are relevant to this delay. However, exposure to less weathered WAF-OM was a more potent inducer of swim bladder inflation failure than more weathered WAF-OS and WAF-OR, suggesting that parental and alkylated naphthalenes are relevant as a cause of this failure. Decreases in heart rates and increases in cardiac and skeletal deformities were observed in larvae exposed to all WAFs. The lowest observed effect concentrations (LOECs) for different developmental toxicity parameters are within environmentally relevant polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations, and local species may have been affected. A second laboratory approach addressed potential gene expression mechanisms crucial for swim bladder development affected by exposure of ELS *D. rerio* to WAF-OM. Exposure to concentrations of 4.49 and 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHs L}^{-1}$ resulted in a decrease at 48 hpf in the expression of genes responsible for the development of epithelium tissue (hb9 and sox2), mesenchyme (has2), mesothelium (elovl1a) of the swim bladder, and for the "swim-up" behavior when the larva initially fills the bladder by gulping air (sox2). This decrease in the expression of these genes correlated with a high frequency of uninflated swim bladders at 96 and 168 hpf, reaching 100% in larvae exposed to higher concentrations (35.9 and 71.8 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHs L}^{-1}$). The levels of antioxidant enzymes SOD and CAT were inhibited, while GST and GSH increased in exposed larvae. Swimming speed and average distance were

also reduced in larvae exposed to the lowest concentration tested. The results suggest that the complex mixture of PAHs from WAF-OM may inhibit the transcription of genes involved in swim bladder development and proper swimming behavior, potentially impacting the viability and success of developing larvae and, consequently, fish recruitment. A third laboratory approach evaluated the effect on toxicity for the early life stages of *D. rerio* after exposure to the combination of natural solar ultraviolet (UV) radiation, which is intense in the equatorial region where the oil spill occurred, in conjunction with the PAHs present in WAF-OM. Solar UV radiation increased the toxic potential of exposure to WAF-OM, with the lethal concentration for 20% of exposed organisms (LC20) decreasing from 29.11 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHs L}^{-1}$ in the absence of UV radiation (WAF-OM) to 8.42 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHs L}^{-1}$ in the combined exposure (WAF-OM-UV). The combined exposure to WAF-OM-UV also increased toxicity based on sublethal effects, reducing the no observed effect concentration (NOEC), expressed by delays in embryo development, increased frequency of pathologies and deformities, decreased total length and eye area. Biochemical parameters indicated induction of oxidative stress, possibly correlated with the increased frequency of pathologies and delayed fish development. In the field approach focused on juveniles of the species *Eugerres brasiliensis* collected in 3 estuarine complexes impacted by the oil spill two years after the peak of the accident, different patterns of exposure to PAHs from the oil, assessed based on biliary PAHs, and biological changes, based on biochemical and genotoxicity biomarkers, were observed. Ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) and glutathione-S-transferase (GST), related to phase 1 and 2 biotransformation, respectively, showed higher activity in fish from the Barra de Catuama estuary (BCEC), where lower biliary PAH bioconcentration was observed. On the other hand, EROD and GST showed lower activity in fish from the Suape (SEC) and Rio Formoso (FRES) estuaries, where higher biliary PAH bioconcentration was observed. A greater similarity of effects was observed in fish from FRES and SEC. The SOD enzyme, important in antioxidant defense, was inversely proportional to nuclear alterations, suggesting that such alterations may be related to the inhibition of this enzyme.

Keywords: oil spill, polycyclic aromatic hydrocarbons, weathering, ultraviolet radiation, biomarkers, early life stages.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO GERAL.....	17
II FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
1.1 CONTAMINAÇÃO QUÍMICA DOS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS ...	19
1.2 ECOTOXICOLOGIA DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS.....	21
1.3 POLUIÇÃO POR PETRÓLEO E DERIVADOS	22
1.3.1 Acidentes e contaminação dos ecossistemas por derivados de petróleo	23
1.3.2 Potencial tóxico dos derivados de petróleo.....	27
1.4 BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO E MODELOS BIOLÓGICOS UTILIZADOS.....	29
1.4.1 Carapeba <i>Eugerres brasilianus</i>	30
1.4.2 Zebrafish <i>Danio rerio</i>	31
1.5 CATEGORIAS DE BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO UTILIZADOS	32
1.5.1 Biomarcadores bioquímicos de biotransformação de Fase 1 e 2.....	32
1.5.1.1 Líquido biliar como destino da biotransformação dos HPAs	33
1.5.2 Biomarcador de neurotoxicidade	34
1.5.3 Biomarcadores de estresse oxidativo	35
1.5.4 Biomarcador morfológico do desenvolvimento de <i>DANIO RERIO</i> ...	37
1.5.4.1 Biomarcadores morfológicos de teratogenicidade em <i>Danio rerio</i> ...	39
1.5.4.2 Biomarcadores morfológicos do desenvolvimento do sistema cardiorrespiratório em <i>Danio rerio</i>	41
1.5.4.3 Biomarcadores morfológicos do desenvolvimento da notocorda, curvaturas dorsais e nadadeiras em <i>Danio rerio</i>	42
1.5.4.4 Biomarcadores morfológicos do desenvolvimento do crânio, olho, alterações pigmentares e necroses em <i>Danio rerio</i>	44
1.5.5 Biomarcadores relacionados a bexiga natatória do <i>Danio rerio</i>	46

1.5.5.1	Biomarcadores de expressão gênica relacionados ao desenvolvimento da Bexiga natatória em <i>Danio rerio</i>	46
1.5.5.2	Biomarcadores comportamentais no desenvolvimento da bexiga natatória em <i>Danio rerio</i>	47
1.5.6	Biomarcador de Genotoxicidade.....	49
1.6	OBJETIVOS	50
1.6.1	Objetivo geral manuscrito I - (Toxicity of the oil spilled on the Brazilian coast at different degrees of natural weathering to early life stages of the zebrafish <i>Danio rerio</i>).....	50
1.6.1.1	Objetivos específicos	50
1.6.1.2	Hipótese	50
1.6.2	Objetivo geral manuscrito II - (Ecotoxicological effects of crude oil to early life stages of <i>Danio rerio</i>: a molecular, morphological and behavioral approach focused on swim bladder development)	50
1.6.2.1	Objetivos específicos	51
1.6.2.2	Hipótese	51
1.6.3	Objetivo geral manuscrito III - (Photoenhanced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from Brazilian oil spill water accommodated fraction (WAF) on <i>Danio rerio</i> early life stages exposed to natural sunlight)	51
1.6.3.1	Objetivos específicos	51
1.6.3.2	Hipótese	52
1.6.4	Objetivo geral manuscrito IV - (Avaliação toxicológica de três complexos estuarinos ao longo do litoral pernambucano utilizando o peixe sentinela <i>Eugerres brasiliensis</i> como modelo biológico: uma abordagem bioquímica, genotóxica e avaliativa de metabolitos biliares de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos)	52
1.6.4.1	Objetivos específicos	52
1.6.4.2	Hipótese	52
	REFERÊNCIAS	53

III MANUSCRITO 1 (Toxicity of the oil spilled on the Brazilian coast at different degrees of natural weathering to early life stages of the zebrafish *Danio rerio*) - Published in Marine Pollution Bulletin – doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.11681964

ABSTRACT	64
1.1 INTRODUCTION	64
1.2 MATERIAL AND METHODS.....	67
1.2.1 Oil sampling and preparation of the oil water accommodated fraction	67
1.2.2 Chemical analysis of PAHs in oil water accommodated fractions.....	68
1.2.3 Zebrafish culture and experimental design	69
1.2.4 Mortality rates	70
1.2.5 General morphology score	70
1.2.6 Frequency of developmental abnormalities	71
1.2.7 Heart rate	71
1.2.8 Morphometric measurements	71
1.2.9 Statistical analysis.....	71
1.3 RESULTS.....	72
1.3.1 Chemical analysis of PAHs in oil water accommodated fractions.....	72
1.3.2 Mortality rates	73
1.3.3 General morphology score	74
1.3.4 Frequency of developmental abnormalities	74
1.3.5 Heart rate	75
1.3.6 Morphometric measurements	76
1.4 DISCUSSION.....	77
CONCLUSION.....	82
REFERENCES	82
ANEXO-1	88
ANEXO-2	89

ANEXO-3	90
IV MANUSCRITO 2 (Ecotoxicological effects of crude oil to early life stages of <i>Danio rerio</i>: a molecular, morphological and behavioral approach focused on swim bladder development).....	91
ABSTRACT	91
1.1 INTRODUCTION	92
1.2 MATERIALS AND METHODS	94
1.2.1 Oil water accommodated fraction (WAF) preparation and chemical analysis	94
1.2.2 Experimental design	95
1.2.3 mRNA gene expression analysis.....	96
1.2.4 Biochemical assessment.....	97
1.2.4.1 Glutathione-S-transferase (GST)	97
1.2.4.2 Total glutathione (GSH)	97
1.2.4.3 Superoxide dismutase	98
1.2.4.4 Catalase	98
1.2.4.5 Reactive oxygen species	98
1.2.5 Swim bladder area.....	98
1.2.6 Swimming behavior	98
1.2.7 Statistical analysis.....	99
1.3 RESULTS.....	99
1.3.1 Chemical analysis of PAHs in oil water accommodated fraction	99
1.3.2 RNA transcript expression during zebrafish development	100
1.3.3 Biochemical biomarkers at 96 hpf	102
1.3.4 Swim bladder morphology.....	103
1.3.5 Swimming activity	105
1.4 DISCUSSION.....	106
CONCLUSION.....	108

REFERENCES	109
ANEXO-1	113
ANEXO-2	114
V MANUSCRITO 3 (Photoenhanced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from Brazilian oil spill water accommodated fraction (WAF) on <i>Danio rerio</i> early life stages exposed to natural sunlight)	116
ABSTRACT	116
1.1 INTRODUCTION	116
1.2 MATERIALS AND METHODS	118
1.2.1 Zebrafish culture and experimental design	118
1.2.2 UV radiation measurement	119
1.2.3 Oil water accommodated fraction (WAF) preparation and chemical analysis	119
1.2.4 Mortality and General Morphology Score.....	120
1.2.5 General Teratology Score and pathology.....	120
1.2.6 Heart rate	121
1.2.7 Morphometric measurement.....	121
1.2.8 Biochemistry assessment.....	121
1.2.8.1 Homogenate production and protein quantification	121
1.2.8.2 Glutathione-S-transferase (GST)	121
1.4.1.1 Total glutathione (GSH)	122
1.4.1.2 Reactive oxygen species (ROS).....	122
1.4.1.3 Superoxide dismutase (SOD)	122
1.4.1.4 Catalase (CAT)	122
1.4.1.5 Lipid Peroxidation (LPO).....	123
1.2.9 Statistical evaluation	123
1.3 RESULTS.....	123

1.3.1	Oil water accommodated fraction preparation and chemical analysis	123
1.3.2	UV radiation measurement	124
1.3.3	Mortality and General Morphology Score.....	124
1.3.4	General Teratology Score and pathology.....	127
1.3.5	Heart rate	129
1.3.6	Morphometric measurement	129
1.3.7	Biochemistry assessment.....	131
1.4	DISCUSSION.....	132
	CONCLUSION.....	136
	REFERENCES	136
	ANEXO-1	142
	ANEXO-2	143
	ANEXO-3	144
	ANEXO-4.....	145
	ANEXO-5	146

VI MANUSCRITO 4 (Avaliação toxicológica de três complexos estuarinos ao logo do litoral pernambucano utilizando o peixe sentinela <i>Eugerres brasiliensis</i> como modelo biológico: uma abordagem bioquímica, genotóxica e avaliativa de metabolitos biliares de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos).....		147
---	--	------------

	RESUMO.....	147
1.1	INTRODUÇÃO.....	148
1.2	MATERIAL E METODOS.....	150
1.2.1	Locais de coleta	150
1.2.2	Coleta dos animais e processamento inicial das amostras biológicas	152
1.2.3	Avaliação dos HPAs biliares.....	152
1.2.4	Avaliação bioquímica	152

1.2.4.1	Etoxiresorufina – O – desetilase (EROD)	153
1.2.4.2	Glutathione- S- transferase (GST)	153
1.2.4.3	Glutathione total (GSH).....	153
1.2.4.4	Catalase (CAT)	154
1.2.4.5	Superóxido Dismutase (SOD)	154
1.2.4.6	Peroxidação Lipídica (POL)	154
1.2.4.7	Acetilcolinesterase (AChE)	155
1.2.5	Avaliação de anormalidades nucleares.....	155
1.2.6	Testes estatísticos	155
1.3	RESULTADOS	156
1.3.1	Avaliação de metabólitos biliares.....	156
1.3.2	Avaliação bioquímica	157
1.3.3	Avaliação das anormalidades nucleares.....	159
1.4	DISCUSSÃO	159
	CONCLUSÃO	162
	REFERÊNCIAS	163
	ANEXO-1	167
	ANEXO-2	168
	ANEXO-3.....	169
	ANEXO-4.....	170
	CONCLUSÃO GERAL.....	171

I INTRODUÇÃO GERAL

O acidente com petróleo na costa brasileira afetou cerca de 3000 km de costa, com um derrame total de aproximadamente 5400 toneladas de resíduo de petróleo emulsificado (SOARES *et al.*, 2022; ZACHARIAS; GAMA; HARARI; *et al.*, 2021). As simulações, obtidas através de uma análise de modelagem retrospectiva, indicam que o incidente teve seu início entre meados de junho e julho de 2019, ocorrendo a cerca de 500 km da costa, onde o petróleo foi espalhado ao longo da costa do país influenciado pelas correntes marítimas (FIORAVANTI, 2020; ZACHARIAS; GAMA; FORNARO, 2021). A análise geoquímica dos resíduos de petróleo, realizada posteriormente, revelou características compatíveis com petróleo de origem venezuelana (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; REDDY *et al.*, 2022). No entanto, a investigação conduzida pela polícia federal, para determinar a responsabilidade pelo desastre, concluiu que o acidente foi causado pelo petroleiro Boubolina, sob administração da empresa grega Delta Tankers, que estaria transportando petróleo da Venezuela para Singapura (FEDERAL, 2022).

O estado de Pernambuco registrou 1700 toneladas coletadas ao longo do seu litoral, correspondendo a 31,16% do total coletado em toda costa brasileira afetada (SOARES *et al.*, 2022). Apesar dos recifes barrarem parte do petróleo que avançou em direção à costa, as oscilações de maré permitiram a passagem das massas flutuantes de petróleo através dos recifes que se depositaram nas praias e manguezais. Nos estuários, as diferentes mudanças de salinidade e densidade da água permitiram a deposição de petróleo entre as raízes dos mangues, dificultando sua retirada destas superfícies irregulares (MAGALHÃES *et al.*, 2022; MAGRIS *et al.*, 2020). No entanto, no mar e em superfícies menos acidentadas a textura emulsificada facilitou sua remoção que impedia que o material se espalhasse ou se dispersasse em gotículas pequenas como ocorre em acidentes com o petróleo líquido.

Costões rochosos como na Praia de Muro Alto, praias arenosas e praias com formações recifais como nas Praias do Paiva, Catuama, Pedra do Xaréu e Suape presentes em extensas faixas do litoral pernambucano foram impactadas por resíduos deste petróleo que se dissolveu para a coluna de água, gerando concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) relevantes, alcançando concentrações de 0,75 a 7,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de HPAs totais (ΣHPAt) (MELO ALVES *et al.*, 2024). Isso provocou situações de exposição de organismos adultos e estágios iniciais de vida (EIV) a diferentes concentrações de HPAs. O Brasil é um país tropical e o óleo atingiu a costa pernambucana em latitudes elevadas próximas ao Equador, onde são verificados altos níveis de radiação solar e radiação ultravioleta (UV)

(PEREIRA *et al.*, 2017). A exposição combinada de organismos aquáticos na fase larval a radiação UV e HPAs pode resultar na indução da toxicidade para organismos aquáticos (ROBERTS *et al.*, 2017).

A permanência do petróleo nas áreas impactadas induziu o surgimento de patologias nos EIV dos peixes residentes como edemas e escolioses (DE SOUZA *et al.*, 2022), já em adultos foi observada bioacumulação de HPAs em bile e alterações de marcadores de estresse oxidativo e biotransformação (MELO ALVES *et al.*, 2024). Além disso, recifes de corais impactados pelo óleo apresentaram uma redução na riqueza de espécies da fauna bentônica e na sua abundância populacional (CRAVEIRO *et al.*, 2021; LIRA *et al.*, 2021; SANTANA *et al.*, 2022), indicando que o impacto do petróleo prejudicou os ecossistemas afetados em nível de comunidade. Apesar dos diferentes processos de intemperização serem responsáveis pela redução da concentração dos HPAs nestes ambientes, tem sido observado que o mesmo processo é capaz de gerar diferentes composições de espécies químicas de HPAs com maior potencial tóxico para EIV a medida em que os HPAs de baixo peso molecular evaporam ou se degradam (MARIZ JR *et al.*, 2024).

A dissolução de HPAs de petróleo pode gerar uma mistura potencialmente tóxica para os organismos aquáticos, entre os quais os EIV de peixes são possivelmente os mais sensíveis (CHERR *et al.*, 2017; HODSON, 2017). Em laboratório é possível simular essa dissolução de HPAs e outros compostos lixiviados do óleo para a água por meio da preparação de frações acomodadas em água de óleo (FAA) (SINGER *et al.*, 2000). A exposição de peixes em EIV a concentrações da magnitude de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} de HPAs pode causar anormalidades no desenvolvimento de embriões de peixes e larvas, incluindo efeitos relacionados ao desenvolvimento e função cardíaca e subsequentes alterações fisiológicas e comportamentais que podem afetar o recrutamento para populações adultas (CHERR *et al.*, 2017; INCARDONA *et al.*, 2015; PASPARAKIS *et al.*, 2019).

O *Danio rerio* ou zebrafish é um modelo biológico amplamente utilizado pelas suas características fisiológicas e morfológicas embrionárias que nos permite avaliar o desenvolvimento de seus órgãos e patologias durante a embriogênese. Além disso, o zebrafish tem sido utilizado em uma ampla variedade de estudos de toxicidade com petróleo (LI *et al.*, 2018; RANGES *et al.*, 2024). Os estuários de Barra de Catuama, Rio Formoso e Suape foram impactados pelo óleo que atingiu a costa pernambucana, onde reside o peixe *Eugerres brasiluanus*, comum em regiões de estuário até a fase juvenil, onde se alimenta e busca refúgio entre o manguezal, migrando para o mar apenas na fase adulta (FIGUEIREDO, 1980;

FRANCO *et al.*, 2012). Nesse contexto, o objetivo desta tese foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos do petróleo que chegou ao litoral brasileiro através de experimentos em laboratório com a fase embriolarval do peixe *Danio rerio*, e com estudos de campo focados em juvenis de *Eugerres brasiliensis* residentes nos manguezais afetados pelo petróleo no estado de Pernambuco.

II FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 CONTAMINAÇÃO QUÍMICA DOS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

Historicamente as populações humanas tendem a se desenvolver próximas a corpos hídricos, devido aos benefícios para a captação de água, para manutenção das suas atividades de subsistência como a agricultura e manutenção de atividades diária, como descarte de efluentes originados destas mesmas atividades (ZHANG *et al.*, 2015). Contudo o advento da revolução industrial proporcionou o desenvolvimento da ciência e tecnologia e como consequência o crescimento e uma maior longevidade das populações humanas. Contudo, o desenvolvimento desordenado avançou sem a concomitante implementação de medidas eficazes para mitigar seu crescente impacto ambiental. Essa trajetória resultou em um aumento significativo no descarte de efluentes contendo substâncias que até então eram inéditas nos ecossistemas. Ainda com pouca ou nenhuma medida que compreendesse o potencial tóxico de determinadas substâncias para os ecossistemas.

Apesar de todo o movimento ambientalista entre as décadas de 60 e 70 para o que vinha sendo descartado na natureza de forma deliberada, as populações humanas não mudaram seu ritmo de produção ou ao menos reduziram o número de substâncias. Pelo contrário, hoje existem bem mais substâncias químicas que existia dez anos atrás ou muito antes disso. O desenvolvimento da indústria química não só tem cada vez mais produzindo substâncias como sofisticou e aprimorou muitas delas. Consequentemente, rios e estuários configuram-se como sistemas aquáticos de crescente complexidade química, resultante da presença de múltiplos poluentes em baixas concentrações, os quais podem interagir de forma isolada, sinérgica ou antagônica, ter seus efeitos potencializados ou atenuados por variáveis ambientais, ou sofrer processos de biotransformação (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006). Os cuidados com estes corpos hídricos corriqueiramente é limitado apenas a avaliação da qualidade das águas sem levar em consideração a estrutura do ecossistema, o habitat físico o fluxo de energia que pode ser desestabilizado e causar danos a estes ambientes (POFF *et al.*, 1997).

De fato hoje são classificadas cerca de 350.000 substâncias e misturas produzidas pelo homem das quais 50.000 possuem fórmula desconhecida ou não divulgadas e 70.000 foram descritas de maneira ambígua (WANG *et al.*, 2020). Desta forma rios que cortam grandes cidades são os que mais recebem cargas de poluentes, possuindo altas concentrações de contaminantes, sendo denominados rios urbanos. Neste contexto, estes rios são o destino de boa parte dos contaminantes que chegam a estes corpos hídricos por meio de efluentes domésticos, industriais e escoamento urbano (LÓPEZ-DOVAL *et al.*, 2013; WANHONG *et al.*, 2020). Além disso, a agricultura intensiva também é uma das principais causas da poluição difusa da água, levando à eutrofização e contaminação dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos com pesticidas e medicamentos veterinários (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006).

A fração de contaminantes não atenuada por processos de degradação, sorção ou sedimentação nos cursos fluviais é carregada para os manguezais, biomas de alta complexidade ecológica e significativa diversidade biológica. Os manguezais são ecossistemas únicos que hospedam ricos conjuntos de espécies, sendo lar de uma variedade de invertebrados e vertebrados. O manguezal desempenha um papel especial como habitat de berçário para juvenis de peixes cujos adultos ocupam outros habitats como recifes de coral e rios (KATHIRESAN *et al.*, 2001). Assim como os rios, que comportam historicamente populações humanas os litorais seguem no mesmo sentido, onde os manguezais são ainda hoje receptores de emissários que descarregam esgoto doméstico sem tratamento (ARAÚJO *et al.*, 2021). Alguns contaminantes comuns nos manguezais são hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), poluentes orgânicos persistentes (POPs), produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais e compostos desreguladores endócrinos que já foram detectados em vários compartimentos de mangue (água, sedimentos e biota) (BAYEN, 2012; SILVA *et al.*, 2021).

No Brasil a Lei nº 9.433 de 08 de janeiro de 1997 foi criada para definir infrações e penalidades, sendo conhecida como a “A lei das águas”, de maneira geral ela institui a Política Nacional de Recursos Hídricos com base no Sistema Nacional dos Recursos Hídricos (SINGERH). Além disso, a lei nº 9.984, de 17 de julho de 2000 cria e regulamenta a Agência Nacional das Águas (ANA) responsável pelo gerenciamento do SINGERH que atua no gerenciamento das bacias hidrográficas em âmbito federal. Um ponto importante para se destacar é que diferentes dos recursos hídricos, o gerenciamento do saneamento básico geralmente é de competência dos estados ou empresas privadas. Em Pernambuco a Agência Estadual de Meio Ambiente (CPRH) é responsável pelo monitoramento da qualidade das

águas dos rios, reservatórios e balneabilidade das praias. Apesar de todos os cuidados e monitoramento destas áreas, os rios e manguezais brasileiros sofrem diariamente com cargas massivas de esgoto doméstico sem tratamento, lançamento de efluentes sem tratamento nos rios e o descarte de resíduos sólidos que podem carrear diferentes classes de contaminantes por afinidade com material. A persistência desta problemática, apesar da sua recorrente menção, acarreta um risco substancial à biodiversidade destes ecossistemas.

1.2 ECOTOXICOLOGIA DE ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS

A ecotoxicologia é junção da toxicologia clássica que compõem o estudo dos efeitos tóxicos de substâncias, com a ecologia que visa o estudo das interações dos organismos com o meio ambiente. O termo ecotoxicologia surgiu em 1969 e foi introduzido por Truhalt (WALKER, 2005). Desta forma a ecotoxicologia surge como uma área que estuda como as substâncias químicas interagem com os organismos e quais as consequências destas interações para os ecossistemas. A definição por RAND; *et al.* (1995) diz que se trata do estudo do efeito de produtos químicos manufaturados, atividades antropogênicas e naturais (coletivamente denominados agentes ou substâncias tóxicas) nos organismos em vários níveis de organização, desde o subcelular, passando pelo indivíduo, até as comunidades e ecossistemas.

A ecotoxicologia vem ganhando grande visibilidade com o avanço das tecnologias e o desenvolvimento humano, principalmente pelas consequências de erros ou negligência no manuseio e na criação de substâncias tóxicas e seus derivados. Assim como a biologia da conservação, a ecotoxicologia surgiu como uma das ciências da crise, pois são a resposta a variados problemas ambientais consequentes do desenvolvimento humano. O desenvolvimento e crescimento das ciências da crise são importantes ao mesmo tempo que são preocupantes. Na maioria dos casos é acompanhada de desastres ambientais orquestrados pelo desenvolvimento humano. Neste contexto, os ecossistemas aquáticos são o destino de parte significativa de diferentes grupos de contaminantes como os metais (BAYEN, 2012), POP (WENNING *et al.*, 2014), biocidas (MARTINS *et al.*, 2018) dentre outros. O principal motivo que norteia os ecossistemas aquáticos como destino é o próprio ciclo da água que constantemente adsorvem contaminantes do ar, lixivia o solo e movimenta concentrados de contaminantes em regiões intermitentes de fluxo de água.

A complexidade e diversidade dos ambientes aquáticos e as diferentes pressões as quais eles estão submetidos os fazem matrizes complexas para avaliação e determinação de compostos causadores de toxicidades nos organismos residentes. Desta forma existe a necessidade cada vez maior de estratégias para avaliar a contaminação e poluição, pois o uso

de produtos químicos industriais e a demanda por água limpa estão aumentando constantemente (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006). A partir da percepção e necessidade de fontes hídricas de qualidade para consumo humano e a fim de reduzir os impactos para os ecossistemas aquáticos o desenvolvimento de métodos avaliativos de qualidade hídrica por meio de testes de toxicidade surge como resposta para redução e precaução de possíveis impactos ambientais.

O uso de animais para avaliação de toxicidade faz parte de um conjunto de ferramentas necessário para avaliação de risco de efluentes, afluentes e substâncias. Contudo o uso de organismos vivos para avaliação de risco de ecossistemas é bem mais recente, sendo inicialmente utilizado em prol do benefício humano (EMBRY *et al.*, 2010). Apesar disso, foi visto que além do benefício humano também era possível utilizar estes animais para a avaliação da qualidade do ambiente, a fim de obter um diagnóstico sobre a saúde de determinado ecossistema. Nesse contexto de destacam modelos biológicos aquáticos, como o *Danio rerio*, que é um teleósteo de água doce, *Daphnia magna*, invertebrado de água doce, *Artêmia spp.*, invertebrado de água salgada e os organismos sentinelas que já estão inseridos no problema que será avaliado.

A utilização de peixes para avaliação de ecossistemas aquáticos é de grande relevância social, econômica e ecológica, dada a importância deste grupo para a sociedade e meio ambiente, e têm sido utilizados com destaque ao longo da história da ecotoxicologia (DI GIULIO; HINTON, 2008). Parâmetros ecotoxicológicos avaliados em peixes se tornaram ferramentas importantes para a análise do impacto e do risco ambiental dos contaminantes químicos, e para o monitoramento dos ecossistemas aquáticos. Isto se dá principalmente pela sua ampla distribuição nestes ecossistemas, constituindo em uma diversidade de cerca de 32.000 espécies, sendo também o maior grupo de vertebrados quando comparado a outros grupos como mamíferos, aves e répteis (HELFMAN, 2013).

1.3 POLUIÇÃO POR PETRÓLEO E DERIVADOS

Os combustíveis fósseis como o petróleo, gás natural e carvão mineral que conhecemos são uma fonte de energia esgotável originado da decomposição de matéria orgânica que por um longo período passou por processos geológicos extremos. Os depósitos de petróleo são formados como consequência do aumento das temperaturas que acompanham o soterramento progressivo de matéria orgânica nas profundezas das bacias sedimentares (SEEWALD, 2003). Grande parte destes combustíveis fósseis data da era Paleozoica, mais precisamente do

carbonífero a cerca de 300 milhões de ano, período da história geológica da terra em que matéria orgânica era abundante no planeta (MIALL, 1996).

O petróleo têm sido explorado desde o surgimento da civilização humana, particularmente na antiga Mesopotâmia e em outras partes do Oriente Médio, onde era utilizado como asfalto para a construção de estradas, aroeira para impermeabilizar navios, arquitetura e hidráulica, como componentes essenciais para medicamentos e outros tratamentos (MAUGERI, 2006). A indústria do petróleo teve seu nascimento em 1859, com a perfuração do primeiro poço de extração por Edwin L. Drake na Pensilvânia-USA, seguindo ordens da empresa “*Seneca Oil Company*” que já extraía petróleo por vias de exsudação natural, uma maneira bem mais lenta de se obter o óleo (TARBELL, 2018). Foi só com o surgimento das máquinas de guerra e durante a primeira guerra mundial que o mundo entendeu a importância e ao potencial do petróleo como fonte de energia. O crescimento da demanda do petróleo para as diferentes atividades e construção de materiais tomou grandes proporções com o passar dos anos. A indústria do petróleo que em 1970 produzia 45 milhões de barris por dia (Mbbl d⁻¹) em 2015 estava produzindo cerca de 95 milhões (Mbbl d⁻¹). Dentre os países que mais refinam petróleo estão EUA, China e Rússia (JING *et al.*, 2020).

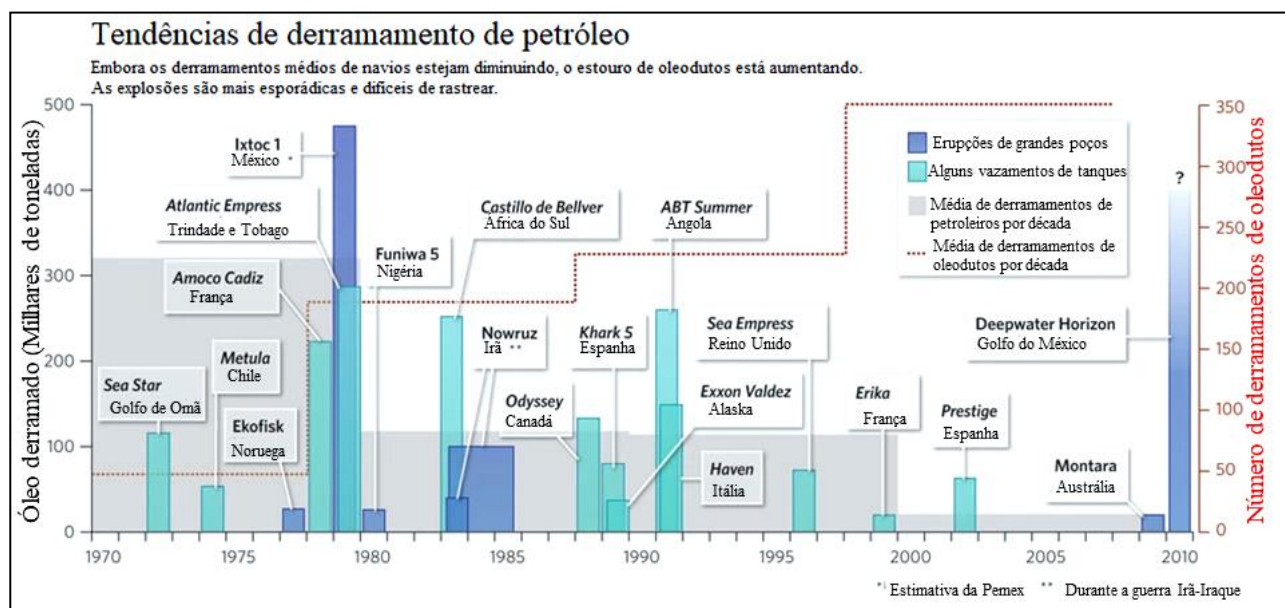
O refinamento do petróleo é um conjunto de processos que transformam o óleo cru (petróleo) em derivados de valor comercial como gasolina, nafta, querosene e óleo leve, por meio de instalações de refino, como destilação, craqueamento de petróleo pesado e dessulfuração (LIM *et al.*, 2020). O refino do petróleo é um dos negócios mais rentáveis produzidos pela humanidade, isto se dá principalmente pela necessidade do mundo moderno em fontes energéticas. A importância do petróleo é tamanha que motiva guerras, move grandes economias e basicamente está presente de alguma maneira na vida das pessoas. A composição do petróleo varia do poço em que está sendo extraído, contudo de maneira geral ele é composto por 97% de hidrocarbonetos e os demais 3% de outros elementos considerados “contaminantes” como os heteroátomos (N, O, S) que junto aos hidrocarbonetos podem possuir mais de 20.000 composições elementares distintas (CHONS) (MARSHALL *et al.*, 2004; NRC, 1985). No petróleo, as principais classes de hidrocarbonetos presentes são a dos hidrocarbonetos alifáticos e os hidrocarbonetos aromáticos que estão presentes em pequenas quantidades, mas são as que possuem maior potencial tóxico em pequenas concentrações.

1.3.1 Acidentes e contaminação dos ecossistemas por derivados de petróleo

Nas últimas três ou quatro décadas, houve uma mudança na forma como o petróleo bruto chega ao ambiente marinho, anteriormente eram descargas operacionais da lavagem dos

cargueiros e desastres nos transportes (navios petroleiros). Recentemente os vazamentos dos oleodutos são as principais causas da introdução do petróleo no ambiente e vêm se intensificando (Figura 1) (JERNELÖV, 2010). Apesar disso, são os acidentes com navios petroleiros e plataformas de extração que recebem maior visibilidade dado o volume liberado no ambiente em um curto espaço de tempo, como foram os casos do petroleiro *Exxon Valdez* no Alasca e da sonda petrolífera *Deep Water Horizon* no golfo do México. As estimativas da quantidade de óleo derramado no oceano pela plataforma *Deep Water Horizon* variam. No entanto, a estimativa aceita pelo governo federal é de 4,8 milhões de barris de óleo entre 14 de abril a 20 de julho de 2010 (CAMILLI *et al.*, 2012). O desastre começou em 20 de abril de 2010 e foi um dos mais estudados e apresenta inúmeros trabalhos sobre o potencial tóxico do petróleo para a vida marinha. Isto se deu principalmente, pois durante o desastre foram utilizados 2,1 milhões de galões de dispersante que deixou quantidade considerável de HPAs biodisponíveis na coluna d'água (ALLAN *et al.*, 2012; KUJAWINSKI *et al.*, 2011).

Figura 1 - Histórico de alguns desastres com petróleo e relação entre os desastres com navios petroleiros e vazamentos de poços com vazamentos de oleodutos.



Fonte: JERNELÖV (2010) – Adaptada

Outro acidente que ganhou grande visibilidade foi com o navio petroleiro *Exxon Valdez* que encalhou nos recifes da Ilha Bligh no norte de Prince William Sound em 24 de março de 1989. Este acidente mostrou a capacidade de persistência do petróleo nos ecossistemas, sendo encontrado óleo pouco intemperizado em sedimentos superficiais, além de resquícios em 78 das 91 praias que foram impactadas quase 12 anos após o acidente (SHORT *et al.*, 2004). A preservação e soerguimento do petróleo e consequentemente a liberação de moléculas de HPAs nos ecossistemas aquático geram um tipo de exposição

crônica nos organismos, sendo capaz de aumentar o índice de mortalidade no local acometido (PETERSON *et al.*, 2003).

Os anos de 2019 e 2020 foram abalados por um dos acidentes ambientais mais catastróficos para os ecossistemas aquáticos costeiros do Brasil. No entanto, acidentes com petróleo no país não são novidade. Em janeiro do ano 2000, uma ruptura em um oleoduto que transportava petróleo bruto entre a base de extração e a refinaria vazou cerca de 1300 m³ de petróleo na Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, tornando-se o acidente mais grave envolvendo petróleo no Brasil até 2019. Outros dois acidentes ocorreram no mesmo ano, um no Canal de São Sebastião em São Paulo à devido colisão de um petroleiro, do qual vazou 86 mil litros de petróleo e o outro acidente ocorreu em uma refinaria no Paraná com cerca de 4000 m³ de petróleo vazado (GABARDO *et al.*, 2005; MENICONI *et al.*, 2002). No entanto, estes acidentes não chegaram nem perto do desastre ocorrido entre anos de 2019-2020 quando cerca de 5000 toneladas de petróleo intemperizado foram inicialmente removidos de 980 áreas litorâneas dentre elas praias e mangues (BRUM *et al.*, 2020).

Um fator importante e que facilitou a remoção de boa parte deste óleo, dos ecossistemas aquáticos foi o estado de intemperismo que o óleo chegou à costa brasileira. O óleo que atingiu a costa do Brasil apresentava aparência de alcatrão, com aspecto sólido e mais densa do que a água do mar, sugerindo que os processos de intemperismo, como evaporação, dissolução, emulsificação, biodegradação e foto-oxidação alteraram a composição original do petróleo bruto (LOURENÇO *et al.*, 2020). A textura se assemelhava a um mousse o que facilitou a remoção de dentro da água. A textura emulsificada ocorre a partir da adição de partículas de água em meio ao óleo fazendo essa amostra aparentar um volume maior de óleo do que realmente possui. Ao mesmo tempo que sua textura emulsificada facilitou sua remoção da água, também favoreceu a capacidade deste óleo em aderir em superfícies irregulares. Este fator possibilitou maior aderência do material a recifes de coral e arenito da costa brasileira, bem como às raízes irregulares de mangues que não só sofreram com o processo de adesão como também dificultaram a remoção deste material dado seu entrelaçamento. Isso gerou a deposição destas placas na região entre raízes como demonstrado na figura 2. Outro fato relacionado ao óleo emulsificado é a quantidade de água salgada internalizada por ele, potencializando o aumento de sua densidade o que pode ter favorecido o processo de sedimentação nas regiões de manguezal que possui uma salinidade variável.

Um ano após o acidente ainda era possível encontrar amostras de óleo com textura de betume semissólido. Estas partículas menores encontradas ainda abril de 2021 eram carregadas

pelo rio para a região da praia e do manguezal. A textura destas partículas era de betumem semissólido (Figura 3). A manutenção deste óleo nos ecossistemas aquáticos pode garantir a presença de HPAs na coluna d'água submetendo os organismos aquáticos a uma exposição crônica que sabidamente pode gerar danos ao organismo exposto (PETERSON *et al.*, 2003). Além disso, eventos climáticos mais energéticos podem soerguer parte desse óleo sedimentado facilitando ainda mais o processo descrito acima e que pode também estar sendo a causa do aparecimento de pelotas desse óleo ainda na região de foz dos rios quase dois anos após a remoção de quase todo o óleo visível nestes ambientes.

Figura 2 - Resquícios de petróleo intemperizado encontrados na foz do Rio Mamucabas no litoral norte do município de Tamandaré em 2021.



Figura 3 - Placas de óleo parcialmente aterradas no leito do mangue na região do Rio Mamucabas no litoral norte de Tamandaré em abril de 20



Fonte: Paulo Carvalho

1.3.2 Potencial tóxico dos derivados de petróleo

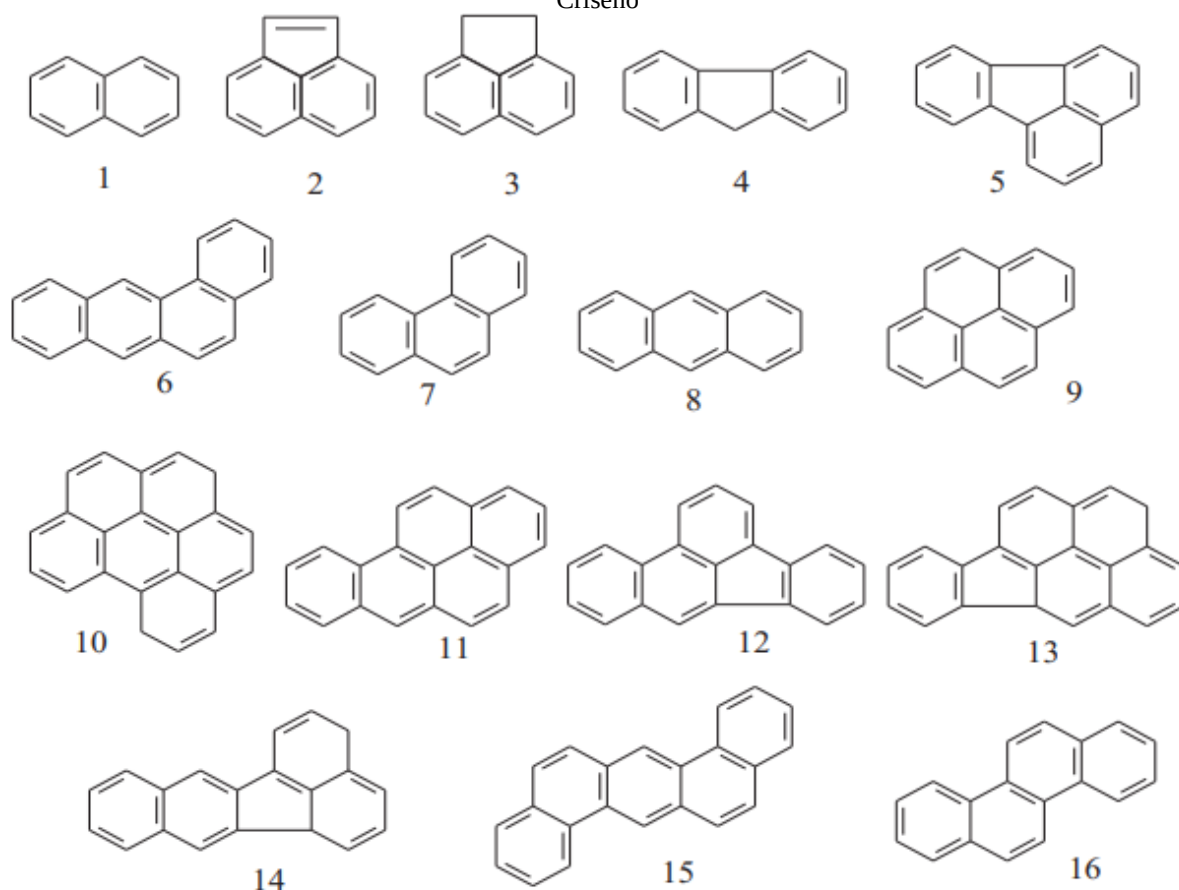
Os principais problemas relacionados a contaminação por petróleo e seus derivados estão associados à sua capacidade de liberar HPAs para o meio ambiente. Os HPAs possuem alta afinidade com tecido biológico devido sua natureza apolar, gerando toxicidade elevada em baixas concentrações para organismos de diferentes ecossistemas. A presença dos HPAs no meio ambiente pode ser decorrente de processos pirolíticos, constituindo queima incompleta de matéria orgânica e petrogênicos, sendo provenientes do petróleo e seus derivados (JOHNSON *et al.*, 2008). Os HPAs possuem baixa solubilidade em água e baixa volatilidade, além disso, a meia vida destes compostos varia de um a dois meses em ambientes aquáticos, de dois meses a dois anos em óleo e de dois meses a seis anos em sedimento, podendo variar muito a depender das condições do ambiente (MACKAY *et al.*, 1993; SHORT *et al.*, 2004).

Os HPAs constituem um grupo de poluentes lipofílicos que são onipresentes em ambientes marinhos e de água doce (ALVES *et al.*, 2021; DISSANAYAKE *et al.*, 2010). Esta capacidade lipofílica garante a estas moléculas quando dissolvidas na água a capacidade de se aderir a tecidos biológicos por diferentes vias de absorção como a respiratória, mucosa

gastrointestinal e cutânea. Os HPAs possuem grande potencial mutagênico, carcinogênico, sendo capaz de causar danos morfológicos e comportamentais em diferentes grupos de organismos aquáticos em especial em estágios iniciais do desenvolvimento (BOEHM *et al.*, 2007; VERGAUWEN *et al.*, 2015). Apesar disso os HPAs são facilmente metabolizados dentro dos organismos por processos de biotransformação, o que garante a redução das concentrações internas do composto. Nesse contexto, destacam-se as vias de biotransformação do complexo citocromo P450 e as glutatona-S-transferases.

Apesar de existirem mais de 100 moléculas de HPA conhecidas, 16 delas são consideradas prioritárias pela Agência Americana de Meio Ambiente *Environmental Protection Agency* (EPA)(Figura 4), pela sua onipresença em ambientes contaminados e pelo seu potencial de toxicidade, os quais têm sido amplamente estudados e avaliados no monitoramento de áreas contaminadas (ALTENBUGER *et al.*, 2003). Estes 16 HPAs são motivo de preocupação ambiental devido seu potencial tóxico para os seres humanos, outros organismos e à sua prevalência e persistência no ambiente.(HUSSAR *et al.*, 2012)

Figura 4 - Estruturas moleculares dos 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA). 1. Naftaleno, 2. Acenaftileno, 3. Acenafteno, 4. Fluoreno, 5. Fluoranteno, 6. Benzo[a]antraceno, 7. Fenantreno, 8. Antraceno, 9. Pireno, 10. Benzo[g,h,i]perileno, 11. Benzo[a]pireno, 12. Benzo[b]fluoranteno, 13. Indeno[1,2,3-cd]pireno, 14. Benzo[k]fluoranteno, 15. Dibenzo[a,h]antraceno e 16. Criseno



Fonte; QUEIROZ (2009).

1.4 BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO E MODELOS BIOLÓGICOS UTILIZADOS

VAN DER OOST *et al.* (2005) define biomarcadores de poluição como mudanças nas respostas biológicas relacionadas à exposição ou aos efeitos tóxicos de contaminantes químicos ambientais que podem variar desde respostas moleculares a celulares, respostas fisiológicas, morfológicas até mudanças comportamentais. Desta forma, os aspectos da mudança de qualquer estrutura, processo ou comportamento, que são expressos nos organismos a partir do desequilíbrio homeostático causado por processos patológicos podem ser avaliados quanto a suas alterações e isto os definem como biomarcadores.

O estudo dos diferentes extratos organizacionais biológicos nos permite entender sobre as diferentes vias de efeito tóxico e quais suas implicações em nível ecológico. A exemplo da aplicação de biomarcadores em diferentes extratos, podemos avaliar os motivos que levaram grandes acidentes com petróleo, como os que ocorreram na plataforma Deepwater Horizon, ou os cargueiros Exxon Valdez e Hebei Spirit, a reduzir populações e comunidades de organismos aquáticos (BARRON *et al.*, 2020). Os fatores que levam a reduções populacionais de animais aquáticos após a contaminação por petróleo são variados. É sabido que o petróleo e seus derivados podem ser letais para fases embrionárias de peixes (SØRHUS *et al.*, 2022), o que afeta diretamente no recrutamento destes organismos na manutenção da população. Os embriões que não morrem diretamente podem apresentar alterações hormonais (YANG *et al.*, 2019), deformidades morfológicas (INCARDONA *et al.*, 2004a) e alterações comportamentais (JOHANN *et al.*, 2020). Desta forma, estes alevinos ou larvas podem ser facilmente predados. Em peixes adultos, onde os sistemas de defesa interno estão mais desenvolvidos, mas ainda é comum observar alterações biológicas em marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e biotransformação (DAMÁSIO *et al.*, 2007; SMELTZ *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a análise da variação da resposta dos biomarcadores, conforme as doses ou concentrações de exposição é fundamental para entender os mecanismos de toxicidade dos contaminantes. Em particular, a identificação da dose ou concentração de exposição mínima capaz de gerar algum tipo de alteração no biomarcador medido no modelo biológico em questão fornece informações cruciais sobre a sensibilidade do organismo aos compostos tóxicos e os limiares de segurança para uso de compostos variados. Os modelos biológicos desempenham um papel crucial como ferramentas para estudos de impacto ambiental. Esses organismos ou sistemas biológicos são selecionados para simular e prever

como os poluentes podem afetar diferentes níveis de organização biológica, desde células até ecossistemas inteiros. Os resultados obtidos a partir desses modelos são fundamentais para a avaliação de riscos ambientais e para o desenvolvimento de estratégias eficazes de gestão e remediação de áreas contaminadas.

1.4.1 Carapeba *Eugerres brasilianus*

A família Gerreidae, conhecida popularmente como “carapebas”, constituem uma família da classe dos Perciformes com grande importância na pesca artesanal, comercial e esportiva, sendo bem apreciado na região Nordeste do Brasil para o consumo humano (BEZERRA, 2001). A carapeba (*Eugerres brasilianus* Cuvier, 1830) é distribuída no Atlântico ocidental, do Golfo do México até Santa Catarina no Brasil. A espécie *E. brasilianus* (Figura 5) é abundante nas regiões costeiras próximas a manguezais no Brasil, México e Cuba, onde é capturada por pesca artesanal com relativa facilidade (ALVAREZ-LAJONCHÈRE *et al.*, 1996; MENEZES *et al.*, 2009). O *E. brasilianus* possui uma parte de seu desenvolvimento em estuário e quando adulto transita entre o ambiente marinho e estuarino, sendo considerado eurialino, além de possuir hábitos alimentares onívoros (FIGUEIREDO, 1980; FRANCO *et al.*, 2012). É um animal que possui fases juvenis em estuários se qualifica como uma excelente espécie sentinela para avaliar a saúde dessas áreas. As espécies sentinelas, de modo geral, destacam-se como indicadores biológicos da qualidade ambiental, sendo organismos sensíveis a poluentes específicos e, por isso, utilizados para monitorar a presença e os efeitos de contaminantes nos diversos ecossistemas.

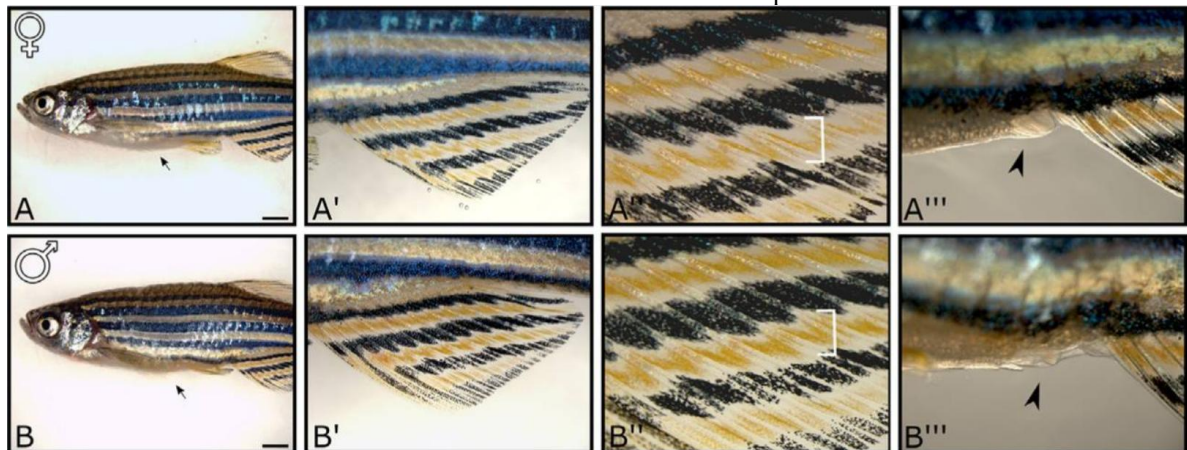
Figura 5 - *Eugerres brasilianus* capturado na região estuarina de Barra de Catuama



1.4.2 Zebrafish *Danio rerio*

O *Danio rerio* é um peixe teleósteo de água doce pertencente à família Cyprinidae com padrão de cores azul e prateado, natural das regiões montanhosas entre a Índia, Bangladesh e Nepal e que ganhou grande notoriedade no meio científico devido sua capacidade de fornecer respostas importantes de maneira rápida e barata. Estes animais chegam a fase adulta de 3 a 4 meses após a eclosão e possuem dimorfismo sexual marcado basicamente pela coloração amarelada da nadadeira caudal do macho (Figura 6), raramente excedem os 40 mm de comprimento padrão e seus ovos chegam até a 0,7 mm de diâmetro, sendo considerado grande quando comparado a outros animais do mesmo porte físico (SPENCE *et al.*, 2008). A expectativa de vida destes peixes é entre 2 a 4 anos e a alta produção de ovos por fêmea chega a aproximadamente 200 ovos/postura (SIEBEL, 2015).

Figura 6 -. Detalhes do dimorfismo sexual encontrado entre machos e fêmeas da espécie *Danio rerio* A e B demonstrando a diferença no tamanho do abdômem, A' e B' é possível ver a maior pigmentação na cauda do macho, a fêmea B'' tem menos pigmento que o macho B'', em A''' é possível ver a papila genital da fêmea que está ausente no macho B'''. A barra de escala possui 2 mm.



Fonte: Adaptada de KOSSACK *et al.* (2019)

O *Danio rerio* é um modelo biológico com significativa plasticidade de funções no meio científico. Tem sido observado que estágios iniciais de vida deste peixe é uma importante ferramenta para monitoramento de áreas degradadas (ALVES *et al.*, 2023; ALVES *et al.*, 2021). Seu papel na medicina e biomedicina vem crescendo atualmente devido às suas características genéticas. A pesquisa com *D. rerio* melhorar a compreensão dos papéis detalhados de genes específicos em doenças humanas, tanto raras quanto comuns, devido seus 70% de seus genes ortólogos com a espécie humana (HOWE *et al.*, 2013). Três são as grandes vantagens do uso do zebrafish na pesquisa, o baixo custo, o rápido desenvolvimento e o repertório de ferramentas desenvolvidas que descrevem atributos importantes da biologia desta espécie (SIEBEL, 2015). Diante das vantagens apresentadas pelo *D. rerio*, este organismo vem sendo amplamente utilizado em testes ecotoxicológicos como modelo

biológico. Foi avaliado que o *Zebrafish Embryotoxicity Test* (ZFET) é um método robusto com uma boa reprodutibilidade intra e interlaboratorial para a maioria dos produtos químicos (BUSQUET *et al.*, 2014). Além disso, a ampla gama de parâmetros e fisiológicos, patológicos e comportamentais fazem deste organismo um excelente modelo biológico para entender o efeito de contaminantes ou poluentes em um curto espaço de tempo e com poucos gastos.

1.5 CATEGORIAS DE BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO UTILIZADOS

1.5.1 Biomarcadores bioquímicos de biotransformação de Fase 1 e 2

O processo de desintoxicação de xenobióticos, que inclui os HPAs, inclui as enzimas do complexo enzimático P450 e acontecem em sua maior parte nos hepatócitos (STEGEMAN *et al.*, 1997). Nos peixes as P450 são as enzimas que melhor expressam o processo de biotransformação destes compostos. É a família das enzimas CYP-1A que catalisam as reações de biotransformação de fase I que compreendem processos de oxidação dos xenobióticos (VUILLEUMIER, 1997). A fase II no processo inclui a conjugação do xenobióticos pré-modificado com compostos endógenos ao organismo com a finalidade de facilitar ainda mais sua excreção. Dentre os compostos endógenos utilizados neste processo está a glutatona que é responsável por viabilizar mais o processo de excreção durante a fase II (SHEEHAN *et al.*, 2001).

O mecanismo de indução de CYP1A1 é tipicamente associado a um receptor citosólico, referido como receptor hidrocarboneto arílico (Ah). O xenobiótico indutor se combina com o receptor Ah da proteína membrana, em seguida o complexo receptor-indutor é encaminhado ao núcleo do hepatócito, onde se liga ao regulador do gene das CYP1A1 (WHYTE *et al.*, 2000). Este complexo aciona a transcrição do gene CYP1A, sendo então o RNA mensageiro é carregado para o citoplasma, traduzido nos ribossomos onde as apoproteínas são sintetizadas. Este processo resulta na indução do metabolismo de xenobiótico por parte da enzima Etoxresorufina-O-Desetilase (EROD). Quando o receptor Ah deixa de ser acionado a produção das P450, família enzimática a qual a EROD faz parte, deixa de ser produzida, voltando aos valores basais. A avaliação da atividade da EROD em peixes é um biomarcador in vivo bem estabelecido de exposição à HPAs e compostos estruturalmente relacionados (SILVA *et al.*, 2021; STEGEMAN *et al.*, 1994).

As glutatona-S-transferases (GST) compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutatona (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (HAYES *et al.*, 2005). O processo inclui a conjugação do xenobiótico oxidado na fase I e na

maioria dos casos com o peptídeo endógeno, glutathiona. O conjugado, então, passa a ser mais hidrossolúvel e mais facilmente excretado. A avaliação na atividade da GST é bastante esclarecedora quanto a possibilidade de contaminação por xenobióticos, visto que a enzima responde a diferentes grupos de contaminantes.

1.5.1.1 Líquido biliar como destino da biotransformação dos HPAs

Após os processos de biotransformação de fase I e II o destino dos HPAs biotransformados é a vesícula biliar. Na fase 1, os HPAs presentes no citosol dos hepatócitos são hidrolisados, reduzidos ou oxidados pelas enzimas do complexo P450. Neste caso, a enzima EROD atua como principal agente catalítico, adicionando a hidroxila aos HPAs. Em seguida existe conjugação dos HPA-OH com compostos endógenos que tem como objetivo aumentar a facilidade de excreção destes xenobióticos pelo aumento da capacidade hidrofílica da molécula. O processo é catalisado pelas enzimas glutathiona-S-transferase, uridina difosfoglicuronosil transferases (UGT) e sulfotransferases (ST). A conjugação de glutathiona a xenobióticos polares pela GST representa uma importante via para reações de fase 2 em peixes (GAGNÉ, 2014a). Por este motivo a GST tem sido utilizada como biomarcador de biotransformação de fase II em peixes expostos a contaminação por petróleo e seus derivados.

O fígado é destino de diferentes contaminantes dada sua complexa e branda irrigação sanguínea. Normalmente o órgão atua no metabolismo de gorduras a partir da criação do líquido biliar e produção de proteínas fundamentais. A bile é esvaziada no trato alimentar após a ingestão de alimentos para ajudar com a quebra de lipídios e outros compostos no intestino junto com a bile vão os HPAs biotransformados que podem tanto ser excretados diretamente pelas fezes quanto retornar à corrente sanguínea e reiniciar o processo de biotransformação (BEYER *et al.*, 2010). Durante o período em que os HPAs são armazenados na bile é possível analisar sua concentração, gerando uma medida quantitativa da bioacumulação ou dose destes compostos no compartimento representado pelo líquido biliar acumulado na vesícula biliar do organismo.

Os HPAs e seus metabólitos se acumulam na bile e possuem capacidade de emitir fluorescência característica em determinadas condições de excitação. A análise da fluorescência da bile permite medir de maneira qualitativa esses metabólitos. Outras técnicas como como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de fluorescência síncrona (SFS) são utilizadas para realizar a quantificação destes compostos no líquido biliar, no entanto a fluorescência fixa (FF) tem sido descrita como a mais comum por ser um método

relativamente rápido e de baixo custo (AAS, E. *et al.*, 2000; VUORINEN *et al.*, 2006). O método FF, semiquantitativo, utiliza pares de comprimentos de onda específicos para cada HPA, embora outras moléculas congêneres também possam contribuir para a fluorescência final. Estudos comparativos entre CLAE (quantitativo) e FF mostram resultados semelhantes, validando a FF como um método efetivo (LIN *et al.*, 1996; VUORINEN *et al.*, 2006). A FF analisa biles diluídas com pares de comprimentos de onda de excitação/emissão específicos para cada HPA. HPAs menores exigem maior energia de excitação (comprimentos de onda mais curtos), enquanto HPAs maiores requerem comprimentos de onda mais longos (BEYER *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 1996).

1.5.2 Biomarcador de neurotoxicidade

A acetilcolina é um neurotransmissor que está presente em todo o sistema nervoso central e periférico de vertebrados, além de também atuar no sistema nervoso autônomo, sendo seus receptores divididos em muscarínicos e nicotínicos (PICCIOTTO *et al.*, 2012). Os receptores muscarínicos são receptores metabotrópicos que são estimulados pela acetilcolina e desencadeiam uma resposta pela ativação de canais iônicos enquanto os receptores nicotínicos, também colinérgicos, estão relacionados ao sistema muscular, ganglionar e o sistema nervoso central. A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima que desempenha o papel principal na degradação do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas e está presente principalmente nas células nervosas, onde sua atividade determina o fim da resposta sináptica tanto no receptor muscarínico quanto no nicotínico (PICCIOTTO *et al.*, 2012). A Butirilcolinesterase (BChE) ou pseudocolinesterase está presente principalmente no plasma sanguíneo, intestino e pâncreas. A BChE pode estar envolvida em vários processos, dentre eles está o processo de desintoxicação, regeneração celular, proliferação celular, e na neurogênese de embriões (MACK *et al.*, 2000).

Historicamente os pesticidas ganharam grande visibilidade como desreguladores na atividade da AChE. Contudo outros contaminantes, dentre eles os derivados de petróleo, possuem capacidade semelhante em organismos aquáticos (OLIVARES-RUBIO *et al.*, 2021). Alguns problemas na atividade normal da AChE podem causar perda de equilíbrio, perda de apetite, problemas no comportamento evasivo e problemas na performance natatória (BRETAUD *et al.*, 2000; JOHANN *et al.*, 2020). Em peixes, o sistema neuromuscular é principalmente colinérgico e o mau funcionamento pode ter sérias consequências no comportamento locomotor destes indivíduos através da hiperestimulação, o que pode causar

tetânia,, caracterizada pela contração involuntária da musculatura, paralisia ou morte do indivíduo (KIRBY *et al.*, 2000).

1.5.3 Biomarcadores de estresse oxidativo

Durante o processo de respiração celular é comum a produção de algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) que são rapidamente convertidas em moléculas não reativas para o organismo. No entanto, quando o organismo é exposto a alguns xenobióticos as concentrações destas EROs aumentam em concentração, podendo resultar em problemas para o organismo. O problema com as EROs começa quando elas excedem o limite de conversão dos agentes antioxidantes, então dizemos que o organismo está passando por um quadro de estresse oxidativo. No momento em que se instala o estado de estresse oxidativo é comum que o organismo desenvolva uma série de alterações que se estendem do nível molecular, causando danos no material genético (BACCHETTA *et al.*, 2017), até o nível comportamental, decorrente de fatores secundários gerados pelo estresse oxidativo (NUNES *et al.*, 2008).

Dentre as diferentes espécies reativas de oxigênio produzidas durante o metabolismo celular estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\bullet$), superóxido ($O_2\bullet^-$) e singlet oxigênio (1O_2) que não são tóxicos, mas reagem com moléculas biológicas (APEL *et al.*, 2004). A presença destas moléculas dentro da célula desencadeia uma série de respostas biológicas acionando a produção de proteínas antioxidantes como a glutathiona (GSH), enzimas de defesa antioxidante como as superóxidos dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona-s-transferase (GST), além das vitaminas E e C que são fatores de proteção exógenos (Figura 7) (DI GIULIO; MEYER, 2008).

As defesas antioxidantes constituem um grupo de mecanismos composto pelas vitaminas C e E, enzimas (SOD, a CAT e GPx) e outros componentes que atuam impedindo e ou na remediação dos danos causados pelas ERO. O estado de estresse oxidativo representa um denominador comum, se não universal, da toxicidade que poderia levar a lesão tecidual e ameaçar a saúde do organismo (GAGNÉ, 2014b). Além disso, a GSH se apresenta como um importante peptídeo que auxilia na redução das EROs (SIES, 1999). A GSH participa dos processos de transformação auxiliando as enzimas GPx e GST, além de por conta própria ceder elétrons para as diferentes espécies reativas e estabilizando os danos causados a membrana fosfolipídica. Após passar por este processo a GSH passa a ser glutathiona oxidada (GSSG) que necessariamente precisa ser reduzida. A enzima responsável por este processo é a glutathiona redutase (GR) que converte o GSSG em GSH utilizando elétrons do fosfato de

processo conhecido como peroxidação lipídica que ocorre em cadeia na membrana celular e que leva a apoptose.

1.5.4 Biomarcador morfológico do desenvolvimento de *DANIO RERIO*

O *General Morphology Score* (GMS) ou índice de desenvolvimento morfológico como o nome sugere é um índice proposto com o objetivo de proporcionar uma resposta quanto ao desenvolvimento normal nos estágios iniciais de vida do *Danio rerio*. A medida foi proposta por BEEKHUIJZEN *et al.* (2015) que sugere 12 parâmetros morfológicos considerados fundamentais para que organismo seja um indivíduo normal num período de 96 horas. Dentre os parâmetros avaliados pela BEEKHUIJZEN *et al.* (2015) estão a presença de: destacamento da cauda, formação dos somitos, circulação sanguínea, movimento e formação do olho em 24 horas pós fertilização (hpf); desenvolvimento da cauda, pigmentação do olho, pigmentação do corpo, pigmentação da cauda e batimentos cardíacos em 48 hpf; nadadeira peitoral, deslocamento da boca e eclosão em 72 hpf, e desenvolvimento da boca 2 e absorção do vitelo em 96 hpf.

A ideia inicial do GMS se baseia na pontuação diária cumulativa e não retroativa dos parâmetros morfológicos, que se atêm ao momento em que deve estar formado. Se a estrutura se forma até determinado ponto considerado normal, o organismo recebe a pontuação referente. Contudo, se o organismo perde a característica por atrofia ou outros fatores, esse não perde a pontuação computada. O primeiro incremento do GMS foi realizado por ALVES *et al.* (2017) com a adição da bexiga natatória pontuando 1 ao final das 96 hpf, somando 18 pontos diferente aos 17 originais proposto por BEEKHUIJZEN *et al.* (2015) (Tabela 1). O método descrito por ALVES *et al.* (2017) tem sido aplicado pelo laboratório de ecotoxicologia aquática/UFPE (LABECOTOX). Desde então, trabalhos de ampla relevância para o monitoramento ambiental e avaliação de toxicidade de substância puras têm sido desenvolvidos (ALVES *et al.*, 2023; MARIZ JR *et al.*, 2023). Este modelo foi aplicado nos capítulos 1 e 2 desta tese com respostas significativas e robustas.

Tabela 1- Estruturas avaliadas pelo GMS segundo as normas iniciais de Beekhuijzen *et al.* (2015) com as modificações realizadas por Alves *et al.* (2017). Adição da pontuação da bexiga natatória. Em verde as pontuações atribuídas a cada parâmetro morfológico com o somatório diário descrito abaixo e ao final das 96 hpf tem o somatório geral.

Embrião A1					
Efeito		24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Descolamento cauda		2	1		
Formação dos somitos		1			
Formação do olho		2	1		
Movimentos		1			
Circulação sanguínea		1			
Batimento cardíaco			1		
Pigmentação cabeça e corpo			1		
Pigmentação da cauda			1		
Absorção do vitelo					1
Nadadeira peitoral				1	
Boca protrusível				1	1
Eclosão				1	
Insuflamento da bexiga natatória					1
Pontuação Final		7	5	3	18

Fonte: O autor

LI *et al.* (2019) também contribuiu significativamente para a avaliação do GMS com a adição de mais um tempo de observação em 120 horas, a adição dos parâmetros presença de otólito em 24 hpf, movimento optomotor em 96 hpf, adição do movimento caudal em 120 hpf e o deslocamento da pontuação dada por absorção do vitelo e insuflamento da bexiga natatória de 96 hpf para 120 hpf (Tabela 2). Esta terceira metodologia usando o GMS foi empregada no capítulo 3 dessa dissertação com muito sucesso. Em ambas as metodologias aplicadas a resposta é a mesma, se houve ou não atraso no desenvolvimento embriolarval das fases iniciais de vida do *Danio rerio* com a diferença que na metodologia empregada pelo LI *et al.* (2019) existe a possibilidade de remoção da pontuação em caso onde exista a atrofia ou perda da característica observada. Essa segunda metodologia traz uma resposta mais completa sobre o efeito do contaminante sobre o desenvolvimento do embrião.

Tabela 2- Estruturas avaliadas pelo GMS para quantificar unitariamente os marcos morfológicos do desenvolvimento do *Danio rerio* em fases embriolarvais segundo Li *et al.* 2019. Em verde os valores utilizados para a realização do somatório. Em azul destacado os somatórios diários com os valores finais em 120 hpf representando o somatório total dos dias.

Embrião A1						
Efeito		24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
Descolamento cauda		2	3	3	3	3
Formação dos somitos		1	1	1	1	1
Formação do olho		2	3	3	4	4
Presença de tólitio		1	1	1	1	1
Movimentos		1	1	1	1	2
Circulação sanguínea		1	1	1	1	1
Batimento cardíaco			1	1	1	1
Pigmentação cabeça e corpo			1	1	1	1
Pigmentação da cauda			1	1	1	1
Absorção do vitelo						1
Nadadeira peitoral				1	1	1
Boca protrusível				1	2	2
Eclosão				1	1	1
Insuflamento da bexiga natatória						1
Pontuação final		8	13	16	18	76

Fonte: O autor

1.5.4.1 Biomarcadores morfológicos de teratogenicidade em *Danio rerio*

Anomalias e patologias morfológicas bem como processos teratogênicos podem ser avaliados morfolologicamente ao longo do desenvolvimento inicial de *Danio rerio*. As patologias e anomalias desenvolvidas na morfologia destes organismos durante a fase embriolarval tem sido avaliada e quantificada em tabelas que registram a proporção ou frequência de indivíduos que apresentam estas anomalias em relação ao total exposto nos diferentes tratamentos. Mais recentemente o uso de índices que englobam estas anomalias e patologias têm surgido como uma opção para este tipo de avaliação, gerando um valor empírico do potencial toxicológico para geração de patologias de maneira geral (Tabela 3).

Tabela 3 - Patologias avaliadas para computar as diferentes alterações embiomorfológicas durante as 120 hpf em 1 embrião e gerar o índice *general teratology score* (GTS). Em azul o somatório diário em um organismo hipotético com todas as patologias e assim sucessivamente assumindo que a mesma patologia se manteve durante os 5 dias avaliados.

A1	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
Possível regeneração					
Ausência de Circulação	1	1	1	1	1
Congestão Sanguínea (Trombose)	1	1	1	1	1
Coração deformado (Looping ausente)		1	1	1	1
Edema Saco vitelínico	1	1	1	1	1
Edema Pericárdico	1	1	1	1	1
Edema na Cabeça	1	1	1	1	1
Edema Cauda	1	1	1	1	1
Outros edemas	1	1	1	1	1
Ausência de Bexiga natatória				1	1
Difícil Regeneração					
Curvatura dorsal (Lordose)	1	1	1	1	1
Curvatura dorsal (Cifose)	1	1	1	1	1
Curvatura dorsal (Escoliose)	1	1	1	1	1
Nadadeira Peitoral ausente ou mal formada	1	1	1	1	1
Nadadeira caudal mal formada	1	1	1	1	1
Ausência do olho ou microftalmia	1	1	1	1	1
Deformação Craniofacial	1	1	1	1	1
Outras Patologias Menos comuns					
Vitelo deformado	1	1	1	1	1
Vitelo não absorvido				1	1
Alteração na pigmentação		1	1	1	1
Deformação na notocorda	1	1	1	1	1
Hemorragia	1	1	1	1	1
Deformação do otólito	1	1	1	1	1
Necrose	1	1	1	1	1
Soma	19	40	61	84	107

Fonte: O autor

O GTS foi baseado nos trabalhos de VON HELLFELD *et al.* (2020), que descreve as principais patologias encontradas em *Danio rerio* exposto a diferentes agentes xenobióticos e LI *et al.* (2019) que utiliza um estilo de GTS com sistema de pontuação semelhante. O GTS funciona como uma medida integrativa do efeito patológico do contaminante, gerando um número que relaciona presença da patologia e a ocorrência dele ao longo do período de exposição. Caso haja a presença da patologia no determinado horário é adicionado 1 ponto, se a patologia se manteve no dia seguinte recebe outro ponto (Tabela 3). Em casos em que existe a remissão da patologia então é pausada a inserção de pontos. Ao final do tempo de exposição foi somada a pontuação ao longo dos dias gerando o valor GTS. Cada embrião da placa de 20

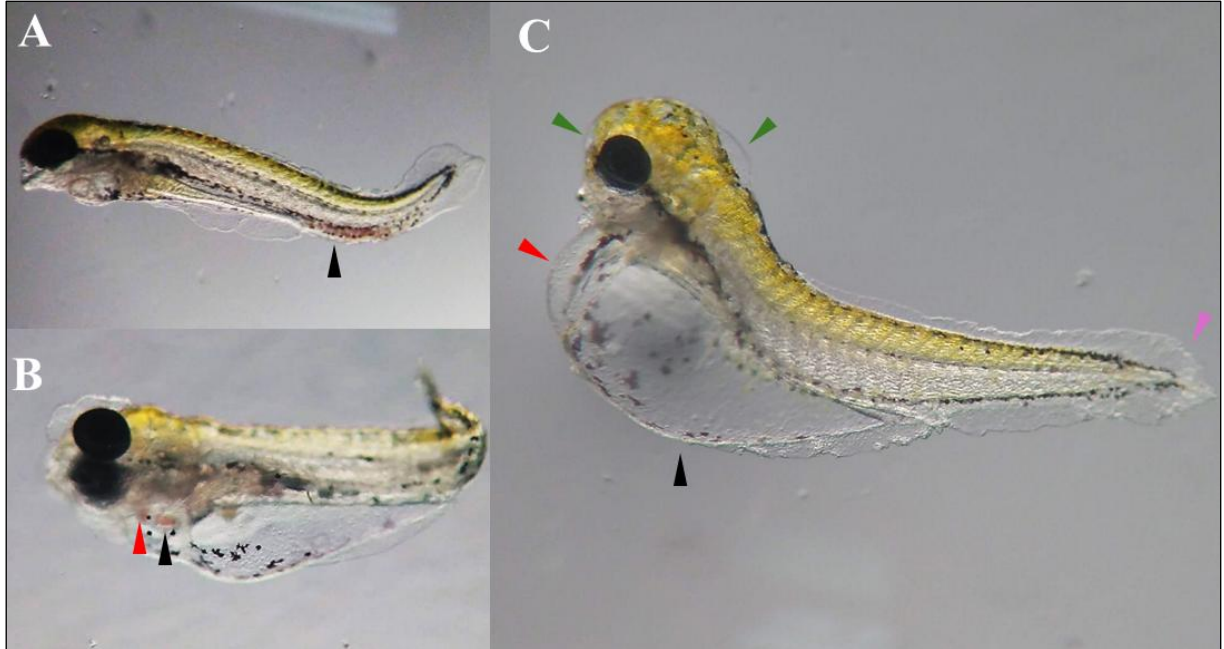
poços recebe um valor GTS, funcionando como uma réplica em um n total de 20 organismos expostos. No índice GTS a bexiga natatória é observada tanto em 96, quanto em 120 hpf pois existe o registro do surgimento da estrutura em ambos os horários. Os tecidos da primeira câmara da bexiga natatória estão completamente formados ao final de 72 hpf (WINATA *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2011).

1.5.4.2 Biomarcadores morfológicos do desenvolvimento do sistema cardiorrespiratório em *Danio rerio*

Efeitos tóxicos que geram problemas no desenvolvimento do coração frequentemente geram alterações no desenvolvimento de uma circulação sanguínea normal. As células pré-cardíacas são formadas durante a gastrulação e migram em direção ao eixo embrionário como parte do mesoderma da placa lateral, formando dois tubos que são os primórdios do coração. Os tubos miocárdicos então se fundem para envolver as células endocárdicas e formar o tubo cardíaco definitivo. Assim, entre 22 e 24 hpf, o tubo cardíaco está batendo e a circulação começa (STAINIER *et al.*, 1996). Até este ponto o coração não chegou em sua estrutura como observamos em 48 hpf. Entre 24 e 48 hpf existe o looping cardíaco onde existe a passagem do átrio para a parte anterior do corpo da larva e o ventrículo passa para a parte inferior. Contaminantes como os HPAs atuam nestes processos gerando consequências tanto ao desenvolvimento das paredes do coração como também no looping cardíaco (Figura 8). A interrupção da função cardíaca por qualquer meio (isto é, químico ou genético) durante a organogênese altera subsequentemente a morfologia cardíaca, o que, por sua vez, alterará ainda mais a função e iniciará uma cascata de efeitos adversos no desempenho cardiorrespiratório (INCARDONA *et al.*, 2017b).

A circulação sanguínea é comumente avaliada no GMS 24 hpf, onde é possível verificar corrente em todo o corpo do animal. A circulação sanguínea durante as fases iniciais de vida do organismo tem função primordial no fornecimento de energia para os tecidos em formação, esta energia é proveniente do vitelo. Esta energia é direcionada para formação de órgãos importantes para processar de biotransformação como o fígado que com a ausência deste recurso tende a apresentar crescimento prejudicado e perda de sua função dada a necessidade de circulação sanguínea (KORZH *et al.*, 2008). O fato de ambos os fatores, desenvolvimento normal do coração e angiogênese, estarem interligados, em alguns casos afetar um pode significar gerar consequência no outro. Em detrimento disso existem diferentes patologias geradas por esses distúrbios, tais como, edemas, trombozes e hemorragias (Figura 8).

Figura 8 - Imagens de embriões de *Danio rerio* com 168 hpf exibindo patologias ao longo do corpo após exposição a fração solúvel de petróleo. A Larva com seta indicando a presença de uma congestão sanguínea na veia caudal, B: larva com 168 hpf apresentando as câmaras do coração com ausência de looping, a seta vermelha indica o ventrículo, onde deveria estar o átrio e a seta preta indica o átrio, onde deveria estar o ventrículo e C: As setas verdes indicam os edemas na cabeça, seta vermelha indicando o edema pericárdico, seta preta indicando o edema Perivitelínico e a seta roxa indicando a má formação da cauda.



Fonte: o Autor

1.5.4.3 Biomarcadores morfológicos do desenvolvimento da notocorda, curvaturas dorsais e nadadeiras em *Danio rerio*

A notocorda é uma estrutura fundamental para o desenvolvimento de estruturas como o tubo neural e as vertebrae da coluna vertebral. Alterações nesta estrutura tem sido descrita como irreversíveis. A principal função desta estrutura é servir como guia para o desenvolvimento da coluna e gerar a sustentação primordial destes organismos nas fases embrionárias de vida. As malformações da notocorda podem se desenvolver precocemente e provavelmente persistirão, o que, em casos graves, pode levar à fragmentação da notocorda com múltiplas quebras na estrutura (Figura 9 D) (VON HELLFELD *et al.*, 2020).

Torções nesta estrutura são geralmente reportadas com mais frequência, devido a facilidade de observação. A notocorda normal destes organismos se parece com um tubo reto e contínuo que vai da cabeça ao final da cauda (Figura 13). Contudo, é possível observar que à exposição HPAs puros e misturas leva ao surgimento de lordoses, escolioses e cifoses (ALVES *et al.*, 2017; INCARDONA *et al.*, 2004a). Se considerar um organismo com plano corporal sagital, a lordose se caracteriza pela curvatura dorsal da larva para trás (Figura 9 A e B) e se considerarmos o mesmo plano o inverso é chamado de cifose (Figura 9 C).

Figura 9 - Quadro de figuras com larvas de *Danio rerio* 168 hpf exposta a diferentes concentrações de fração acomodada de petróleo em água (FAA). A: larva com lordose leve indicada pela seta, B: Larva com lordose acentuada indicada pela seta preta, C: Larva com cifose indicada pela seta preta, D: maior magnificação sobre a deformação na notocorda na região da cauda da larva, E: Larva com escoliose leve indicada pela seta, F: Larva com lordose acentuada e G: Larva com lordose na cauda.

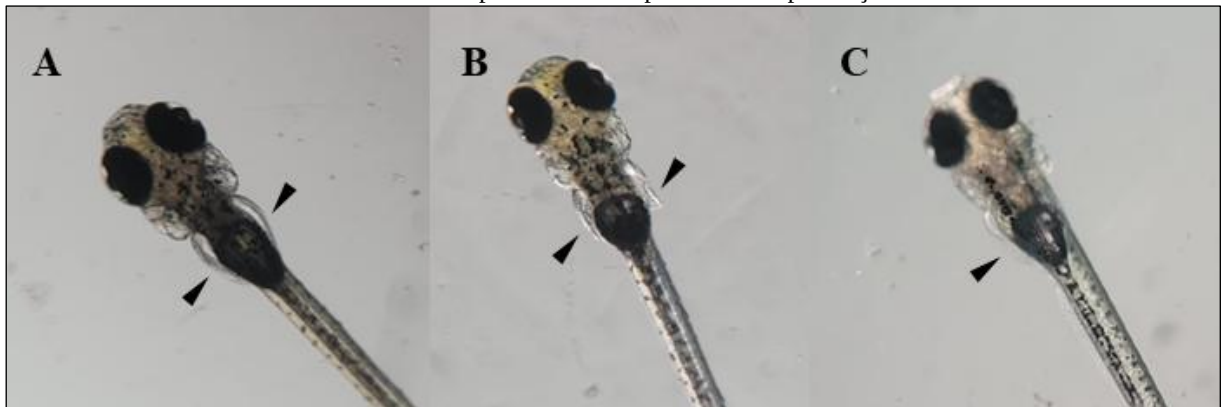


Fonte: O autor

Se considerar um plano corporal dorsal, a escoliose se caracteriza pela torção da notocorda para as laterais (Figura 9 E, F e G). Quanto ao grau de acentuação dependerá do ângulo determinado pelo autor para se definir o que será grave e o que será leve (Figura 9).

As nadadeiras peitorais originam-se aproximadamente entre o coração e o fígado, estendendo-se posteriormente ao longo de cada lado da larva e geralmente é observada a partir de 72 hpf (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015). Contudo as nadadeiras peitorais têm o início de seu desenvolvimento bem antes, sendo possível observar sua presença com microscópio invertido nos embriões ainda dentro do córion. As patologias associadas às nadadeiras peitorais estão relacionadas a sua ausência (Figura 10 C), como demonstrado em larvas de *Danio rerio* expostas a derivados de petróleo (ALVES *et al.*, 2017), ou sua má formação com surgimento de vilosidades (Figura 10 B). Já a nadadeira caudal pode apresentar uma série de deterioração dos raios presentes saindo do formato circular, comum nos controles (Figura 10 A), para uma morfologia disforme como visto na figura 8 C.

Figura 10 - Larvas de *Danio rerio* com 168 hpf. A: Larva controle com duas nadadeiras peitorais saudáveis, B: Larva exposta a FAA com apresentando vilosidades apontada pelas setas pretas e C: Larva com a ausência de uma das nadadeiras peitorais a seta preta indica a presença da nadadeira única.



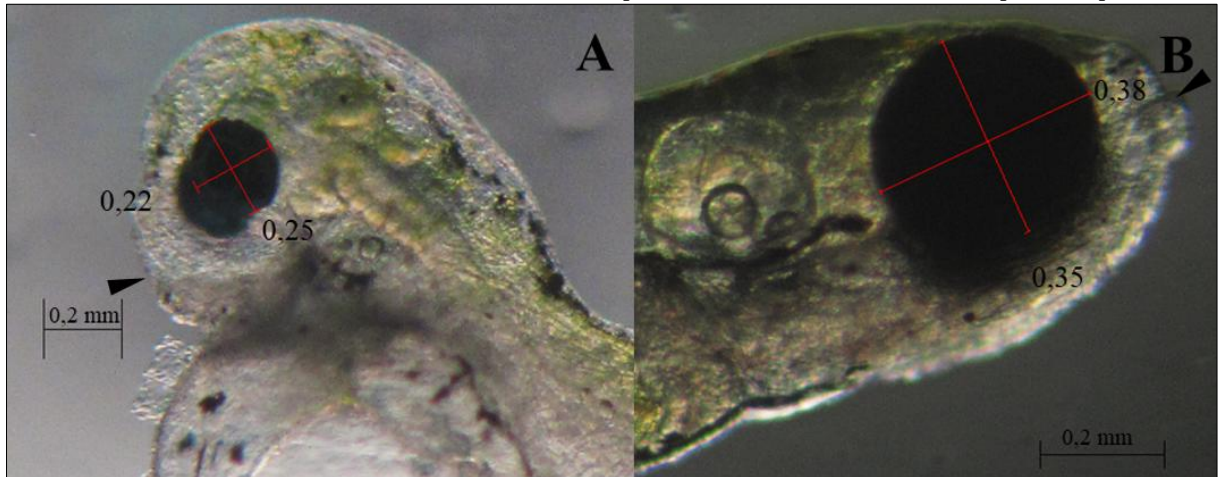
Fonte: O autor

1.5.4.4 Biomarcadores morfológicos do desenvolvimento do crânio, olho, alterações pigmentares e necroses em *Danio rerio*

As deformações craniofaciais são alterações no padrão normal da morfometria e simetria do crânio do organismo. Estas alterações são observadas a partir da morfologia alterada de estruturas como é o caso da boca. A boca é alterada pela exposição de fases iniciais de vida do *Danio rerio* a HPAs e se caracteriza pelo encurtamento da mandíbula observada histologicamente (INCARDONA *et al.*, 2004a) ou pela ausência do deslocamento da estrutura da parte ventral (Figura 11A), de onde se origina, para frente da cabeça. Essa observação é proposta por (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015). Outro fator decorrente das

alterações crânio faciais é a indução da microftalmia que pode ser gerada por processos de oclusão do globo ocular devido às alterações ósseas no crânio do organismo, impedindo seu crescimento (Figura 11A).

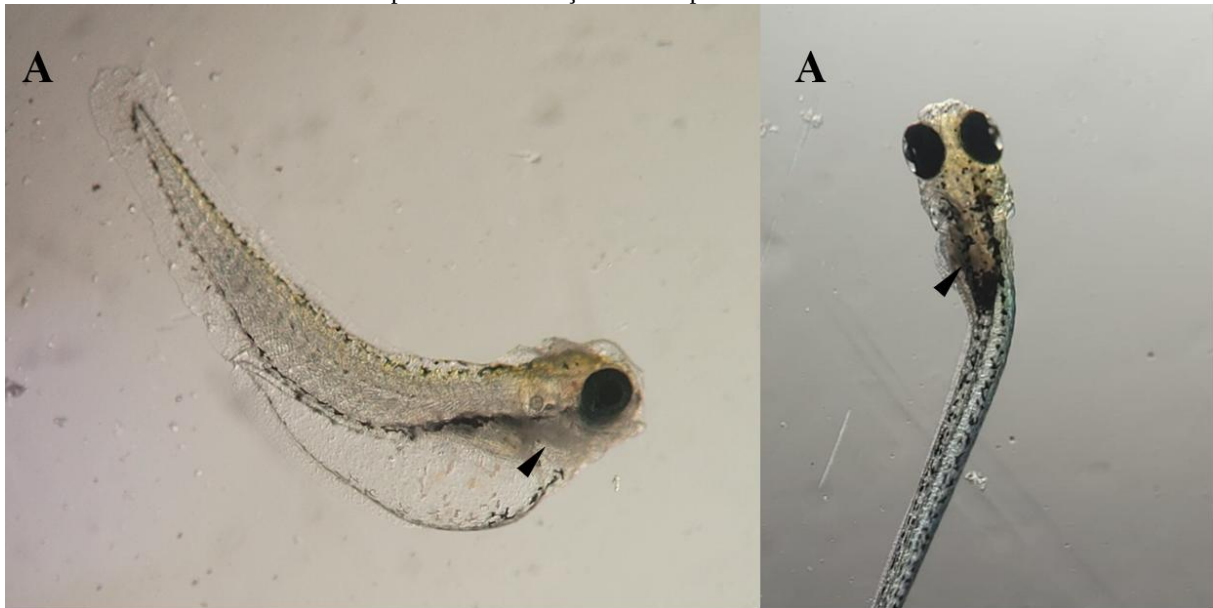
Figura 11 - Figura com larvas de *Danio rerio* com 168 hpf. Exposta a FAA e controle. A: Larva exposta demonstrando a redução significativa no diâmetro do olho e seta indicando o posicionamento errado da boca e B: Larva controle com olhos de tamanho normal e boca posicionada corretamente indicada pela seta preta.



Fonte: O autor

As alterações de cores e pigmentos no *Danio rerio* podem ser indicativos tanto de alteração na própria pigmentação do organismo, como a indução de necrose tecidual. Os melanócitos do *Danio rerio* surgem de um pequeno número de progenitores melanogênicos bipotentes que são derivados diretamente da crista neural sem um intermediário de células-tronco durante os primeiros três dias de desenvolvimento (MORT *et al.*, 2015). As alterações de pigmentação são descritas como uma patologia de baixa recorrência por VON HELLFELD *et al.* (2020). Na avaliação do GMS a presença de massas pigmentares é observada entre 24 e 48 hpf. Os melanócitos pigmentam os olhos, cabeça, corpo e cauda da larva sendo possível a observação deste parâmetro a partir de 48 hpf (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015). A necrose é caracterizada pela presença de tecido morto que geralmente dá ao tecido biológico tonalidades escuras do cinza ao preto (Figura 12). Diversos fatores podem ocasionar esse tipo de alteração como o estresse oxidativo (MCGILL *et al.*, 2013).

Figura 12 - Figura com larvas 168 hpf após exposição a FAA exibindo características de necrose nos tecidos próximo ao coração A e B apontados com a seta.



Fonte: O Autor

1.5.5 Biomarcadores relacionados a bexiga natatória do *Danio rerio*

1.5.5.1 Biomarcadores de expressão gênica relacionados ao desenvolvimento da Bexiga natatória em *Danio rerio*

A bexiga natatória é um órgão complexo que regula a flutuabilidade neutra dos peixes teleósteos. A modulação do desenvolvimento deste órgão por genes específicos ainda é um tanto confusa. Porém, alguns genes indutores, receptores e coativadores têm sido descritos. Basicamente, a bexiga natatória em sua forma madura é composta por três tecidos: o epitélio, mesotélio e mesênquima. O tecido interno da câmara da bexiga natatória é epitelial derivado da parede do esôfago da larva, enquanto o tecido externo é mesotelial e entre os tecidos citados está o tecido mesenquimal.

A via Hedgehog (Hh) de expressão gênica regula muitos eventos importantes do desenvolvimento em vertebrados (INGHAM *et al.*, 2001). Em embriões de *Danio rerio*, tem sido demonstrado que a via Hh está relacionada com a organização celular dos tecidos da bexiga natatória, e o processo de sinalização começa próximo ao período inicial de diferenciação celular (< 24 hpf) e se estende até (~60 hpf) (WINATA *et al.*, 2009). Neste processo existe a sinalização antes de 24 hpf modulada pelos produtos da transcrição dos genes *shha* e *ihha*, e então por volta de 48 hpf há um aumento no tecido mesenquimal modulado pela indução dos genes *ptc1* e *ptc2*. Outro processo de sinalização envolvido no desenvolvimento da bexiga é a via Wnt, que neste caso está relacionada à especificação do

tecido mesenquimal e que também está envolvida na formação do pulmão de mamíferos (YIN *et al.*, 2011).

Pouco antes de 24 hpf, inicia-se o processo de invaginação do epitélio esofágico do embrião, formando um broto que posteriormente (~36 hpf) é coberto por um aglomerado de células diferenciando-se do mesênquima modulado pela via Wnt (*Wnt5b*) (YIN *et al.*, 2011). Durante esse mesmo período, os genes epiteliais *hb9* e *sox2* e mesotelial *fgf10a* são induzidos e a indução mantida até ~72 hpf (SHASHA, 2023; WINATA *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo, existem processos de sinalização e recepção de sinais através da via Hh que garantem um aumento relativo dos tecidos da bexiga natatória. Ainda é possível encontrar genes receptores Wnt (*fz2* e *fz7b*) e coativadores (*lef1* e *tcf3*) expressos nessa mesma época, modulando os processos de diferenciação e organização dos tecidos do epitélio, mesênquima e mesotélio (YIN *et al.*, 2011). Entre 42 e 72 hpf outros genes estão induzidos nos tecidos do epitélio (*foxa2* e *anxa5*), mesênquima (*has2* e *acta2*) e mesotélio (*hprt1l*, *elovl1a* e *anxa5*) (WINATA *et al.*, 2009).

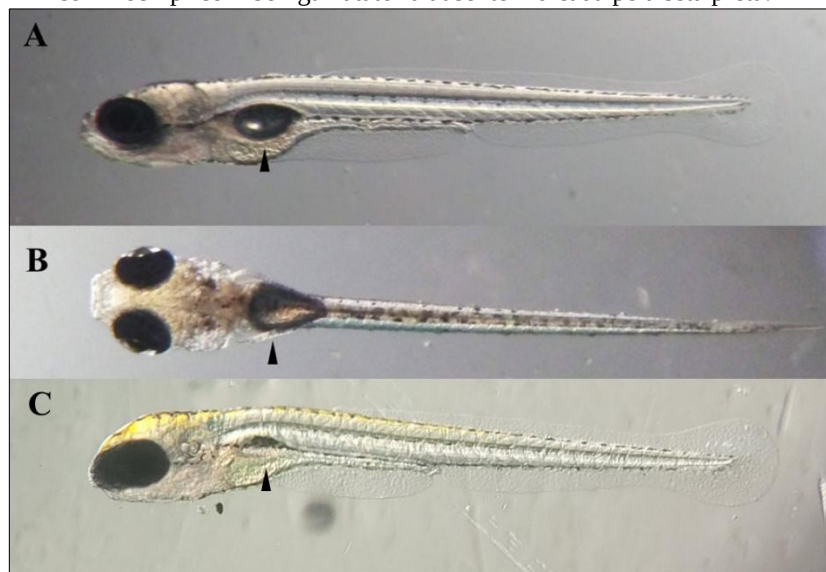
1.5.5.2 Biomarcadores comportamentais no desenvolvimento da bexiga natatória em *Danio rerio*

O comportamento surge da interação cumulativa de uma variedade de fatores bióticos e abióticos e representa a resposta do animal a fatores internos (fisiológicos) e externos (ambientais, sociais), relacionando um organismo a outro (GERHARDT, 2007). Além disso, a avaliação do comportamento dos organismos pode mostrar alterações em comportamentos essenciais como os reprodutivos que darão continuidade a populações de indivíduos por meio do recrutamento (CARVALHO, 2014).

A bexiga natatória é um órgão primordial para o comportamento natatório de peixes com implicações contundentes sob o sucesso reprodutivos e de forrageio destes animais (Figura 13). O *Danio rerio* é um teleósteo fisóstomo tanto na fase embriolarval, quanto na fase adulta e tem o processo de desenvolvimento de sua bexiga natatória já nos primeiros dias de desenvolvimento embrionário. A bexiga natatória depende de três processos para sua completa funcionalidade. O primeiro é o desenvolvimento normal dos tecidos que compõe a estrutura, o segundo está relacionado aos processos comportamentais que atuam diretamente na deglutição inicial de ar para seu insuflamento, e o terceiro é a capacidade de regulação do volume de ar da bexiga pelo sistema nervoso central. O insuflamento da bexiga natatória permite que as larvas alcancem a flutuabilidade neutra e desenvolvam habilidades de natação adequadas (LINDSEY *et al.*, 2010).

Ao final de 72 hpf, os tecidos da primeira câmara da bexiga natatória são formados e o processo comportamental visando o enchimento da bexiga com ar na superfície da água começa, e o mesmo envolve a natação ativa das larvas de *Danio rerio* até a superfície da água para abocanhar ar. Neste estágio a força peso corporal das larvas é maior que a força empuxo, fazendo com que as larvas afundem ao pararem de nadar. Ao atingirem a superfície as larvas abocanham e deglutem uma quantidade de ar e a empurram pelo ducto pneumático até a bexiga natatória recém-formada (HAGENAARS *et al.*, 2014). Este processo de subida é realizado diversas vezes até que a larva consiga um volume suficiente para inflar totalmente o órgão (WEBB, 2002). Quando existe o insuflamento total a larva passa a ter uma flutuabilidade positiva gerada pela força empuxo maior que a força peso gerado pela massa de seu corpo, o que mantém a larva agora na superfície da água. Neste ponto a larva inicia sucessivas tentativas de afundamento na coluna de água até chegar ao ponto em que o sistema nervoso autônomo começa a regular o volume de ar dentro do órgão (STEEN, 1970), de forma a equalizar a força empuxo gerada pelo volume de ar na bexiga com a força peso da mesma, permitindo que o organismo fique na coluna d'água sem ser arrastado para superfície pelo empuxo da bexiga ou para o fundo pela peso dos tecidos, atingindo a desejada flutuabilidade neutra. A exposição de fases embriolarias de *Danio rerio* a diferentes grupos de contaminante têm demonstrado que a bexiga natatória é um órgão sensível (STINCKENS *et al.*, 2018), podendo apresentar alterações no seu desenvolvimento em organismos expostos a HPAs, como demonstrado nos capítulos 1, 2, e 3 desta tese (Figura 9).

Figura 13 - Larva de *Danio rerio* com 168 hpf. Em destaque pela seta preta está a bexiga natatória vista lateral A e dorçal B, C: Vista lateral de uma larva com 168 hpf com bexiga natatória ausente indicada pela seta preta.



Fonte: o Autor

1.5.6 Biomarcador de Genotoxicidade

Genotoxicidade se refere à capacidade de substâncias químicas de danificar o DNA e/ou componentes celulares que regulam a fidelidade do genoma e inclui todos os efeitos adversos sobre a informação genética (FIMOGNARI *et al.*, 2012). A utilização de marcadores de genotoxicidade em células nucleadas do sangue de peixes fornece informações valiosas sobre os riscos ambientais, auxiliando no desenvolvimento de estratégias de monitoramento e conservação da biodiversidade aquática. A detecção precoce de danos genômicos pode sinalizar a presença de poluentes em concentrações subletais, permitindo ações preventivas antes que efeitos mais graves se manifestem nas populações de peixes e em todo o ecossistema.

O ensaio de micronúcleos (MN) destaca-se como um dos métodos mais empregados na avaliação de genotoxicidade. Essa técnica possibilita a identificação de micronúcleos, estruturas citoplasmáticas resultantes da exclusão de fragmentos cromossômicos (indicando eventos clastogênicos) ou cromossomos inteiros (sinalizando eventos aneugênicos) que não foram incorporados ao núcleo principal durante a divisão celular. Morfologicamente semelhantes ao núcleo, os micronúcleos distinguem-se por seu tamanho reduzido, geralmente variando de 1/16 a 1/3 do diâmetro nuclear, e originam-se de falhas na segregação cromossômica durante a anáfase normal ou de quebras cromossômicas (CANEDO *et al.*, 2021; FENECH, 2019).

Os HPAs, assim como outros grupos de moléculas que interagem com o material genético, são denominados agentes genotóxicos (ADAM *et al.*, 2010). Essa interação pode ocorrer de diferentes maneiras, os HPAs especificamente, são considerados agentes genotóxicos intercalantes ou seja, são capazes de se posicionar entre as hélices do DNA, modificando a informação genética e lesionando a molécula. Algumas destas alterações, quando a nível cromossômico, podem gerar quebras a estas estruturas durante o processo de divisão celular e ao final do processo gerar os MN e outras alterações nucleares.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 **Objetivo geral manuscrito I - (Toxicity of the oil spilled on the Brazilian coast at different degrees of natural weathering to early life stages of the zebrafish *Danio rerio*)**

Avaliar a composição de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em três frações acomodadas de óleo em água (FAA) que impactaram o litoral brasileiro, submetidas a diferentes graus de intemperismo natural, e determinar o potencial tóxico dessas frações em fases embriolarvais de *Danio rerio* por meio da análise de múltiplos biomarcadores.

1.6.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar de a exposição de embriões de *Danio rerio* por HPAs provenientes de FAAs com distintos graus de intemperismo natural promovem alterações no desenvolvimento embrionário e frequência cardíaca;
- Verificar se a exposição por HPAs provenientes de diferentes FAAs é capaz de induzir patologias em embriões de *Danio rerio*;
- Avaliar se a exposição de embriões de *Danio rerio* por HPAs de FAAs com distintos graus de intemperismo natural promovem alterações morfométricas em larvas de *Danio rerio*.

1.6.1.2 Hipótese

A exposição de fases embriolarvais de *Danio rerio* a FAA com diferentes graus de intemperismo natural, induzirá alterações significativas no desenvolvimento embrionário, frequência cardíaca, morfometria larval e desenvolvimento de patologias, sendo a magnitude desses efeitos tóxicos diretamente proporcional ao grau de intemperismo e à composição específica das frações de HPAs da FAA.

1.6.2 **Objetivo geral manuscrito II - (Ecotoxicological effects of crude oil to early life stages of *Danio rerio*: a molecular, morphological and behavioral approach focused on swim bladder development)**

Investigar os mecanismos de expressão gênica e alterações bioquímicas, morfológicas e comportamentais envolvidas na falha do insuflamento da bexiga natatória na fase embriolarval de *Danio rerio* expostos a FAA.

1.6.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar se a exposição de fases embriolarvais de *Danio rerio* a HPAs provenientes de FAA pode apresentar alterações em genes responsáveis pelo desenvolvimento dos tecidos da bexiga natatória;
- Avaliar se a exposição de fases embriolarvais de *Danio rerio* a HPAs provenientes de FAA pode alterar a área da bexiga natatória em 168 hpf;
- Verificar se a exposição de fases embriolarvais de *Danio rerio* a HPAs provenientes de FAA pode gerar alterações no comportamento natatório das larvas e se existe relação com fatores morfométricos e moleculares;
- Verificar se existe indução de estresse oxidativo nas larvas expostas aos HPAs da FAA e como este fator se relaciona com a ausência da bexiga natatória.

1.6.2.2 Hipótese

A exposição de fases embriolarvais de *Danio rerio* a HPAs presentes na FAA interfere na expressão de genes dos tecidos da bexiga natatória, resultando em alterações morfológicas do órgão, comportamentais e bioquímicas, sendo a falha no insuflamento da bexiga natatória um efeito central dessas alterações interconectadas.

1.6.3 **Objetivo geral manuscrito III - (Photoenhanced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from Brazilian oil spill water accommodated fraction (WAF) on *Danio rerio* early life stages exposed to natural sunlight)**

Investigar os efeitos da exposição combinada à radiação ultravioleta (UV) solar natural e a HPAs presentes na FAA de óleo sobre o desenvolvimento e a fisiologia de fases embriolarvais de *Danio rerio*.

1.6.3.1 Objetivos específicos

- Avaliar se a exposição de embriões de *Danio rerio* por HPAs provenientes de FAAs e radiação UV natural simultaneamente aumenta o potencial tóxico da FAA;
- Quantificar e comparar os efeitos da exposição isolada e combinada à radiação UV solar natural e aos HPAs da FAA no desenvolvimento embrionário, ocorrência de patologias subletais e alterações morfométricas em embriões de *Danio rerio*;
- Avaliar se existe alterações bioquímicas de estresse oxidativo e biotransformação de fase 2 em fases embriolarvas de *Danio rerio* após exposição isolada e combinada a radiação ultra-violeta (UV) natural solar, e aos HPAs da FAA.

1.6.3.2 Hipótese

A exposição simultânea de fases embrionárias de *Danio rerio* FAA e à radiação UV natural aumenta os efeitos tóxicos dos HPAs isoladamente, resultando em um aumento significativo na ocorrência de malformações no desenvolvimento embrionário, maior incidência de patologias, alterações morfométricas e indução de respostas bioquímicas de estresse oxidativo e biotransformação de fase 2 mais intensas em comparação com a exposição a cada fator isoladamente.

1.6.4 Objetivo geral manuscrito IV - (Avaliação toxicológica de três complexos estuarinos ao longo do litoral pernambucano utilizando o peixe sentinela *Eugerres brasiliensis* como modelo biológico: uma abordagem bioquímica, genotóxica e avaliativa de metabólitos biliares de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos)

Avaliar a exposição a HPAs e alterações em biomarcadores bioquímicos e de genotoxicidade utilizando o *Eugerres brasiliensis* como espécie sentinela em três estuários impactados pelo óleo que atingiu a costa brasileira

1.6.4.1 Objetivos específicos

- Avaliar se existe concentração relevante de metabólitos de HPA no líquido biliar do *Eugerres brasiliensis* coletado nos diferentes estuários avaliados;
- Avaliar se existem valores significativos de alterações genotóxicas nas células sanguíneas de *Eugerres brasiliensis* coletado nos diferentes estuários avaliados e correlacioná-los com os valores de HPAs biliares encontrados;
- Verificar se existem alterações na atividade das enzimas de biotransformação de fase I e II nos juvenis de *Eugerres brasiliensis* coletados nos diferentes estuários avaliados;
- Verificar se existem alterações na atividade das enzimas de estresse oxidativo nos juvenis de *Eugerres brasiliensis* coletados nos diferentes estuários avaliados.

1.6.4.2 Hipótese

A persistência de massas de petróleo soterrado nos estuários afetados pelo derramamento de 2019-2020 mantém concentrações de HPAs na água, promovendo a exposição crônica de peixes estuarinos, o que induz alterações significativas na atividade de enzimas de biotransformação de fase I e II e de defesa antioxidante, resultando em danos genotóxicos observáveis em suas células sanguíneas.

REFERÊNCIAS

- AAS, E.; BEYER, J.; GOKSØYR, A. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: An evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers*, 5, n. 1, p. 9-23, 2000.
- ADAM, M. L.; TORRES, R. A.; SPONCHIADO, G.; MOTTA, T. S. *et al.* Environmental degradation at a public park in Southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). *Water, Air, and Soil Pollution*, 211, n. 1-4, p. 61-68, 2010.
- ALLAN, S. E.; SMITH, B. W.; ANDERSON, K. A. Impact of the Deepwater Horizon Oil Spill on Bioavailable Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Gulf of Mexico Coastal Waters. *Environmental Science & Technology*, 46, n. 4, p. 2033-2039, 2012/02/21 2012.
- ALTENBUGER, R.; SEGNER, H.; OOST, R. V. D. Biomarkers and PAHs - Prospects for the Assessment of Exposure and Effects in Aquatic Systems. *In: Douben, P. E. T. (Ed.). PAHs : an ecotoxicological perspective*. England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. p. 297-328.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; SÁNCHEZ, L. P.; MOLEJÓN, O. H.; GÓMEZ, E. T. Mass production of striped patao *Eugerres brasiliensis* juveniles in Cuba. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27, n. 3, p. 347-352, 1996.
- ALVES, R. N.; MARIZ, C. F.; DE MELO ALVES, M. K.; DA SILVA, A. S. X. *et al.* Zebrafish as a biological model for assessing water quality along tropical hydrographic river basins in Northeast Brazil. *Ecotoxicology*, 2023/09/19 2023.
- ALVES, R. N.; MARIZ JR, C. F.; MELO ALVES, M. K. d.; CAVALCANTI, M. G. N. *et al.* Contamination and Toxicity of Surface Waters Along Rural and Urban Regions of Capibaribe River in Tropical Northeastern Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, n/a, n. n/a, 2021/07/29 2021.
- ALVES, R. N.; MARIZ JR, C. F.; PAULO, D. V. d.; CARVALHO, P. S. M. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere*, 178, p. 224-230, 7// 2017.
- APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, n. 1, p. 373-399, 2004.
- ARAÚJO, M. P.; HAMACHER, C.; FARIAS, C. d. O.; SOARES, M. L. G. Fecal sterols as sewage contamination indicators in Brazilian mangroves. *Marine Pollution Bulletin*, 165, p. 112149, 2021/04/01/ 2021.
- BACCHETTA, C.; ALE, A.; SIMONIELLO, M. F.; GERVASIO, S. *et al.* Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles. *Ecological Indicators*, 76, p. 230-239, 5// 2017.
- BARRON, M. G.; VIVIAN, D. N.; HEINTZ, R. A.; YIM, U. H. Long-Term Ecological Impacts from Oil Spills: Comparison of Exxon Valdez, Hebei Spirit, and Deepwater Horizon. *Environmental Science & Technology*, 54, n. 11, p. 6456-6467, 2020/06/02 2020.

BAYEN, S. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: A review. *Environment International*, 48, p. 84-101, 2012.

BEEKHUIZEN, M.; DE KONING, C.; FLORES-GUILLÉN, M. E.; DE VRIES-BUITENWEG, S. *et al.* From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology*, 56, p. 64-76, 2015.

BEYER, J.; JONSSON, G.; PORTE, C.; KRAHN, M. M. *et al.* Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30, n. 3, p. 224-244, 2010.

BEZERRA, R. S. V., Vera Lúcia A. ; Santos, Athiê Jorge G. Ciclo Reprodutivo da Carapeba Prateada *Diapterus rhombeus* (Cuvier, 1829), no Litoral de Pernambuco – Brasil. *Tropical Oceanography*, 29, n. 1, p. 67-78, 2001.

BOEHM, P. D.; PAGE, D. S. Exposure Elements in Oil Spill Risk and Natural Resource Damage Assessments: A Review. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 13, n. 2, p. 418-448, 2007/03/20 2007.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J. P.; SAGLIO, P. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47, n. 2, p. 117-124, 2000/10/01/ 2000.

BRUM, H. D.; CAMPOS-SILVA, J. V.; OLIVEIRA, E. G. Brazil oil spill response: Government inaction. *Science*, 367, n. 6474, p. 155, 2020.

BUSQUET, F.; STRECKER, R.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E. *et al.* OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69, n. 3, p. 496-511, 8/ 2014.

CAMILLI, R.; DI IORIO, D.; BOWEN, A.; REDDY, C. M. *et al.* Acoustic measurement of the Deepwater Horizon Macondo well flow rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, n. 50, p. 20235-20239, 2012.

CANEDO, A.; DE JESUS, L. W. O.; BAILÃO, E. F. L. C.; ROCHA, T. L. Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. *Environmental Pollution*, 290, p. 118019, 2021/12/01/ 2021.

CARVALHO, P. S. M. Behavioral Biomarkers and Pollution Risks to Fish Health and Biodiversity. *In: Almeida, E. A. d. e Ribeiro, C. A. d. O. (Ed.). Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2014. v. 1, p. 350-378.

CHERR, G. N.; FAIRBAIRN, E.; WHITEHEAD, A. Impacts of Petroleum-Derived Pollutants on Fish Development. 5, n. 1, p. 185-203, 2017.

CRAVEIRO, N.; DE ALMEIDA ALVES, R. V.; DA SILVA, J. M.; VASCONCELOS, E. *et al.* Immediate effects of the 2019 oil spill on the macrobenthic fauna associated with macroalgae on the tropical coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 165, p. 112107, 2021/04/01/ 2021.

DAMÁSIO, J. B.; BARATA, C.; MUNNÉ, A.; GINEBRED, A. *et al.* Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere*, 66, n. 7, p. 1206-1216, 2007.

DE OLIVEIRA, O. M. C.; DE S. QUEIROZ, A. F.; CERQUEIRA, J. R.; SOARES, S. A. R. *et al.* Environmental disaster in the northeast coast of Brazil: Forensic geochemistry in the identification of the source of the oily material. *Marine Pollution Bulletin*, 160, p. 111597, 2020/11/01/ 2020.

DE SOUZA, C. S.; DE OLIVEIRA MAFALDA, P.; DE KIKUCHI, R. K. P.; DOMINGUEZ, J. M. L. Assessment of the Brazilian Coast Oil Spill Impact in the fish eggs and larvae development from the Tropical Continental Shelf. *Regional Studies in Marine Science*, 56, p. 102635, 2022/11/01/ 2022.

DI GIULIO, R.; HINTON, D. Introduction. *In: The Toxicology of Fishes*: CRC Press, 2008. p. 3-7.

DI GIULIO, R.; MEYER, J. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. *In: The Toxicology of Fishes*: CRC Press, 2008. cap. 6, p. 273-324.

DISSANAYAKE, A.; BAMBER, S. D. Monitoring PAH contamination in the field (South west Iberian Peninsula): Biomonitoring using fluorescence spectrophotometry and physiological assessments in the shore crab *Carcinus maenas* (L.) (Crustacea: Decapoda). *Marine Environmental Research*, 70, n. 1, p. 65-72, 7// 2010.

EMBRY, M. R.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T. A.; GALAY-BURGOS, M. *et al.* The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*, 97, n. 2, p. 79-87, 2010.

FEDERAL, P. **Polícia Federal deflagra operação que visa esclarecer derramamento de óleo no litoral brasileiro.** Operação Mácula cumpre mandados de busca e apreensão em endereços ligados a representantes da empresa responsável pelo navio no qual teria ocorrido o vazamento, Brasil, RN, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/pf/pt-br/assuntos/noticias/2019/11/policia-federal-deflagra-operacao-que-visa-esclarecer-derramamento-de-oleo-no-litoral-brasileiro>.

FENECH, M. CHAPTER 2. Mechanisms by Which Genotoxins Cause Micronuclei and Other Nuclear Anomalies. *In*, 2019. p. 8-23.

FIGUEIREDO, J. d. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil.** Universidad de São Paulo, Museu de Zoologia, 1980.

FIMOGNARI, C.; TURRINI, E.; FERRUZZI, L.; LENZI, M. *et al.* Natural isothiocyanates: Genotoxic potential versus chemoprevention. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 750, n. 2, p. 107-131, 2012/04/01/ 2012.

FIORAVANTI, C. **Os caminhos da mancha.** Análises indicam três regiões perto da costa brasileira onde o vazamento de petróleo pode ter ocorrido, Brazil-SP, 2020. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/os-caminhos-da-mancha/>. Acesso em: 03.26.2025.

FRANCO, T. P.; NEVES, L. M.; TEIXEIRA, T. P.; ARAÚJO, F. G. Patterns of spatial distribution of five species of mojarras (Actinopterygii: Gerreidae) in a small tropical estuary in south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92, n. 5, p. 1217-1225, 2012.

GABARDO, I. T.; CARNEIRO, M. E. R.; FALCÃO, L. V.; MENICONI, M. F. G. *et al.*, 2005, **Oil spills in a tropical Country - Brazilian case studies**. 9550-9560. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33646023976&partnerID=40&md5=1f1181acbf42639579e088c0c557f284>.

GAGNÉ, F. Chapter 7 - Xenobiotic Biotransformation. *In*: Gagné, F. (Ed.). **Biochemical Ecotoxicology**. Oxford: Academic Press, 2014a. p. 117-130.

GAGNÉ, F. Oxidative Stress. p. 103-115, 2014b.

GERHARDT, A. Aquatic Behavioral Ecotoxicology—Prospects and Limitations. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 13, n. 3, p. 481-491, 2007/05/16 2007.

HAGENAARS, A.; STINCKENS, E.; VERGAUWEN, L.; BERVOETS, L. *et al.* PFOS affects posterior swim bladder chamber inflation and swimming performance of zebrafish larvae. *Aquat Toxicol*, 157, p. 225-235, Dec 2014.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, p. 51-88, 2005.

HELFMAN, G. S. Fishes, Biodiversity of. *In*: Levin, S. A. (Ed.). **Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)**. Waltham: Academic Press, 2013. p. 456-476.

HODSON, P. V. The Toxicity to Fish Embryos of PAH in Crude and Refined Oils. *Arch Environ Contam Toxicol*, 73, n. 1, p. 12-18, Jul 2017.

HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. F.; TORRANCE, J. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496, p. 498, 04/17/online 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. d. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, p. 1170-1179, 2008.

HUSSAR, E.; RICHARDS, S.; LIN, Z.-Q.; DIXON, R. P. *et al.* Human Health Risk Assessment of 16 Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils of Chattanooga, Tennessee, USA. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223, n. 9, p. 5535-5548, 2012/11/01 2012.

INCARDONA, J. P.; CARLS, M. G.; HOLLAND, L.; LINBO, T. L. *et al.* Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring. *Scientific Reports*, 5, n. 1, p. 13499, 2015/09/08 2015.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 196, n. 2, p. 191-205, Apr 15 2004a.

INCARDONA, J. P.; SCHOLZ, N. L. Environmental Pollution and the Fish Heart. 36, p. 373-433, 2017b.

INGHAM, P. W.; MCMAHON, A. P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, 15, n. 23, p. 3059-3087, Dec 1 2001.

JERNELÖV, A. How to defend against future oil spills. *Nature*, 466, n. 7303, p. 182-183, 2010/07/01 2010.

JING, L.; EL-HOUJEIRI, H. M.; MONFORT, J.-C.; BRANDT, A. R. *et al.* Carbon intensity of global crude oil refining and mitigation potential. *Nature Climate Change*, 10, n. 6, p. 526-532, 2020/06/01 2020.

JOHANN, S.; NUSSER, L.; GOSSEN, M.; HOLLERT, H. *et al.* Differences in biomarker and behavioral responses to native and chemically dispersed crude and refined fossil oils in zebrafish early life stages. *Sci Total Environ*, 709, p. 136174, Mar 20 2020.

JOHNSON, L.; ARKOOSH, M.; BRAVO, C.; COLLIER, T. *et al.* The Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish from Puget Sound, Washington. In: **The Toxicology of Fishes**: CRC Press, 2008. p. 877-923.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. 2001.

KIRBY, M. F.; MORRIS, S.; HURST, M.; KIRBY, S. J. *et al.* The Use of Cholinesterase Activity in Flounder (*Platichthys flesus*) Muscle Tissue as a Biomarker of Neurotoxic Contamination in UK Estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 40, n. 9, p. 780-791, 2000/09/01/ 2000.

KORZH, S.; PAN, X.; GARCIA-LECEA, M.; WINATA, C. L. *et al.* Requirement of vasculogenesis and blood circulation in late stages of liver growth in zebrafish. *BMC Developmental Biology*, 8, n. 1, p. 84, 2008/09/16 2008.

KOSSACK, M. E.; DRAPER, B. W. Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*). *Curr Top Dev Biol*, 134, p. 119-149, 2019.

KUJAWINSKI, E. B.; KIDO SOULE, M. C.; VALENTINE, D. L.; BOYSEN, A. K. *et al.* Fate of dispersants associated with the Deepwater Horizon oil spill. *Environmental science & technology*, 45, n. 4, p. 1298-1306, 2011.

LI, X.; DING, G.; XIONG, Y.; MA, X. *et al.* Toxicity of Water-Accommodated Fractions (WAF), Chemically Enhanced WAF (CEWAF) of Oman Crude Oil and Dispersant to Early-Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). *Bull Environ Contam Toxicol*, 101, n. 3, p. 314-319, Sep 2018.

LI, X.; XIONG, D.; DING, G.; FAN, Y. *et al.* Exposure to water-accommodated fractions of two different crude oils alters morphology, cardiac function and swim bladder development in early-life stages of zebrafish. *Chemosphere*, 235, p. 423-433, 2019/11/01/ 2019.

LIM, C.; LEE, J. An analysis of the efficiency of the oil refining industry in the OECD countries. *Energy Policy*, 142, p. 111491, 2020/07/01/ 2020.

LIN, E. L. C.; CORMIER, S. M.; TORSELLA, J. A. Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence: Comparison with

HPLC-fluorescent detection. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35, n. 1, p. 16-23, 1996.

LINDSEY, B. W.; SMITH, F. M.; CROLL, R. P. From Inflation to Flotation: Contribution of the Swimbladder to Whole-Body Density and Swimming Depth During Development of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 7, n. 1, p. 85-96, 2010.

LIRA, A. L. d. O.; CRAVEIRO, N.; DA SILVA, F. F.; ROSA FILHO, J. S. Effects of contact with crude oil and its ingestion by the symbiotic polychaete *Branchiosyllis* living in sponges (*Cinachyrella* sp.) following the 2019 oil spill on the tropical coast of Brazil. *Science of The Total Environment*, 801, p. 149655, 2021/12/20/ 2021.

LÓPEZ-DOVAL, J. C.; GINEBRED, A.; CAQUET, T.; DAHM, C. N. *et al.* Pollution in mediterranean-climate rivers. *Hydrobiologia*, 719, n. 1, p. 427-450, 2013/11/01 2013.

LOURENÇO, R. A.; COMBI, T.; ALEXANDRE, M. d. R.; SASAKI, S. T. *et al.* Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. *Marine Pollution Bulletin*, 156, p. 111219, 2020/07/01/ 2020.

MACK, A.; ROBITZKI, A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. *Progress in Neurobiology*, 60, n. 6, p. 607-628, 2000/04/01/ 2000.

MACKAY, D.; SHIU, W. Y.; MA, K. C. **Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals**. Taylor & Francis, 1993. v. v. 3). 9780873719735.

MAGALHÃES, K. M.; CARREIRA, R. S.; ROSA FILHO, J. S.; ROCHA, P. P. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. *Marine Pollution Bulletin*, 175, p. 113334, 2022/02/01/ 2022.

MAGRIS, R. A.; GIARRIZZO, T. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 153, p. 110961, 2020/04/01/ 2020.

MARIZ JR, C. F. Diagnóstico ecotoxicológico do Rio Ipojuca utilizando estágios iniciais de desenvolvimento do peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822). 2021. (Mestre) - Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE.

MARIZ JR, C. F.; ALVES, M. K. M.; SANTOS, S.; ALVES, R. N. *et al.* Lethal and Sublethal Toxicity of Un-Ionized Ammonia to Early-Life Stages of *Danio rerio*. *Zebrafish*, Mar 23 2023.

MARIZ JR, C. F.; NASCIMENTO, J. V. G.; MORAIS, B. S.; ALVES, M. K. M. *et al.* Toxicity of the oil spilled on the Brazilian coast at different degrees of natural weathering to early life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Marine Pollution Bulletin*, 207, p. 116819, 2024/10/01/ 2024.

MARSHALL, A. G.; RODGERS, R. P. Petroleomics: The Next Grand Challenge for Chemical Analysis. *Accounts of Chemical Research*, 37, n. 1, p. 53-59, 2004/01/01 2004.

MARTINS, S. E.; FILLMANN, G.; LILICRAP, A.; THOMAS, K. V. Review: ecotoxicity of organic and organo-metallic antifouling co-biocides and implications for environmental hazard and risk assessments in aquatic ecosystems. *Biofouling*, 34, n. 1, p. 34-52, 2018/01/02 2018.

MAUGERI, L. John D. Rockefeller's Cursed Legacy. *In: The age of oil : the mythology, history, and future of the world's most controversial resource*. Westport: Praeger, 2006. cap. 1, p. 3-18.

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Chapter 4 - Oxidant Stress, Antioxidant Defense, and Liver Injury. *In: Kaplowitz, N. e DeLeve, L. D. (Ed.). Drug-Induced Liver Disease (Third Edition)*. Boston: Academic Press, 2013. p. 71-84.

MELO ALVES, M. K. d.; MARIZ JR, C. F.; MELO, T. J. B. d.; ALVES, R. N. *et al.* Oil spill impact on Brazilian coral reefs based on seawater polycyclic aromatic hydrocarbon contamination, biliary fluorescence and enzymatic biomarkers in damselfish *Stegastes fuscus* (Teleostei, Pomacentridae). *Marine Pollution Bulletin*, 208, p. 116958, 2024/11/01/ 2024.

MENEZES, M. E. d. S.; GISELDA MACEMA, L.; OMENA, C. M. B. d.; FREITAS, J. D. d. *et al.* Valor nutritivo de peixes da costa marítima de Alagoas, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 68, n. 1, p. 21-28, 2009.

MENICONI, M. F. G.; GABARDO, I. T. Brazilian Oil Spills Chemical Characterization - Case Studies. *Environmental Forensics*, 3, p. 303-321, 2002 2002.

MIALL, A. D. **The geology of fluvial deposits: sedimentary facies, basin analysis, and petroleum geology**. 1996. (The geology of fluvial deposits: sedimentary facies, basin analysis, and petroleum geology, Book.

MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; PATTON, E. E. The melanocyte lineage in development and disease. *Development*, 142, n. 4, p. 620-632, 2015.

NRC, N. R. C. **Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects**. Washington, DC: The National Academies Press, 1985. 619 p. 978-0-309-07835-1.

NUNES, B.; GAIO, A. R.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, n. 2, p. 341-354, 2008.

OLIVARES-RUBIO, H. F.; ESPINOSA-AGUIRRE, J. J. Acetylcholinesterase activity in fish species exposed to crude oil hydrocarbons: A review and new perspectives. *Chemosphere*, 264, p. 128401, 2021/02/01/ 2021.

PASPARAKIS, C.; ESBAUGH, A. J.; BURGGREN, W.; GROSELL, M. Physiological impacts of Deepwater Horizon oil on fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 224, p. 108558, 2019/10/01/ 2019.

PEREIRA, E. B.; MARTINS, F. R.; GONÇALVES, A. R.; COSTA, R. S. *et al.* Atlas brasileiro de energia solar. Espaciais), I. I. N. d. P. São José dos Campos: INPE: 80 p. 2017.

PETERSON, C. H.; RICE, S. D.; SHORT, J. W.; ESLER, D. *et al.* Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science*, 302, n. 5653, p. 2082-2086, 2003/12/19 2003.

PICCIOTTO, Marina R.; HIGLEY, Michael J.; MINEUR, Yann S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron*, 76, n. 1, p. 116-129, 2012/10/04/ 2012.

POFF, N. L.; ALLAN, J. D.; BAIN, M. B.; KARR, J. R. *et al.* The Natural Flow Regime. *BioScience*, 47, n. 11, p. 769-784, 1997.

QUEIROZ, S. C. N. Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo. *Ambiente, E. M. Jaguariúna: Embrapa*. 1: 15 p. 2009.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to Aquatic Toxicology *In*: Rand, G. M. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Assessment**. 2 ed. USA: Taylor e Francis, 1995. cap. 1, p. 3-68.

RANGES, K.; HEUER, R. M.; DURANT, A.; GROSELL, M. Larval Zebrafish Startle Response Is Highly Sensitive to Crude Oil Exposure. *ACS ES&T Water*, 4, n. 6, p. 2511-2521, 2024/06/14 2024.

REDDY, C. M.; NELSON, R. K.; HANKE, U. M.; CUI, X. *et al.* Synergy of Analytical Approaches Enables a Robust Assessment of the Brazil Mystery Oil Spill. *Energy & Fuels*, 36, n. 22, p. 13688-13704, 2022/11/17 2022.

ROBERTS, A. P.; ALLOY, M. M.; ORIS, J. T. Review of the photo-induced toxicity of environmental contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 191, p. 160-167, 2017/01/01/ 2017.

SANTANA, J. L.; RIOS, A. S.; CALADO, T. C. S.; ZANARDI-LAMARDO, E. *et al.* Reef crab population changes after oil spill disaster reach Brazilian tropical environments. *Marine Pollution Bulletin*, 183, p. 114047, 2022/10/01/ 2022.

SCHWARZENBACH, R. P.; ESCHER, B. I.; FENNER, K.; HOFSTETTER, T. B. *et al.* The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science*, 313, n. 5790, p. 1072, 2006.

SEEWALD, J. S. Organic-inorganic interactions in petroleum-producing sedimentary basins. *Nature*, 426, n. 6964, p. 327-333, 2003/11/01 2003.

SHASHA, C. Z., Dong; Xiaohua, Dong; Wenshuang, Jia; Fuyou, Zhou; and Qingshun, Zhao. Zebrafish *sox2* Is Required for the Swim Bladder Inflation by Controlling the Swim-Up Behavior. 20, n. 1, p. 10-18, 2023.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical journal*, 360, n. Pt 1, p. 1-16, 2001.

SHORT, J. W.; LINDEBERG, M. R.; HARRIS, P. M.; MASELKO, J. M. *et al.* Estimate of oil persisting on the beaches of Prince William Sound 12 years after the Exxon Valdez oil spill. *Environmental science & technology*, 38, n. 1, p. 19-25, 2004.

SIEBEL, A. M. B., Carla. Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. *In*: Resende, R. R. (Ed.). **Biotecnologia Aplicada à Saúde** Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4o andar 04531- 934, São Paulo – SP – Brasil: Blücher, 2015. v. 1, cap. 1, p. 15-55.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, n. 9, p. 916-921, 1999/11/01/ 1999.

SILVA, J. S.; ALVES, R. N.; DE PAULO, D. V.; MARIZ JR, C. F. *et al.* Biliary polycyclic aromatic hydrocarbons and enzymatic biomarkers in *Eugerres brasiliensis* along four tropical estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 163, p. 111919, 2021/02/01/ 2021.

SINGER, M. M.; AURAND, D.; BRAGIN, G. E.; CLARK, J. R. *et al.* Standardization of the Preparation and Quantitation of Water-accommodated Fractions of Petroleum for Toxicity Testing. *Marine Pollution Bulletin*, 40, n. 11, p. 1007-1016, 2000/11/01/ 2000.

SMELTZ, M.; ROWLAND-FAUX, L.; GHIRAN, C.; PATTERSON, W. F., 3rd *et al.* A multi-year study of hepatic biomarkers in coastal fishes from the Gulf of Mexico after the Deepwater Horizon Oil Spill. *Mar Environ Res*, 129, p. 57-67, Aug 2017.

SOARES, M. O.; TEIXEIRA, C. E. P.; BEZERRA, L. E. A.; RABELO, E. F. *et al.* The most extensive oil spill registered in tropical oceans (Brazil): the balance sheet of a disaster. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, n. 13, p. 19869-19877, 2022/03/01 2022.

SØRHHUS, E.; DONALD, C. E.; NAKKEN, C. L.; PERRICHON, P. *et al.* Co-exposure to UV radiation and crude oil increases acute embryotoxicity and sublethal malformations in the early life stages of Atlantic haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Science of The Total Environment*, p. 160080, 2022/11/11/ 2022.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83, n. 1, p. 13-34, 2008/02/01 2008.

STAINIER, D. Y. R.; FOUQUET, B.; CHEN, J.-N.; WARREN, K. S. *et al.* Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development*, 123, n. 1, p. 285-292, 1996.

STEEN, J. B. 10 The Swim Bladder as a Hydrostatic Organ. *In*: Hoar, W. S. e Randall, D. J. (Ed.). **Fish Physiology**: Academic Press, 1970. v. 4, p. 413-443.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. *In*: Malins, D. C. e Ostrander, G. K. (Ed.). **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1994. p. 87-206.

STEGEMAN, J. J.; WOODIN, B. R.; SINGH, H.; OLEKSIK, M. F. *et al.* Cytochromes P450 (CYP) in Tropical Fishes: Catalytic Activities, Expression of Multiple CYP Proteins and High Levels of Microsomal P450 in Liver of Fishes From Bermuda. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 116, n. 1, p. 61-75, 1/ 1997.

STINCKENS, E.; VERGAUWEN, L.; ANKLEY, G. T.; BLUST, R. *et al.* An AOP-based alternative testing strategy to predict the impact of thyroid hormone disruption on swim bladder inflation in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 200, p. 1-12, 7/ 2018.

TARBELL, I. The Birth of an Industry. In: Belt (Ed.). **The History of the Standard Oil Company**. Ohio: Belt Publishing, 2018. v. 1, cap. 1, p. 18-31.

VAN DER OOST, R.; PORTE-VISA, C.; VAN DEN BRINK, N. Biomarkers in environmental assessment. Exotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends, and strategies, p. 87-152, 2005.

VERGAUWEN, L.; SCHMIDT, S. N.; STINCKENS, E.; MAHO, W. *et al.* A high throughput passive dosing format for the Fish Embryo Acute Toxicity test. *Chemosphere*, 139, p. 9-17, 2015.

VON HELLFELD, R.; BROTZMANN, K.; BAUMANN, L.; STRECKER, R. *et al.* Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe*, 32, n. 1, p. 122, 2020/09/29 2020.

VUILLEUMIER, S. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *Journal of bacteriology*, 179, n. 5, p. 1431-1441, 1997.

VUORINEN, P. J.; KEINÄNEN, M.; VUONTISJÄRVI, H.; BARŠIENE, J. *et al.* Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 53, n. 8-9, p. 479-487, 2006.

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

WANG, Z.; WALKER, G. W.; MUIR, D. C. G.; NAGATANI-YOSHIDA, K. Toward a Global Understanding of Chemical Pollution: A First Comprehensive Analysis of National and Regional Chemical Inventories. *Environmental Science & Technology*, 54, n. 5, p. 2575-2584, 2020/03/03 2020.

WANHONG, L.; FANG, L.; FAN, W.; MAIQI, D. *et al.* Industrial water pollution and transboundary eco-compensation: analyzing the case of Songhua River Basin, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 10/01 2020.

WEBB, P. W. Control of Posture, Depth, and Swimming Trajectories of Fishes1. *Integrative and Comparative Biology*, 42, n. 1, p. 94-101, 2002.

WENNING, R. J.; MARTELLO, L. Chapter 8 - POPs in Marine and Freshwater Environments. In: O'Sullivan, G. e Sandau, C. (Ed.). **Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 357-390.

WHYTE, J. J.; JUNG, R. E.; SCHMITT, C. J.; TILLITT, D. E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 30, n. 4, p. 347-570, 2000.

WINATA, C. L.; KORZH, S.; KONDRYCHYN, I.; ZHENG, W. *et al.* Development of zebrafish swimbladder: The requirement of Hedgehog signaling in specification and organization of the three tissue layers. *Dev Biol*, 331, n. 2, p. 222-236, Jul 15 2009.

YANG, F.; LI, G.; SANG, N. Embryonic exposure to soil samples from a gangue stacking area induces thyroid hormone disruption in zebrafish. *Chemosphere*, 236, p. 124337, 2019/12/01/ 2019.

YIN, A.; KORZH, S.; WINATA, C. L.; KORZH, V. *et al.* Wnt Signaling Is Required for Early Development of Zebrafish Swimbladder. *PLOS ONE*, 6, n. 3, p. e18431, 2011.

ZACHARIAS, D. C.; GAMA, C. M.; FORNARO, A. Mysterious oil spill on Brazilian coast: Analysis and estimates. *Marine Pollution Bulletin*, 165, p. 112125, 2021/04/01/ 2021.

ZACHARIAS, D. C.; GAMA, C. M.; HARARI, J.; DA ROCHA, R. P. *et al.* Mysterious oil spill on the Brazilian coast – Part 2: A probabilistic approach to fill gaps of uncertainties. *Marine Pollution Bulletin*, 173, p. 113085, 2021/12/01/ 2021.

ZHANG, J.; TANG, D.; AHMAD, I.; WANG, M. River human harmony model to evaluate the relationship between humans and water in river basin. *Current Science*, 109, p. 1130-1139, 2015.

III MANUSCRITO 1 (Toxicity of the oil spilled on the Brazilian coast at different degrees of natural weathering to early life stages of the zebrafish *Danio rerio*) - Published in Marine Pollution Bulletin – doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116819

ABSTRACT

Toxicity of water accommodated fractions (WAF) from the oil spilled on the Brazilian coast at different stages of weathering were investigated using *Danio rerio*. Weathering stages included emulsified oil that reached the coast (OM) and oil collected 50 days later deposited on beach sand (OS) or adhered to shore rocks (OR). Parent and alkylated naphthalenes decreased whereas phenanthrenes increased from less weathered WAF-OM to more weathered WAF-OS and WAF-OR. More weathered WAF-OS and WAF-OR were more potent inducers of zebrafish developmental delay, suggesting that parent and alkylated phenanthrenes are involved. However, less weathered WAF-OM was a more potent inducer of failure in swim-bladder inflation than more weathered WAF-OS and WAF-OR, suggesting that parent and alkylated naphthalenes are involved. Decreases in heart rates and increased heart and skeletal deformities were observed in exposed larvae. Lowest observed effect concentrations for different developmental toxicity endpoints are within environmentally relevant polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations.

1.1 INTRODUCTION

The Brazilian coast was hit by spilled oil from late August 2019 to January 2020, spreading through 3000 km of the northeastern coastline, affecting a wide diversity of marine organisms and different habitats (CAMPELO *et al.*, 2021; CRAVEIRO *et al.*, 2021; MAGRIS *et al.*, 2020; SANTANA *et al.*, 2022; ZACHARIAS; GAMA; FORNARO, 2021). This event caused social and economic impacts to vulnerable fishing communities and the tourism production chain (CÂMARA *et al.*, 2021; DE OLIVEIRA ESTEVO *et al.*, 2021; ESCOBAR, 2019). The oil residues that reached the coast had a viscous appearance, denser than seawater, suggesting that weathering processes altered the original composition of the crude oil, but still included branched, cyclic, and normal alkanes between C14–C41 and toxicologically relevant parent and alkylated isomers of two to six ring polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (LOURENÇO *et al.*, 2020; REDDY *et al.*, 2022).

The weathering processes generated oil masses with an emulsified appearance and considerable viscosity, resulting in greater adherence to uneven surfaces. Tidal oscillations were fundamental in the adhesion processes of this mousse to coral reefs and rocky surfaces, which at each cycle had its irregular surface exposed, favoring the establishment of the oil.

During high tides and on open beaches, oil masses floated over the reefs and were deposited on the shoreline of sandy beaches. Part of this oil also entered some estuaries, adhering to the roots and stems of native mangrove plants. Furthermore, submerged oil deposited underneath sediments of some estuaries in the state of Pernambuco were observed. Shortly after and during the following 7 months of this event, approximately 5380 tons of emulsified and residue oil were removed from 3000 km of the Brazilian coastline (BRUM *et al.*, 2020; SOARES *et al.*, 2022), 50 % of this mass along the coast of Pernambuco State.

The impact on the benthic fauna of reef habitats shortly after oil arrival on Paiva Beach (Pernambuco State) was verified based on the reduction of population abundances and species richness followed by a partial recovery two months later (CRAVEIRO *et al.*, 2021; LIRA *et al.*, 2021). A decrease in female crabs of *Pachygrapsus transversus* was reported in three contaminated reefs during this event along the coast of Pernambuco and Alagoas States (SANTANA *et al.*, 2022). Abundance of oil droplets was quantified in the coastal region of Tamandaré (Pernambuco State), and traces of oil ingestion were verified in crab larvae indicating potential effects on microzooplankton (CAMPELO *et al.*, 2021).

Although a significant mass of the oil was removed from affected areas, during and after the event a significant portion of the hydrocarbon molecules in the oil gradually dissolved into the water of affected aquatic ecosystems. It has been shown that the dissolution of PAHs from spilled oil into water can generate a mixture potentially toxic to aquatic organisms, among which fish embryo-larval stages are possibly the most sensitive (CHERR *et al.*, 2017; HODSON, 2017). In the laboratory it is possible to simulate this dissolution of PAH and other compounds leaching from oil into the water by preparing oil water accommodated fractions (WAF) (SINGER *et al.*, 2000). Zooxanthellae species were exposed to dissolved PAH in WAF from the oil that hit the Brazilian coast, causing physiological effects and a linear reduction in population growth (MÜLLER *et al.*, 2021). Exposure of fish early life stages (ELS) to very low $\mu\text{g L}^{-1}$ or even ng L^{-1} water concentrations of PAH causes developmental abnormalities in fish embryos and early larvae, including effects related to heart development and function and subsequent physiological and behavioral alterations that might affect recruitment to adult populations (CHERR *et al.*, 2017; INCARDONA *et al.*, 2015; PASPARAKIS *et al.*, 2019).

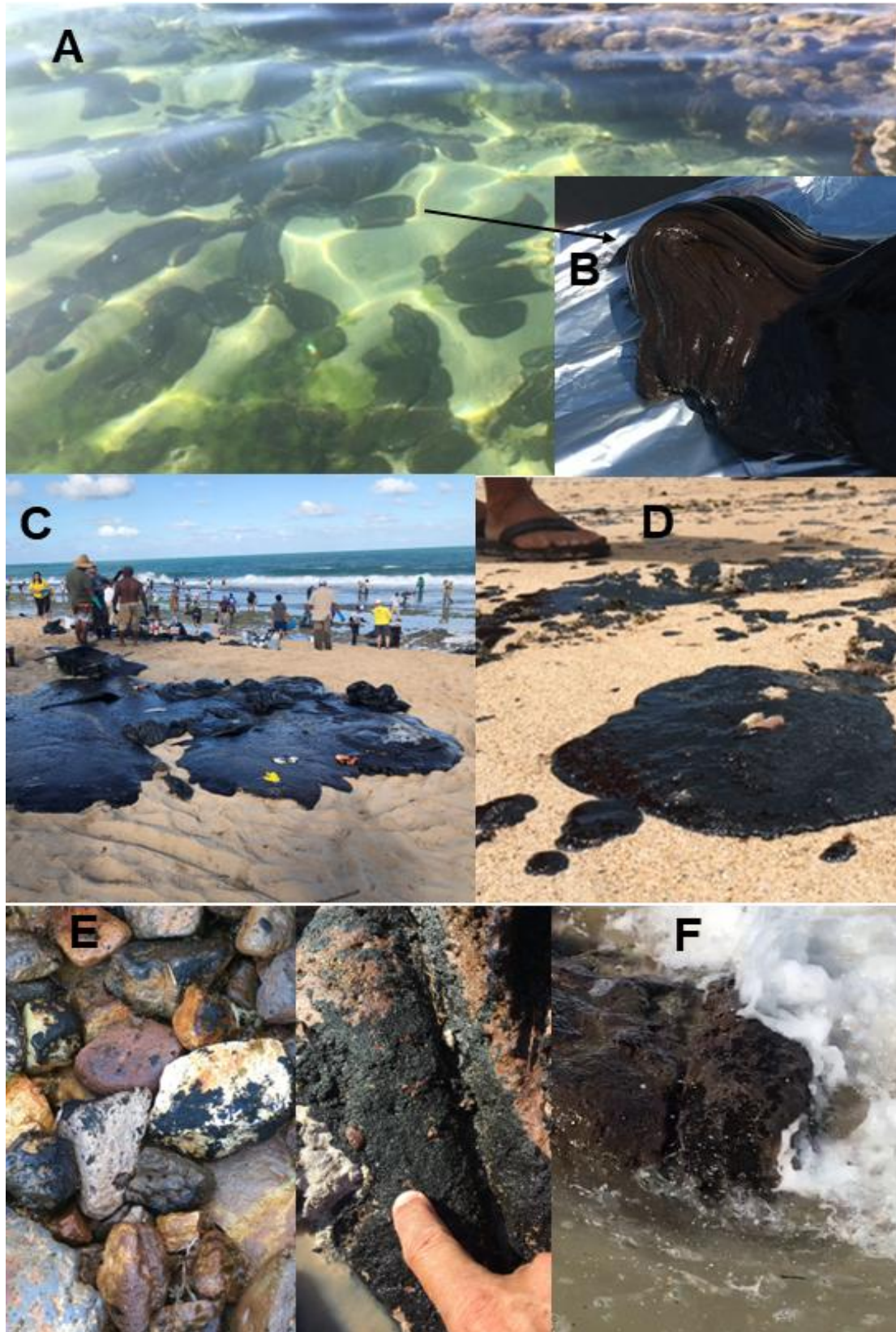


Figure 1- Photographs of oil at 3 stages of weathering: A and B: submerged oil mousse (OM) at a tidal pool in Paiva Beach, C and D: oil in sand (OS) stranded on the beach, E and F: oil adhered to rocks (OR) on the shore.

Zebrafish *Danio rerio* ELS have been used as a model to understand potential effects of PAH leached from oil during spill events as the optically transparent embryos and early larvae

allow for detailed morphological evaluation during early development, together with an array of molecular, biochemical, developmental and behavioral tools available (CRISTIANO *et al.*, 2019). Additionally, a standardized general morphology score (GMS) system allows the evaluation of sublethal toxicity based on assessment of developmental hallmarks during early embryo-larval development (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015), which has been applied to monitor water quality along hydrographic basins (ALVES *et al.*, 2023) or the effects of oil spills (LI *et al.*, 2019; PERRICHON *et al.*, 2016).

Along the coast of Pernambuco typical masses of emulsified oil reached the coast. In some areas the classic stabilized “oil mousse” (OM) denser than seawater was found submerged in sandy bottoms within reefs of Paiva Beach (Fig. 1A and B). Part of this mousse reached the supralittoral strip of sandy beaches, lost water after exposure to the sun, and became a dense oil residue frequently impregnated with sand particles, named oil in sand (OS, Fig. 1C and D). In other areas, the oil residues adhered to rocks and underwent weathering processes by the action of waves and sun exposure, named oil in rock (OR, Fig. 1E and F). During these three stages of oil weathering, contact of these oil residues with water at each tidal cycle and with the action of tidal currents and turbulence of waves could gradually dissolve PAH molecules into the water column. The different environmental factors that acted on the weathering of the oil may have generated different profiles of PAHs dissolved to the water with different toxic potentials for the exposed organisms. Therefore, this study aimed to evaluate the toxicity of WAFs prepared from the oil spilled on the Brazilian coast at these three different stages of weathering (OM, OS and OR) using pathological and developmental morphological endpoints along ELS of *Danio rerio*.

1.2 MATERIAL AND METHODS

1.2.1 Oil sampling and preparation of the oil water accommodated fraction

Samples of oil mousse (OM) were collected submerged among the tidal pools in coral reefs of Paiva beach (8°16'56.7"S, 34°56'48.6"W) on October 3rd, 2019. Oil in sand (OS) samples characterized by the weathered emulsified oil after its deposition and subsequent exposure to the sun over sand in the supralittoral strip were collected at Ponta do Xaréu Beach (8°17.929'S, 34° 57.135'W). Oil in rock (OR) samples were collected from small rocks at the mesolittoral region of Pedra do Xaréu Beach (8°18.008'S 34°57.014'W). Submerged samples were collected by hand and brought to the shore, where they were wrapped in aluminum foil. Oil in sand and oil in rock samples were also collected by hand, blocks of oil deposited on sand and whole small rocks with adhered oil were also wrapped in aluminum foil. All samples

were transported in coolers to the laboratory. Paiva and Ponta do Xaréu Beaches are located in the city of Cabo de Santo Agostinho in the state of Pernambuco Brazil, about 20 km from Recife, the State capital. OS and OR samples were collected on November 24, 2019, 50 days after submerged OM samples were collected at the peak of the oil spill. All oil samples were wrapped in aluminum foil and kept in sealed containers at room temperature (22 to 25 °C) until WAF preparation. Oil Water Accommodated Fractions were prepared within one week of receiving the samples based on (JULIE ADAMS, 2017; SINGER *et al.*, 2000). Oil samples were weighted to the nearest cg (0.01 g) and transferred to a glass 10 L Mariotte flask (Laborglass, São Paulo, Brazil). A proportion of 10 g of oil:1 L of zebrafish culture freshwater was used, and 10 L of each WAF was prepared. Zebrafish culture freshwater used for experiment was monitored with a multiparameter instrument (Professional Plus, YSI, USA) three times a week and the following parameters were measured (mean $\pm$ std. deviation): pH 7.2 ± 0.2 , conductivity $115 \pm 20 \mu\text{S cm}^{-1}$, alkalinity $60 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$, hardness $70 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$, dissolved oxygen $7.0 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ and temperature $27.5 \pm 0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Oil and water were kept under moderate agitation by a mechanical stirrer with a stainless steel rod inside the sealed aquarium in the dark during 24 h, followed by the separation and removal of the water phase of the mixture by decantation. The mixture representing the oil WAF was filtered with a 2 μm cellulose filter (Cat. QMP00015071250100, Química Moderna®, Brazil) to remove oil particles, and WAF samples from the 3 oil weathering stages (WAF-OM, WAF-OS and WAF-OR) were stored at 4 °C in 4 L amber flask vials covered with aluminum foil and a sealing cap.

1.2.2 Chemical analysis of PAHs in oil water accommodated fractions

Samples of oil WAFs were liquid-liquid extracted using 20 mL of nhexane (pesticide grade) on the day the zebrafish exposure solutions were prepared. Prior to that, 100 μL of a deuterated PAH MIX (Cerilliant, containing acenaphthene-d10, phenanthrene-d10 and chrysene-d12, at 1000 ng mL^{-1}) were added as surrogate standards in all samples. After extraction, samples were concentrated down to 1 mL and 100 μL of deuterated PAH fluorene-d10, benzo[a]anthracene-d12 and benzo[a] pyrene-d12 (Absolute Standards INC at 1000 ng mL^{-1}) were added to each extract as internal standards to calculate the recovery of surrogates. The sample concentrated to 1 mL was kept in $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ refrigeration until injection, not >2 weeks after preparation. Both parent (non-alkylated) and alkylated PAH (2 to 6 ringed alkylated homologs of naphthalenes, fluorenes, phenanthrenes + anthracenes, fluoranthenes + pyrenes, and benzo[a]anthracenes + chrysenes) were analyzed in a gas chromatograph

(Agilent Technologies, model 7820 A GC System) coupled to a mass spectrometer (Agilent technologies 5975 series MSD), resulting in 33 investigated analytes. The instrumental and quantification procedures are described in detail elsewhere (ARRUDA-SANTOS *et al.*, 2018; DE SOUZA DIAS DA SILVA *et al.*, 2024; ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2019). Recovery of surrogates ranged from 44.1 to 117.9%. A blank was fortified with a mix of PAH and the recovery of individual analytes were 62–101%. Those quality control parameters are within acceptable values according to LAUENSTEIN (1998). The limit of quantification (LOQ) was determined as the ratio of the lowest point of the calibration curve to the volume of water extracted, resulting in 0.25 ng L^{-1} for all analytes.

A set of diagnostic ratios to distinguish petrogenic or pyrogenic sources were applied based on (GHETU *et al.*, 2021). These included the ratios between concentrations of: low molecular weight/high molecular weight PAHs (LPAH/HPAH), alkylated/parent PAHs (Alkyl/ParentPAHs), anthracene/anthracene + phenanthrene (Ant/Ant+Phe), fluoranthene/fluoranthene + pyrene (Flu/Flu+Pyr). The ratio between concentrations of C1 through C4 naphthalenes/total PAHs was calculated as a weathering indicator (PAGE *et al.*, 2002).

1.2.3 Zebrafish culture and experimental design

The breeding stock of *Danio rerio* was fed with *Artemia nauplii* three times a day and commercial fish food with 40 % protein once a day. Fertilized eggs were obtained from a group of three males and six females, which were separated the previous afternoon in a 15 L aquarium. After early-morning spawning and fertilization, selection of fertilized and viable eggs was made by direct observation using a stereomicroscope Zeiss Stemi 2000 at $\times 50$ magnification. Coagulated, opaque or unfertilized eggs were discarded. Accepted fertilization rates for all experiments were $> 90 \%$. Animal handling and embryo exposures were performed in accordance with protocols approved by the Ethics Committee for Animal Experiments from the Federal University of Pernambuco.

The exposure system followed the standards of OECD 236 (OECD, 2013), where viable embryos at $< 3 \text{ h}$ post-fertilization (hpf) were individually placed in wells of polystyrene 24 well cell culture plates (Greiner®, Cat. No.-662102). Embryos were exposed during 168 h (7 days) to control zebrafish culture freshwater and to different dilutions of oil WAFs from the 3 different oil weathering stages. Exposure treatments included undiluted Oil WAFs (100 %), and 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 %, 3.125 %, and 1.56 % dilutions (v/v) of the 3 oil WAFs. All WAFs and dilutions were kept in 1 L amber bottles wrapped in aluminum foil refrigerated at

4 °C throughout the experiment. Before daily changes in exposure wells, the dilutions were naturally warmed to room temperature. The concentrations of PAH at each dilution were calculated based on the respective dilution factor applied to the results from the chromatographic analysis of undiluted (100 %) Oil WAFs.

One 24 well plate was used for each oil WAF dilution treatment, and at each well 2.5 mL of exposure solutions were added in the beginning of exposure in a semi-static exposure system, with 2 mL of exposure solutions being replaced every 24 h. The plates were maintained in an incubator at a constant temperature of 27.8 ± 0.2 °C. The light/dark cycle was set to 14 h:10 h.

In order to monitor possible variations in PAH concentrations during the experiments, WAF samples from all dilutions were daily measured before exposure water exchanges by a fixed fluorescence method. Fluorescence of WAF solutions was measured in 1 cm path length fluorescence quartz cuvettes (Hellma, Germany) using a spectrofluorometer (Spectramax M3, Molecular Devices) and excitation/emission wavelengths were: 290/335 nm for naphthalene (NAP), 380/430 nm for benzo[a]pyrene (BaP), 341/383 nm for pyrene (PYR), 260/380 nm for phenanthrene (PHE), 310/360 nm for chrysene (CHR) listed in (SILVA *et al.*, 2021). Results are expressed in relative fluorescence units using control water as a blank (supplementary Table S1).

1.2.4 Mortality rates

During exposure, each embryo was evaluated and death was attributed to any of the exposed embryos by stereomicroscopic inspection and detection of egg coagulation (24–72 hpf), absence of heartbeat at any time of observation after 48 hpf (48–168 hpf), no tail detachment (24–168 hpf) and absence of somites (24 hpf) as described at (OECD, 2013). Mortality was measured daily throughout the experiment. Mortality rates were calculated by the ratio of the number of accumulated dead embryos or larvae after 96 h or 168 h of exposure divided by the total number exposed embryos.

1.2.5 General morphology score

The General Morphology Score (GMS) index proposed by (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015) integrates partial scores attributed to each embryo as it develops hallmark morphological structures during the first 96 h of development. Each embryo was evaluated every 24 h until 96 hpf for the presence or absence of these morphological structures in an inverted microscope at magnification ranging from 40× to 100×. Embryos and early larvae receive points for each developmental hallmark achieved, and a perfectly developed larva at 96 hpf

receives 18 points as proposed by ALVES *et al.* (2021). GMS values were converted through min-max normalization to percentages of the maximal theoretical score taking into account maximal GMS score decreases verified in the experiment as proposed by LI *et al.* (2019), where maximal GMS score decrease is converted to 100 % and minimal decreases (perfect controls) are converted to 0 %.

1.2.6 Frequency of developmental abnormalities

The frequencies of developmental abnormalities in embryos and larvae were quantified by the ratio of the number of accumulated embryos or larvae with the specific abnormality divided by the total number of live exposed embryos after the exposure period considered. Pericardial and yolk sac edemas were evaluated between 48 and 168 hpf. Deformations in the morphology of the heart (stretch) and notochord deformities lordosis, kyphosis and scoliosis were evaluated at 168 hpf. Delay in mouth development was evaluated between 72 and 168 hpf. Failure in yolk sac absorption was evaluated at 96 hpf. Uninflated swim bladder was evaluated at 96 hpf.

1.2.7 Heart rate

Heart rate was measured at 48 and 72 hpf in 10 embryos from each treatment. The observations were made under an inverted microscope (DIGILAB®) at a magnification of 20×. Ventricular contractions were counted during a 30-s period with the aid of a stopwatch and counter. Heart rate was expressed in beats per minute.

1.2.8 Morphometric measurements

Morphometric measurements were performed based on photographs of larvae taken at a magnification of 20× using a stereomicroscope (Zeiss, model Stemi 2000C). Larval total length and eyes vertical and horizontal length were measured with an accuracy of 0.1 mm with the Software AxioVision (Zeiss, Germany). Assuming that the *Danio rerio* eye has an elliptic shape, the area of the eye was calculated based on the equation:

$$\text{Eye area} = \text{vertical radius} \times \text{horizontal radius} \times 3.1415$$

1.2.9 Statistical analysis

The lethal or effective concentrations affecting 50 % or 20 % of the organisms during the considered exposure period (LC50, EC50 or EC20) was calculated based on the logistic model using DRC package in software R version 4.0.2 (RITZ *et al.*, 2016). Normalized GMS scores, heart rate and morphometrics endpoints were analyzed by ANOVA when data were normal and homoscedasticity, or by Kruskal-Wallis when normality or homoscedasticity

failed. Normality was checked by Kolmogorov Smirnov test and homoscedasticity by Levene median test. When differences were detected, multiple comparison tests Dunnett (ANOVA) or Dunn (Kruskall Wallis) were performed to evaluate differences between different treatments and controls on software Sigmaplot 12.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Differences between the frequencies of developmental abnormalities among exposure treatments and the controls were evaluated by the t-test for two proportions on software Statistics Calculator (StatPac, Northfield, USA).

1.3 RESULTS

1.3.1 Chemical analysis of PAHs in oil water accommodated fractions

Total PAH concentrations including parent + alkylated molecules (Σ PAHt) (in WAF-OM, WAF-OS and WAF-OR) were 71.8; 29.0 and 26.4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, and total concentration of all alkylated molecules represent 87 %, 76 % and 80 % of Σ PAHt (Table 1). Percent contribution Σ PAHt of molecules with 2, 3, 4, 5 and 6 aromatic rings in WAF-OM was 66%, 25%, 8.6%, 0.2% and 0.1%; in WAF-OS was 41%, 44%, 14.5%, 0.3% and 0.1%, and in WAF-OR was 29%, 48%, 22.9%, 0.5% and 0.3%, respectively (Table 1). Percent contribution relative to Σ PAHt molecules with 2 aromatic rings tend to decrease while molecules with 3 and 4 aromatic rings tend to increase from less weathered WAF-OM to more weathered WAF-OR. Percent contribution relative to Σ PAHt of 5 and 6-ring PAH tend to increase from less weathered WAF-OM to more weathered WAF-OR. Within parent PAH molecules, Fluorene, Phenanthrene Among alkylated molecules, 2-ring C1-, C2- and C3-Naphthalenes, C1, C2 and C3-Fluorenes and 3-ring C1, C2 and C3- Phenanthrenes + Anthracenes predominate in all WAFs (Table 1 and Fig. S1 in supplementary material). Ratios Alkyl/ Parent-PAHs, Ant/Ant+Phe and Flu/Flu+Pyr indicate petrogenic origin of all WAFs, regardless of the weathering stage. Ratio C1-C4 Naphthalenes/ Σ PAHt decreased from 0.4 to 0.1 from less weathered WAF-OM to more weathered WAF-OR (Table 1).

A small variation in fluorescence for all WAF solutions used during exposure experiments was verified based on mean and standard deviations, providing quantitative information that WAF PAH concentrations were stable during exposure experiments (supplementary Table S1).

Table 1. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) in oil water accommodated fractions (WAF) from oil samples at different stages of natural weathering sampled at Paiva Beach and Ponta do Xaréu Beach along the coast of Pernambuco

Analyte	n-Ar	WAF-OM	% Σ PAHt	WAF-OS	% Σ PAHt	WAF-OR	% Σ PAHt
Naphthalene	2	0.064	0.1%	0.023	0.1%	0.021	0.1%
C1 Naphthalenes	2	5.999	8.4%	0.346	1.2%	0.020	0.1%
C2 Naphthalenes	2	12.027	16.8%	1.752	6.0%	0.255	1.0%
C3 Naphthalenes	2	8.357	11.6%	1.775	6.1%	0.738	2.8%
C4 Naphthalenes	2	2.868	4.0%	0.719	2.5%	0.594	2.3%
Acenaphthylene	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acenaphthene	2	1.040	1.4%	0.181	0.6%	0.042	0.2%
Fluorene	2	2.159	3.0%	0.463	1.6%	0.138	0.5%
C1 Fluorenes	2	6.561	9.1%	2.089	7.2%	1.334	5.1%
C2 Fluorenes	2	5.160	7.2%	2.352	8.1%	2.073	7.9%
C3 Fluorenes	2	3.457	4.8%	2.133	7.3%	2.377	9.0%
Sum of 2 aromatic ring molecules	2	47.69	66%	11.83	41%	7.59	29%
Phenanthrene	3	4.527	6.3%	4.759	16.4%	3.530	13.4%
Anthracene	3	0.404	0.6%	0.230	0.8%	0.137	0.5%
C1 Phenanthrenes + Anthracenes	3	5.489	7.6%	3.427	11.8%	3.094	11.7%
C2 Phenanthrenes + Anthracenes	3	4.120	5.7%	2.344	8.1%	2.838	10.8%
C3 Phenanthrenes + Anthracenes	3	2.075	2.9%	1.281	4.4%	1.812	6.9%
C4 Phenanthrenes + Anthracenes	3	0.974	1.4%	0.720	2.5%	1.027	3.9%
Fluoranthene	3	0.090	0.1%	0.116	0.4%	0.122	0.5%
Sum of 3 aromatic ring molecules	3	17.680	25%	12.876	44%	12.559	48%
Pyrene	4	0.442	0.6%	0.735	2.5%	0.456	1.7%
C1 Fluoranthenes + Pyrenes	4	0.974	1.4%	0.639	2.2%	0.884	3.4%
C2 Fluoranthenes + Pyrenes	4	1.116	1.6%	0.760	2.6%	1.147	4.3%
C3 Fluoranthenes + Pyrenes	4	0.870	1.2%	0.705	2.4%	1.130	4.3%
Benzo[a]anthracene	4	0.304	0.4%	0.123	0.4%	0.182	0.7%
Chrysene	4	0.309	0.4%	0.152	0.5%	0.234	0.9%
C1 Benzo[a]anthracenes + Chrysenes	4	0.780	1.1%	0.336	1.2%	0.538	2.0%
C2 Benzo[a]anthracenes + Chrysenes	4	0.797	1.1%	0.425	1.5%	0.791	3.0%
C3 Benzo[a]anthracenes + Chrysenes	4	0.483	0.7%	0.271	0.9%	0.473	1.8%
Benzo[b]fluoranthene	4	0.095	0.1%	0.066	0.2%	0.206	0.8%
Benzo[k]fluoranthene	4	0.006	0.01%	0.007	0.03%	ND	ND
Sum of 4 aromatic ring molecules	4	6.175	9%	4.219	15%	6.042	23%
Benzo[a]pyrene	5	0.113	0.2%	0.050	0.2%	0.059	0.2%
Dibenzo[a,h]anthracene	5	0.047	0.1%	0.023	0.1%	0.060	0.2%
Sum of 5 aromatic ring molecules	5	0.160	0.2%	0.073	0.3%	0.119	0.5%
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	6	0.012	0.02%	0.007	0.02%	0.015	0.1%
Benzo[ghi]perylene	6	0.048	0.1%	0.027	0.1%	0.061	0.2%
Sum of 6 aromatic ring molecules	6	0.059	0.1%	0.034	0.1%	0.076	0.3%
Σ total PAH (parent + alkylated): Σ PAHt		71.8	100%	29.0	100%	26.4	100%
Σ parent 16 PAH (% of Σ PAHt)		9.7	13%	7.0	24%	5.3	20%
Σ alkylated PAH (% of Σ PAHt)		62.1	87%	22.1	76%	21.1	80%
Total LPAH		65.4	91%	24.7	85%	20.2	76%
Total HPAH		6.4	9%	4.3	15%	6.2	24%
Ratio LPAH/HPAH > 2.3 *		5.6		4.3		2.8	
Ratio alkylated/parent PAH > 2.3 *		6.4		3.2		4.0	
Ratio Ant/Ant + Phe < 0.1*		0.08		0.05		0.04	
Ratio Flu/Flu + Pyr < 0.4*		0.2		0.1		0.2	
Ratio C1-C4 Naphthalenes/ Σ PAHt		0.41		0.16		0.06	

n-Ar: number of aromatic rings in molecule. ND: not detected. LPAH: Low molecular weight PAHs, HPAH: High molecular weight PAHs. OM: oil mousse; OS: oil in sand; OR: oil in rock; Ant: Anthracene; Phe: Phenanthrene; Fluo: Fluoranthene; Pyr: Pyrene. *: expected ratio value for petrogenic origin of PAH mixture according to Ghetu et al., (2021).

1.3.2 Mortality rates

Mortality rates of zebrafish exposed during 96 h to the different dilutions of oil WAF-OM, WAF-OS and WAF-OR were 10%, 0% and 5%, respectively, at the highest concentration exposures (100 % WAF), and LC50s could not be estimated (Supplementary

Table S2). Mortality rates of zebrafish exposed during 168 h to the different dilutions of oil WAFOM could be modelled and a LC50-168 h of $43.21 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ was estimated. Mortality rates of zebrafish exposed during 168 h to the different dilutions of oil WAF-OS and WAF-OR reached 10 % and 0 % at the highest concentration exposures (100% WAF), and LC50s could not be estimated.

1.3.3 General morphology score

Results indicated a concentration dependent delay in zebrafish embryo-larval development after exposure to all WAFs based on global morphology scores. The lowest observed effect concentration (LOEC) for normalized GMS values were 2.2, 3.6 and $1.6 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ or 0.30, 0.87 and $0.33 \mu\text{g L}^{-1}$ sum of parent PAH (ΣPAHp) for WAF-OM, WAF-OS and WAF-OR, respectively (Fig. 2). The effective concentration causing a 20 % increase in normalized GMS values (EC20-GMS) were 7.6 ± 1.0 , 3.4 ± 1.7 and $1.8 \pm 1.1 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ or 1.0 ± 0.1 , 0.8 ± 0.4 and $0.4 \pm 0.2 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHp L}^{-1}$ (EC20-GMS $\pm$ Standard Error) for WAF-OM, WAF-OS and WAF-OR, respectively (Fig. 2).

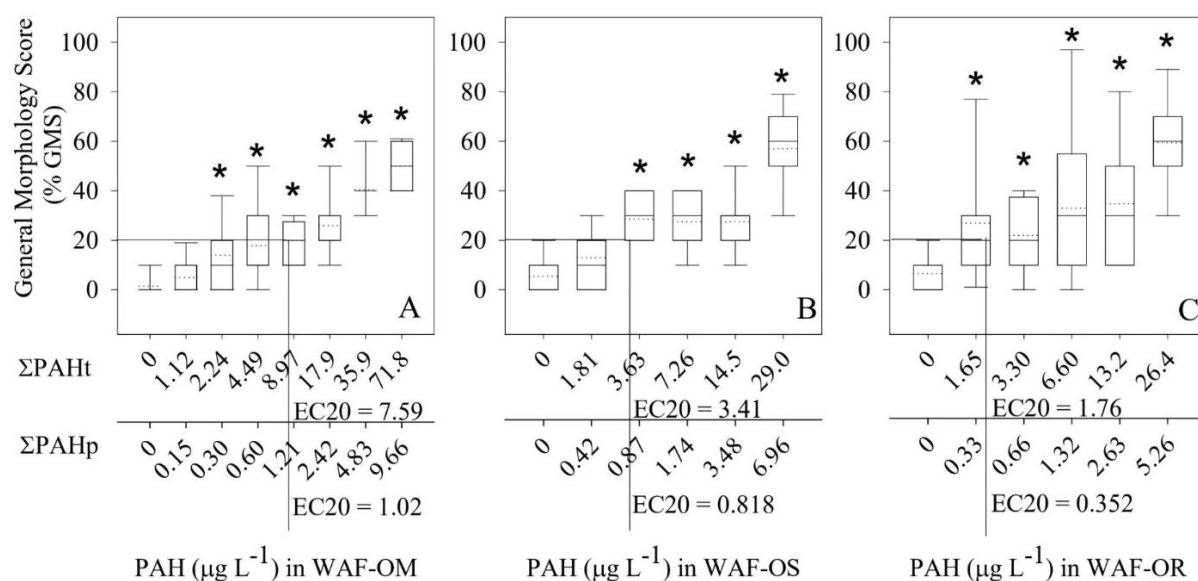


Fig 2. General Morphology Score (GMS) values for the embryo-larval phase of *Danio rerio* exposed to different PAH concentrations of oil water accommodated fractions (WAF) from oil samples at different stages of weathering sampled at Paiva Beach (WAF-OM) and Ponta do Xaréu Beach (WAF-OS and WAF-OR) along the coast of Pernambuco. Box plot continuous horizontal lines (lower, middle, and upper) indicate quartiles of 25, 50 (median), and 75%, respectively. A: (Kruskal-Wallis $H = 129.3$, $p < 0.001$, Dunn, $p < 0.05$); B: (Kruskal-Wallis $H = 93.8$, $p < 0.001$; Dunn, $p < 0.05$); C: (Kruskal-Wallis $H = 62.38$, $p \leq 0.001$; Dunn, $p < 0.05$). (*) statistically significant difference compared to Control and dotted line indicating mean GMS. (ΣPAHt) total PAH (Parent + alkylated) and (ΣPAHp) total 16 parent PAH.

1.3.4 Frequency of developmental abnormalities

Zebrafish exposed to different dilutions of WAF-OM, WAF-OS and WAF-OR indicated concentration dependent increases in frequency of developmental abnormalities represented

by pericardial and yolk sac edema, incomplete protrusible mouth, incomplete absorption of the yolk sac, deformed heart and absence of swim bladder (Table 2).

WAF effect concentrations causing a frequency of 50 % of larvae to develop incomplete yolk sac absorption (EC50-yolk sac) was equal to 8.0 ± 0.7 , 20.3 ± 2.7 and $12.5 \pm 2.3 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (mean $\pm$ standard error) for larvae exposed to WAF-OM, WAF-OS and WAF-OR, respectively. WAF effect concentrations causing a frequency of 50 % of larvae to develop uninflated swim bladders (EC50-swimbladder) was equal to 1.62 ± 0.31 , 22.4 ± 4.1 and $16.9 \pm 2.3 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (mean $\pm$ standard error) for larvae exposed to WAF-OM, WAF-OS and WAF-OR, respectively.

Table 2. Frequency (percentage) of developmental abnormalities in *Danio rerio* larvae after exposure to different PAH concentrations of oil water accommodated fractions (WAF) from oil samples at different stages of weathering sampled at Paiva Beach (WAF-OM) and Ponta do Xaréu Beach (WAF-OS and WAF-OR) along the coast of Pernambuco.

	$\Sigma \text{ PAHt}$		Pericardial edema	Yolk sac edema	Incomplete protrusible mouth	Incomplete Yolk sac absorption	Deformed heart	Dorsal curvature 168 hpf			Uninflated Swim bladder
	$\mu\text{g L}^{-1}$	N~	48- 168 hpf	48 - 168 hpf	72 - 96 hpf	96 hpf	168 hpf	Kyphosis	Lordosis	Scoliosis	96 hpf
WAF-OM	0	48	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	10%
	1.12	20	15%*	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	40%*
	2.24	20	5%	3%	5%	20%*	5%	0%	0%	5%	65%*
	4.49	19	0%	0%	3%	37%*	0%	0%	0%	5%	63%*
	8.97	20	0%	0%	13%*	50%*	0%	5%	0%	5%	85%*
	17.9	20	23%*	20%*	10%*	70%*	40%*	20%*	0%	5%	95%*
	35.9	17	45%*	74%*	50%*	89%*	90%*	10%*	30%*	0%	100%*
	71.8	16	66%*	43%*	50%*	100%*	86%*	0%	57%*	0%	100%*
WAF-OS	0	48	2%	0%	3%	4%	0%	0%	0%	0%	4%
	1.81	20	0%	0%	20%*	0%	0%	0%	0%	0%	10%
	3.63	20	0%	5%	15%*	15%	0%	0%	0%	0%	15%
	7.26	20	0%	0%	15%*	20%*	0%	0%	0%	0%	20%*
	14.5	20	0%	0%	45%*	15%	0%	0%	0%	0%	15%
	29	20	54%*	28%*	70%*	85%*	0%	0%	56%*	0%	70%*
WAF-OR	0	44	0%	5%	0%	2%	0%	0%	5%	2%	6%
	1.65	20	8%	10%	15%*	10%*	10%*	0%	5%	13%*	15%
	3.3	20	5%	10%	10%*	15%*	12%*	0%	0%	10%*	10%
	6.6	20	8%	25%*	25%*	35%*	10%*	0%	7%	7%	15%
	13.2	19	8%	32%*	5%	37%*	5%	0%	7%	14%*	32%*
	26.4	20	50%*	78%*	40%*	85%*	35%*	0%	5%	63%*	75%*

(*) Statistically different from control (t-test for two proportions, $p < 0.05$). hpf: hours post-fertilization. (N~) approximate number of organisms exposed. $\Sigma \text{ PAHt}$: parent + alkylated PAHs

1.3.5 Heart rate

Heart rates of zebrafish at 48 hpf exposed to different dilutions WAF-OM increased 6 % relative to controls (tachycardia) at 8.97 and $17.9 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ and decreased 7 % and 14 % (bradycardia) at 35.9 and $71.8 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively (Fig. 3A). At 72 hpf these trends were maintained, and heart rates increased 9 % relative to controls (tachycardia) at $17.9 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ and decreased 13 % at $71.8 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ respectively (Fig. 3A). Heart rates at 48 hpf in WAF-OS increased 5 % and 8 % relative to controls (tachycardia) at 1.81 and $14.5 \mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ respectively (Fig. 3B), and at 72 hpf these trends were inverted, as heart rates

decreased 6 % and 14 % at 14.5 and 29 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ respectively (Fig. 3B). Heart rates at 48 hpf in WAF-OR did not differ from controls (Fig. 3C), and at 72 hpf heart rates increased 12 % and 14 % at 1.65 and 3.3 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively (Fig. 3C).

1.3.6 Morphometric measurements

The eye area of zebrafish larvae at 168 hpf exposed to the different dilutions of WAF-OM decreased 6 %, 22 %, 36 % and 50 % relative to controls (microphthalmia) at 4.49, 17.9, 35.9 and 71.8 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively (Fig. 4A). Eye area in WAF-OS exposed larvae decreased 9 % and 28 % relative to controls at 14.5 and 29 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively (Fig. 4B). Eye area in WAF-OR exposed larvae decreased 22 %, 19 %, 13 %, 20 % and 32 % relative to controls at 3.30, 6.60, 13.2 and 26.4 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ at 17.9, 35.9 and 71.8 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively (Fig. 4C).

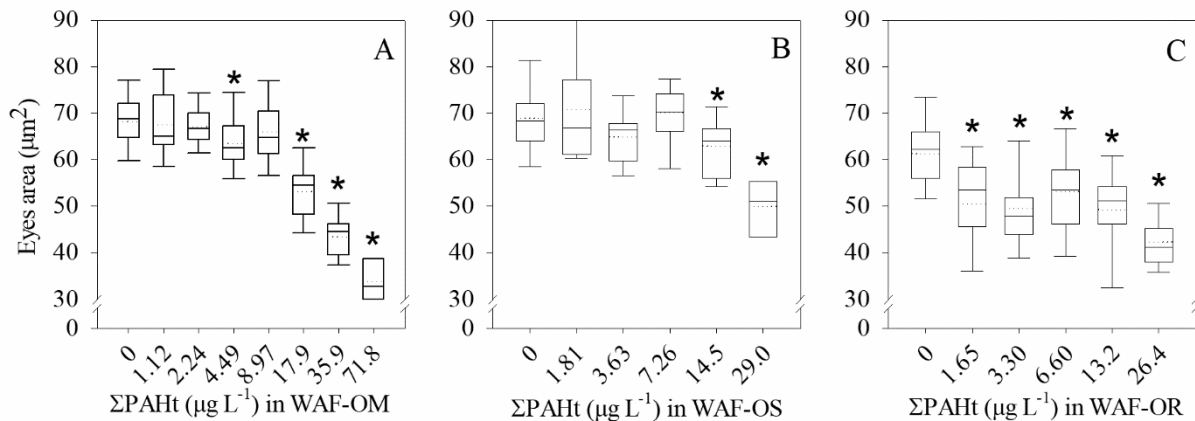


Fig 4. Eye area of *Danio rerio* larvae at 168 hpf exposed to different PAH concentrations of oil water accommodated fractions (WAF) from oil samples at different stages of weathering sampled at Paiva Beach (WAF-OM) and Ponta do Xaréu Beach (WAF-OS and WAF-OR) along the coast of Pernambuco. Box plot dashed horizontal lines indicate mean values, and box plot continuous horizontal lines (lower, middle, and upper) indicate quartiles of 25, 50 (median), and 75%, respectively.

A: (ANOVA $F = 49.65$ $p \leq 0.001$; Dunnett, $p < 0.05$); B: (Kruskal-Wallis $H = 23.92$ $p \leq 0.001$; Dunn, $p < 0.05$); C: (Kruskal-Wallis $H = 53.38$ $p \leq 0.001$; Dunn, $p < 0.05$).

(*) Statistically significant difference compared to Control and dotted line indicating mean.

Total length of zebrafish larvae at 168 hpf exposed to the different dilutions of WAF-OM decreased 9 %, 17 % and 27 % relative to controls at 17.9, 35.9 and 71.8 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively (Fig. 5A). Total length in WAF-OS exposed larvae did not differ from controls (Fig. 5B). Total length in WAF-OR exposed larvae decreased 10 %, 10 %, 7 %, 9 % and 16 % relative to controls at 1.65, 3.30, 6.60, 13.2 and 26.4 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively (Fig. 5C).

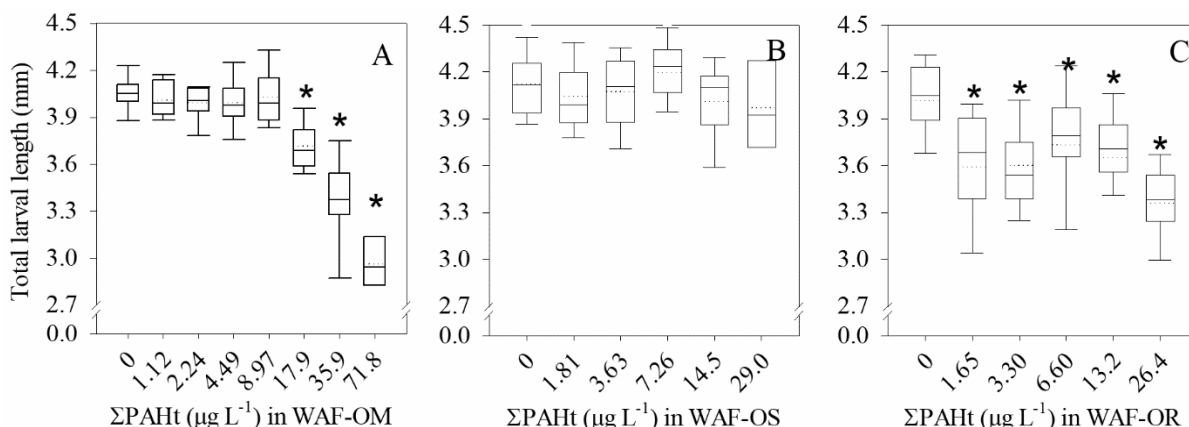


Fig 5. Total length of *Danio rerio* larvae at 168 hpf exposed to different PAH concentrations of oil water accommodated fractions (WAF) from oil samples at different stages of weathering sampled at Paiva Beach (WAF-OM) and Ponta do Xaréu Beach (WAF-OS and WAF-OR) along the coast of Pernambuco. Box plot dashed horizontal lines indicate mean values, and box plot continuous horizontal lines (lower, middle, and upper) indicate quartiles of 25, 50 (median), and 75%, respectively.

A: (ANOVA $F=61.98$, $p \leq 0.001$; Dunnett, $p < 0.05$); B: (ANOVA $F=1.93$, $p=0.094$); C: (Kruskal-Wallis $H=58.7$, $p \leq 0.001$; Dunn, $p < 0.05$).

(*) Statistically significant difference compared to Control and dotted line indicating mean.

1.4 DISCUSSION

Our results indicated significant changes in the relative concentration of parent and alkylated PAHs in the 3 analyzed WAFs from oil samples at different stages of weathering, and that these mixtures can induce concentration dependent toxicity to zebrafish embryo-larval stages based on developmental and morphological endpoints. Furthermore, changes in the proportion of different PAH molecules in each WAF were associated with different patterns of developmental abnormalities and associated concentration response patterns.

Alkylated PAH molecules largely predominated in WAF-OM, WAF-OS and WAF-OR, representing 87 %, 76 % and 80 % of Σ PAHt respectively, a main characteristic of petrogenic PAH mixtures (BOEHM, 1964), and which can contribute significantly to the toxicity of a sample (ANDERSSON *et al.*, 2015). High ratios LPAH/HPAH ranging from 5.6 in less weathered WAF-OM to 2.8 in more weathered WAF-OR were verified, and all of them significantly above 2.3 reinforce a petrogenic characteristic for all WAFs (GHETU *et al.*, 2021), even after 50 days of weathering under intense sunlight and action of waves as occurred in WAF-OS and WAF-OR.

Alkylated naphthalenes in the less weathered WAF-OM represented 40.8 % of total PAHs and decreased to 15.9 % and 6.2 % in WAF-OS and WAF-OR (Table 1 and supplementary Fig. S1), a pattern which is also diagnosed by the weathering ratio C1-C4 Naphthalenes/ Σ PAHt, equal to 0.41 for less weathered WAF-OM, and reduced to 0.16 and 0.06 in WAF-OS and WAF-OR, respectively. This pattern indicates clear and progressive weathering from

OM → OS → OR (PAGE *et al.*, 2002). Interestingly, the value of 0.41 in this study is equal to the one calculated for the recently spilled oil from the Exxon valdez accident, which also decreased to values close to zero as weathering progressed, although through a more extended period from 1990 to 1993 (PAGE *et al.*, 2002), whereas in this study only 51 days separate emulsified OM that landed on Paiva Beach from more weathered OS and OR in adjacent Pedra do Xaréu Beach. Results similar to this study were found in a weathering study after the Deepwater Horizon spill where concentrations of alkylated naphthalenes also decreased in samples at three stages of weathering, from less weathered Macondo Well oil and surface oil slicks, to more weathered oil-soaked sands and oil-covered rocks (AEPPLI *et al.*, 2012). Parent Naphthalene is the most volatile PAH, and it is expected that a large portion evaporates after an oil spill and subsequent spreading and mixing with water. However, alkylated naphthalenes are less volatile and do not evaporate after oil spills (SCARLETT *et al.*, 2011). Therefore, it is interesting to highlight that even after 50 days impregnated in sand and rocks under intense sunlight, a significant mass of these alkylated naphthalenes could still be released into the water. Additionally, alkylated naphthalenes are more hydrophobic and bioaccumulative in aquatic organisms and were important contributors to toxicity measured as significant luminescence inhibition in *Aliivibrio fischeri* after exposure to a crude oil WAF (KANG *et al.*, 2014).

Relative proportion of 3-ring phenanthrene, anthracene and their alkylated compounds increased from 25 % of total PAHs in less weathered WAF-OM to 44 % and 48 % in more weathered WAF-OS and WAFOR, respectively. Additionally, the proportion of 4 ring parent and alkylated PAHs increased from 9 % in WAF-OM to 15 % and 23 % in WAF-OS and WAF-OR (Table 1 and supplementary Fig. S1). This pattern of decreases of 2-ring lower molecular weight PAHs during weathering coupled with increases in proportion of tricyclic PAHs and their alkylated homologs has been associated with increased frequencies of malformations typically associated with oil-induced toxicity in larval teleosts, including pericardial and yolk sac edema, impacts on heart development, jaw reduction and curvature of the body axis (INCARDONA *et al.*, 2005; JUNG *et al.*, 2013). A similar tendency is observed in our study based on the smaller potencies of the less weathered WAF-OM to induce delay in zebrafish embryo-larval development ($EC_{20-GMS} = 1.0 \mu g \sum PAHp L^{-1}$) compared to more weathered WAF-OS ($EC_{20-GMS} = 0.8 \mu g \sum PAHp L^{-1}$) and WAF-OR ($EC_{20-GMS} = 0.4 \mu g \sum PAHp L^{-1}$). These results agree with the weathering studies with different crude oils that indicate increased potency of water PAH mixtures as overall composition changes over time

towards a larger fraction of 3-ring PAH phenanthrene and alkylated congeners (ESBAUGH *et al.*, 2016; INCARDONA *et al.*, 2024).

Other studies reported GMS based developmental delays in zebrafish exposed to Oman and Meray unweathered crude Oils with EC_{20-GMS} of 4.55 and 4.23 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAH}_p \text{ L}^{-1}$ respectively (LI *et al.*, 2019). These EC₂₀ concentrations are 4 to 10 times higher than EC_{20-GMS} values from this study, indicating that WAFs from the oil that reached the Brazilian coast are significantly more potent than these unwethered crude oil, again suggesting that weathering increases developmental toxicity.

Yolk provides hormones, nutrients and energy during early development of fishes (Hilton *et al.*, 2008; Kamler, 2007). This study suggests that exposure of zebrafish to different weathered oil WAFs induce concentration dependent failure of yolk sac absorption (Table 2), and highest potency was verified for WAF-OM and WAF-OR (EC_{50-yolk} of 8 and 12.5 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAH}_t \text{ L}^{-1}$, respectively). This failure in complete yolk sac absorption supposedly implies less overall energy reserves mobilized for growth, and a highest potency of WAF-OM and WAF-OR was also verified for decreased total length of larvae (Fig. 5A and C) and microphthalmia (Fig. 4A and C). This failure in yolk sac absorption leads to cholesterol deprivation and upregulation of cholesterol biosynthetic genes in *Melanogrammus aeglefinus* embryos and larvae exposed to crude oil, visibly unable to effectively mobilize yolk SØRTHUS *et al.* (2017).

The 3-ring PAHs fluorene, dibenzothiophene, phenanthrene and alkylated phenanthrenes are cardiotoxic (ABRAMOCHKIN *et al.*, 2023; AL-MOUBARAK *et al.*, 2021; INCARDONA *et al.*, 2004b; INCARDONA *et al.*, 2024). Zebrafish embryos exposed to a mixture of them show decreases in heart rates and rhythm, disrupting cardiac function. Prolonged exposure also indicated secondary defects in cardiac morphogenesis, culminating in heart failure and edema accumulation, and other subsequent morphological defects in jaw or microphthalmia (INCARDONA *et al.*, 2017a). This study verified the typical bradycardia in heart rate in larvae at 48 and 72 hpf exposed to WAF-OM and WAF-OS (Fig. 3). Parent Fluorene and Phenanthrene represent 6.69 and 5.22 $\mu\text{g } \text{L}^{-1}$ and 9 and 18 % of total PAH, respectively, and could be contributing to these observed effects. Reductions in heart rates were verified in zebrafish larvae at 120 hpf after exposure to WAFs from Oman Crude oil and Meray crude oil at LOECs of 3.81 and 3.25 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAH}_p \text{ L}^{-1}$ (LI *et al.*, 2019), values which are in the same range of the LOECs for reduced heart rates of 4.8 and 2.6 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAH}_p \text{ L}^{-1}$ verified in this study (Fig. 2). On the other hand, tachycardia in heart rates were also verified at smaller

WAF concentrations of WAF-OR (Fig. 3). Tachycardia in fish exposed to PAH is not a commonly observed response in *Danio rerio* ELS, but it has been verified in ELS of *Danio rerio* exposed to crude oil WAF at 48 hpf PHILIBERT *et al.* (2019), and in zebrafish ELS (72 hpf) exposed to phenanthrene concentrations starting at $0.09 \mu\text{g L}^{-1}$ (ZHANG *et al.*, 2013), where increased heart rate was interpreted as compensation for reduced stroke volume.

In this study high frequencies of heart deformities characterized by collapse of heart chambers and generation of a string-like appearance of the heart were verified in larvae exposed to WAF-OM and WAF-OR (Table 2), such as those described by (GARRITY *et al.*, 2002; INCARDONA *et al.*, 2004b). Pericardial and yolk sac edemas were also verified starting at 72 hpf, and high frequencies were verified at higher concentrations at 96 and 168 hpf at all WAFs tested (Table 2). This chronology of pericardial edema development is typical of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin (TCDD) toxicity to zebrafish larvae (ANTKIEWICZ *et al.*, 2005) and PAH with higher molecular weight, such as 5- ring PAHs, due to its similar mechanism mediated by the Ah receptor (INCARDONA *et al.*, 2017a), which are present in our WAF mixtures, although at small concentrations (Table 1). In another study, exposure of zebrafish to retene, a C-4 alkylated phenanthrene induced pericardial edemas at 72 hpf and heart deformities through aryl hydrocarbon receptor-2 (AhR2) activation (SCOTT *et al.*, 2011). Recently it has been demonstrated that 14 alkylated phenanthrenes cause developmental cardiotoxicity to zebrafish based on multiple mechanisms affecting specific endpoints of cardiac function or development (INCARDONA *et al.*, 2024). C1-C4-alkylated phenanthrenes + anthracenes were quantified at concentrations of $0.97 \mu\text{g PAH L}^{-1}$ (18 % of $\sum\text{PAHt L}^{-1}$), $0.72 \mu\text{g PAH L}^{-1}$ (27 % of $\sum\text{PAHt L}^{-1}$) and $1.03 \mu\text{g PAH L}^{-1}$ (33 % of $\sum\text{PAHt L}^{-1}$) in WAF-OM, OS and OR, respectively (Table 1), and this complex group of alkylated PAHs is probably contributing to the developmental abnormalities detected in this study.

Initial swim bladder inflation is a critical stage of development at around 96 hpf during early zebrafish development that allows the larvae to achieve neutral buoyancy and proper swimming skills (LINDSEY *et al.*, 2010). Failed or delayed inflation of the swim bladder has been observed during early development of larval fishes exposed to parent PAHs or oil mixtures (PRICE *et al.*, 2020). In this study, all WAFs induced significant failure in swim bladder inflation (Table 2). However, for this endpoint an opposite trend compared to GMS results was verified, with a higher potency for WAF-OM, decreasing in WAF-OS and WAF-OR, with $\text{EC}_{50\text{-swimbladder}}$ of 1.6, 22.4 and $16.9 \mu\text{g } \sum\text{PAHt L}^{-1}$, respectively. This opposite trend suggests that 2-ring alkylated naphthalenes, which are present in higher concentrations in

WAF-OM could be an important factor involved. However, it is important to note that exposure of zebrafish to different parental PAHs in isolation or in complex mixtures, including naphthalene, phenanthrene and alkylated PAHs have been associated with uninflation of swim bladder, and potential mechanisms involved are presumed to be either secondary effects of reduced cardiac function or direct effects on the swimbladder caused by different PAHs (PRICE *et al.*, 2020). Other mechanisms that can prevent swim bladder inflation relate to the fact that zebrafish larvae need to swim to the water surface and gulp air to initially inflate it. Oil film in the surface, improper motor swimming skills of the larvae, or jaw deformities, could also affect this initial inflation (PRICE *et al.*, 2020). In this study, oil films were not present at any of the exposure wells. However, increases in frequency of larvae with incomplete protrusible mouths were verified after exposure to all WAFs (Table 2), which could be involved in the increased frequencies of larvae with failed swim bladder inflation. Further studies are necessary to characterize the potencies and mechanisms through which different PAHs are involved in swim bladder inflation toxicity.

Oil exposure during early life stages affects the performance of adult zebrafish HICKEN *et al.* (2011). Likewise, exposure to embryonic crude oil in salmon and herring resulted in heart developmental defects during organogenesis, subsequently leading to diminished cardiorespiratory performance in juvenile fish later on (INCARDONA *et al.*, 2015). These studies suggest a physiological mechanism linking individual-based toxicity and population-level responses that have been verified in *Danio rerio* and other marine fishes such as mahi-mahi *Coryphaena hippurus* (MAGER *et al.*, 2014), red drum *Sciaenops ocellatus* (KHURSIGARA *et al.*, 2017) as well as other fishes reviewed in (MAGER *et al.*, 2024). Therefore, it is reasonable to suppose that the observations in zebrafish in this study are a good indicator that indigenous species could be impacted the same way.

This study found LOECs for endpoints focused on developmental delay, failure in yolk sac absorption, swim bladder inflation, and mouth development are within detected environmental PAH concentrations in field samples. Water concentrations of PAHs in coral reef areas with clear presence of oil varied from 0.75 to 7.1 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (ALVES *et al.*, 2024), suggesting these endpoints can be found in the field. This is accordance with a notable decline in larval populations, reduced taxonomic diversity, diminished larval size, and rise in some typical morphological abnormalities such as skeletal, head and yolk sac deformation among fish larvae and eggs sampled in coastal waters heavily affected by the oil spill off the Brazilian coast that is involved in this study (DE SOUZA *et al.*, 2022).

CONCLUSION

Parent and alkylated PAHs dissolved into the water from the weathered emulsified oil that contaminated the Brazilian coast can cause concentration dependent toxicity to zebrafish embryo-larval stages based on developmental and morphological endpoints. The emulsified oil after 50 days of subsequent weathering was a potent inducer of developmental delay and ecologically relevant abnormalities in zebrafish. More weathered WAF-OS and WAF-OR were more potent inducers of zebrafish developmental delay, suggesting that parent and alkylated phenanthrenes are involved. Lowest observed effect concentrations for different developmental toxicity endpoints are within environmentally relevant polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and indigenous species could be affected.

REFERENCES

- ABRAMOCHKIN, D. V.; FILATOVA, T. S.; KUZMIN, V. S.; VORONKOV, Y. I. *et al.* Tricyclic hydrocarbon fluorene attenuates ventricular ionic currents and pressure development in the navaga cod. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 273, p. 109736, 2023/11/01/ 2023.
- AEPPLI, C.; CARMICHAEL, C. A.; NELSON, R. K.; LEMKAU, K. L. *et al.* Oil Weathering after the Deepwater Horizon Disaster Led to the Formation of Oxygenated Residues. *Environmental Science & Technology*, 46, n. 16, p. 8799-8807, 2012/08/21 2012.
- AL-MOUBARAK, E.; SHIELS, H. A.; ZHANG, Y.; DU, C. *et al.* Inhibition of the hERG potassium channel by phenanthrene: a polycyclic aromatic hydrocarbon pollutant. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, n. 23, p. 7899-7914, 2021/12/01 2021.
- ALVES, M.; FREIRE MARIZ JR, C.; MELO, T.; ALVES, R. *et al.* **Oil Spill Impact on Brazilian Coral Reefs Based on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contamination, Biliary Bioconcentration and Enzymatic Biomarkers in Damselfish *Stegastes Fuscus*.** 2024.
- ALVES, R. N.; MARIZ, C. F.; DE MELO ALVES, M. K.; DA SILVA, A. S. X. *et al.* Zebrafish as a biological model for assessing water quality along tropical hydrographic river basins in Northeast Brazil. *Ecotoxicology*, 2023/09/19 2023.
- ALVES, R. N.; MARIZ JR, C. F.; MELO ALVES, M. K. d.; CAVALCANTI, M. G. N. *et al.* Contamination and Toxicity of Surface Waters Along Rural and Urban Regions of Capibaribe River in Tropical Northeastern Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, n/a, n. n/a, 2021/07/29 2021.
- ANDERSSON, J. T.; ACHTEN, C. Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. *Polycycl Aromat Compd*, 35, n. 2-4, p. 330-354, Mar 15 2015.
- ANTKIEWICZ, D. S.; BURNS, C. G.; CARNEY, S. A.; PETERSON, R. E. *et al.* Heart Malformation Is an Early Response to TCDD in Embryonic Zebrafish. *Toxicological Sciences*, 84, n. 2, p. 368-377, 2005.

ARRUDA-SANTOS, R. H. d.; SCHETTINI, C. A. F.; YOGUI, G. T.; MACIEL, D. C. *et al.* Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. *Science of The Total Environment*, 624, p. 935-944, 2018/05/15/ 2018.

BEEKHUIJZEN, M.; DE KONING, C.; FLORES-GUILLÉN, M. E.; DE VRIES-BUITENWEG, S. *et al.* From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology*, 56, p. 64-76, 2015.

BOEHM, P. D. 15 - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *In: Morrison, R. D. e Murphy, B. L. (Ed.). Environmental Forensics*. Burlington: Academic Press, 1964. p. 313-337.

BRUM, H. D.; CAMPOS-SILVA, J. V.; OLIVEIRA, E. G. Brazil oil spill response: Government inaction. *Science*, 367, n. 6474, p. 155, 2020.

CÂMARA, S. F.; PINTO, F. R.; SILVA, F. R. d.; SOARES, M. d. O. *et al.* Socioeconomic vulnerability of communities on the Brazilian coast to the largest oil spill (2019–2020) in tropical oceans. *Ocean & Coastal Management*, 202, p. 105506, 2021/03/01/ 2021.

CAMPELO, R. P. d. S.; LIMA, C. D. M. d.; DE SANTANA, C. S.; JONATHAN DA SILVA, A. *et al.* Oil spills: The invisible impact on the base of tropical marine food webs. *Marine Pollution Bulletin*, 167, p. 112281, 2021/06/01/ 2021.

CHERR, G. N.; FAIRBAIRN, E.; WHITEHEAD, A. Impacts of Petroleum-Derived Pollutants on Fish Development. 5, n. 1, p. 185-203, 2017.

CRAVEIRO, N.; DE ALMEIDA ALVES, R. V.; DA SILVA, J. M.; VASCONCELOS, E. *et al.* Immediate effects of the 2019 oil spill on the macrobenthic fauna associated with macroalgae on the tropical coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 165, p. 112107, 2021/04/01/ 2021.

CRISTIANO, W.; LACCHETTI, I.; MANCINI, L.; CORTI, M. *et al.* Promoting zebrafish embryo tool to identify the effects of chemicals in the context of Water Framework Directive monitoring and assessment. *Microchemical Journal*, 149, p. 104035, 2019/09/01/ 2019.

DE OLIVEIRA ESTEVO, M.; LOPES, P. F. M.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. C.; JUNQUEIRA, A. B. *et al.* Immediate social and economic impacts of a major oil spill on Brazilian coastal fishing communities. *Marine Pollution Bulletin*, 164, p. 111984, 2021/03/01/ 2021.

DE SOUZA, C. S.; DE OLIVEIRA MAFALDA, P.; DE KIKUCHI, R. K. P.; DOMINGUEZ, J. M. L. Assessment of the Brazilian Coast Oil Spill Impact in the fish eggs and larvae development from the Tropical Continental Shelf. *Regional Studies in Marine Science*, 56, p. 102635, 2022/11/01/ 2022.

DE SOUZA DIAS DA SILVA, M. F.; ZANARDI-LAMARDO, E.; VALCARCEL ROJAS, L. A.; DE OLIVEIRA ALVES, M. D. *et al.* Traces of oil in sea turtle feces. *Marine Pollution Bulletin*, 200, p. 116088, 2024/03/01/ 2024.

ESBAUGH, A. J.; MAGER, E. M.; STIEGLITZ, J. D.; HOENIG, R. *et al.* The effects of weathering and chemical dispersion on Deepwater Horizon crude oil toxicity to mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) early life stages. *Science of the Total Environment*, 543, p. 644-651, 2016.

ESCOBAR, H. Mystery oil spill threatens marine sanctuary in Brazil. *Science*, 366, n. 6466, p. 672, Nov 8 2019.

GARRITY, D. M.; CHILDS, S.; FISHMAN, M. C. The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. *Development*, 129, n. 19, p. 4635-4645, Oct 2002.

GHETU, C. C.; SCOTT, R. P.; WILSON, G.; LIU-MAY, R. *et al.* Improvements in identification and quantitation of alkylated PAHs and forensic ratio sourcing. *Anal Bioanal Chem*, 413, n. 6, p. 1651-1664, Mar 2021.

HICKEN, C. E.; LINBO, T. L.; BALDWIN, D. H.; WILLIS, M. L. *et al.* Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, n. 17, p. 7086-7090, 2011.

HODSON, P. V. The Toxicity to Fish Embryos of PAH in Crude and Refined Oils. *Arch Environ Contam Toxicol*, 73, n. 1, p. 12-18, Jul 2017.

INCARDONA, J. P.; CARLS, M. G.; HOLLAND, L.; LINBO, T. L. *et al.* Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring. *Scientific Reports*, 5, n. 1, p. 13499, 2015/09/08 2015.

INCARDONA, J. P.; CARLS, M. G.; TERAOKA, H.; SLOAN, C. A. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ Health Perspect*, 113, n. 12, p. 1755-1762, 2005 Dec 2005.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity in early life history stages of fish. *Marine Environmental Research*, 58, n. 2-5, p. 363, 2004b.

INCARDONA, J. P.; LINBO, T. L.; CAMERON, J. R.; SCHOLZ, N. L. Structure-activity relationships for alkyl-phenanthrenes support two independent but interacting synergistic models for PAC mixture potency. *Sci Total Environ*, 918, p. 170544, Mar 25 2024.

INCARDONA, J. P.; SCHOLZ, N. L. 6 - Environmental Pollution and the Fish Heart. *In: Gamperl, A. K.; Gillis, T. E., et al (Ed.). Fish Physiology: Academic Press, 2017a. v. 36, p. 373-433.*

JULIE ADAMS, K. C., Danielle Tuori, R. Stephen Brown, and Peter V. Hodson. **Review of Methods for Measuring the Toxicity to Aquatic Organisms of the Water Accommodated Fraction (WAF) and Chemically-Enhanced Water Accommodated Fraction (CEWAF) of petroleum.** School of Environmental Studies/ Queen's University. Fisheries and Oceans Canada. 2017.

JUNG, J. H.; HICKEN, C. E.; BOYD, D.; ANULACION, B. F. *et al.* Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish. *Chemosphere*, 91, n. 8, p. 1146-1155, 2013.

KANG, H. J.; LEE, S. Y.; ROH, J. Y.; YIM, U. H. *et al.* Prediction of ecotoxicity of heavy crude oil: contribution of measured components. *Environ Sci Technol*, 48, n. 5, p. 2962-2970, 2014.

KHURSIGARA, A. J.; PERRICHON, P.; MARTINEZ BAUTISTA, N.; BURGGREN, W. W. *et al.* Cardiac function and survival are affected by crude oil in larval red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Science of the Total Environment*, 579, p. 797-804, 2017.

LAUENSTEIN, G. G. **Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program mussel watch project, 1993-1996, update [microform] / G.G. Lauenstein and A.Y. Cantillo (editors)**. Silver Spring, Md: National Oceanic and Atmospheric Administration, Coastal Monitoring and Bioeffects Assessment Division, Office of Ocean Resources Conservation and Assessment, National Ocean Service, 1998. (NOAA technical memorandum NOS ORCA ; 130., v. Accessed from <https://nla.gov.au/nla.cat-vn4135963>).

LI, X.; XIONG, D.; DING, G.; FAN, Y. *et al.* Exposure to water-accommodated fractions of two different crude oils alters morphology, cardiac function and swim bladder development in early-life stages of zebrafish. *Chemosphere*, 235, p. 423-433, 2019/11/01/ 2019.

LINDSEY, B. W.; SMITH, F. M.; CROLL, R. P. From Inflation to Flotation: Contribution of the Swimbladder to Whole-Body Density and Swimming Depth During Development of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 7, n. 1, p. 85-96, 2010.

LIRA, A. L. d. O.; CRAVEIRO, N.; DA SILVA, F. F.; ROSA FILHO, J. S. Effects of contact with crude oil and its ingestion by the symbiotic polychaete *Branchiosyllis* living in sponges (*Cinachyrella* sp.) following the 2019 oil spill on the tropical coast of Brazil. *Science of The Total Environment*, 801, p. 149655, 2021/12/20/ 2021.

LOURENÇO, R. A.; COMBI, T.; ALEXANDRE, M. d. R.; SASAKI, S. T. *et al.* Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. *Marine Pollution Bulletin*, 156, p. 111219, 2020/07/01/ 2020.

MAGER, E. M.; ESBAUGH, A. J.; STIEGLITZ, J. D.; HOENIG, R. *et al.* Acute embryonic or juvenile exposure to deepwater horizon crude oil impairs the swimming performance of mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Environmental Science and Technology*, 48, n. 12, p. 7053-7061, 2014.

MAGER, E. M.; PASPARAKIS, C. Crude oil-induced cardiotoxicity in fishes. *In: Alderman, S. L. e Gillis, T. E. (Ed.). Encyclopedia of Fish Physiology (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, 2024. p. 721-754.

MAGRIS, R. A.; GIARRIZZO, T. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 153, p. 110961, 2020/04/01/ 2020.

MÜLLER, M. N.; YOGUI, G. T.; GÁLVEZ, A. O.; GUSTAVO DE SALES JANNUZZI, L. *et al.* Cellular accumulation of crude oil compounds reduces the competitive fitness of the

coral symbiont *Symbiodinium glynnii*. *Environmental Pollution*, 289, p. 117938, 2021/11/15/ 2021.

OECD. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Paris: OECD Publishing, 2013.

PAGE, D. S.; BOEHM, P. D.; STUBBLEFIELD, W. A.; PARKER, K. R. *et al.* Hydrocarbon composition and toxicity of sediments following the Exxon valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, n. 7, p. 1438-1450, 2002.

PASPARAKIS, C.; ESBAUGH, A. J.; BURGGREN, W.; GROSELL, M. Physiological impacts of Deepwater Horizon oil on fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 224, p. 108558, 2019/10/01/ 2019.

PERRICHON, P.; LE MENACH, K.; AKCHA, F.; CACHOT, J. *et al.* Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach. *Sci Total Environ*, 568, p. 952-966, Oct 15 2016.

PHILIBERT, D. A.; LYONS, D.; PHILIBERT, C.; TIERNEY, K. B. Field-collected crude oil, weathered oil and dispersants differentially affect the early life stages of freshwater and saltwater fishes. *Science of The Total Environment*, 647, p. 1148-1157, 2019/01/10/ 2019.

PRICE, E. R.; MAGER, E. M. The effects of exposure to crude oil or PAHs on fish swim bladder development and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 238, p. 108853, 2020/12/01/ 2020.

REDDY, C. M.; NELSON, R. K.; HANKE, U. M.; CUI, X. *et al.* Synergy of Analytical Approaches Enables a Robust Assessment of the Brazil Mystery Oil Spill. *Energy & Fuels*, 36, n. 22, p. 13688-13704, 2022/11/17 2022.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10, n. 12, p. e0146021, 2016.

SANTANA, J. L.; RIOS, A. S.; CALADO, T. C. S.; ZANARDI-LAMARDO, E. *et al.* Reef crab population changes after oil spill disaster reach Brazilian tropical environments. *Marine Pollution Bulletin*, 183, p. 114047, 2022/10/01/ 2022.

SCARLETT, A. G.; CLOUGH, R.; WEST, C.; LEWIS, C. A. *et al.* Alkyl-naphthalenes: Priority Pollutants or Minor Contributors to the Poor Health of Marine Mussels? *Environmental Science & Technology*, 45, n. 14, p. 6160-6166, 2011/07/15 2011.

SCOTT, J. A.; INCARDONA, J. P.; PELKKI, K.; SHEPARDSON, S. *et al.* AhR2-mediated, CYP1A-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to retene. *Aquat Toxicol*, 101, n. 1, p. 165-174, Jan 17 2011.

SILVA, J. S.; ALVES, R. N.; DE PAULO, D. V.; MARIZ JR, C. F. *et al.* Biliary polycyclic aromatic hydrocarbons and enzymatic biomarkers in *Eugerres brasiliensis* along four tropical estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 163, p. 111919, 2021/02/01/ 2021.

SINGER, M. M.; AURAND, D.; BRAGIN, G. E.; CLARK, J. R. *et al.* Standardization of the Preparation and Quantitation of Water-accommodated Fractions of Petroleum for Toxicity Testing. *Marine Pollution Bulletin*, 40, n. 11, p. 1007-1016, 2000/11/01/ 2000.

SOARES, M. O.; TEIXEIRA, C. E. P.; BEZERRA, L. E. A.; RABELO, E. F. *et al.* The most extensive oil spill registered in tropical oceans (Brazil): the balance sheet of a disaster. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, n. 13, p. 19869-19877, 2022/03/01 2022.

SØRHUS, E.; INCARDONA, J. P.; FURMANEK, T.; GOETZ, G. W. *et al.* Novel adverse outcome pathways revealed by chemical genetics in a developing marine fish. *eLife*, 6, p. e20707, 2017/01/24 2017.

ZACHARIAS, D. C.; GAMA, C. M.; FORNARO, A. Mysterious oil spill on Brazilian coast: Analysis and estimates. *Marine Pollution Bulletin*, 165, p. 112125, 2021/04/01/ 2021.

ZANARDI-LAMARDO, E.; MITRA, S.; VIEIRA-CAMPOS, A. A.; CABRAL, C. B. *et al.* Distribution and sources of organic contaminants in surface sediments of Hooghly river estuary and Sundarban mangrove, eastern coast of India. *Mar Pollut Bull*, 146, p. 39-49, Sep 2019.

ZHANG, Y.; HUANG, L.; ZUO, Z.; CHEN, Y. *et al.* Phenanthrene exposure causes cardiac arrhythmia in embryonic zebrafish via perturbing calcium handling. *Aquatic Toxicology*, 142–143, n. 0, p. 26-32, 10/15/ 2013.

ANEXO-1

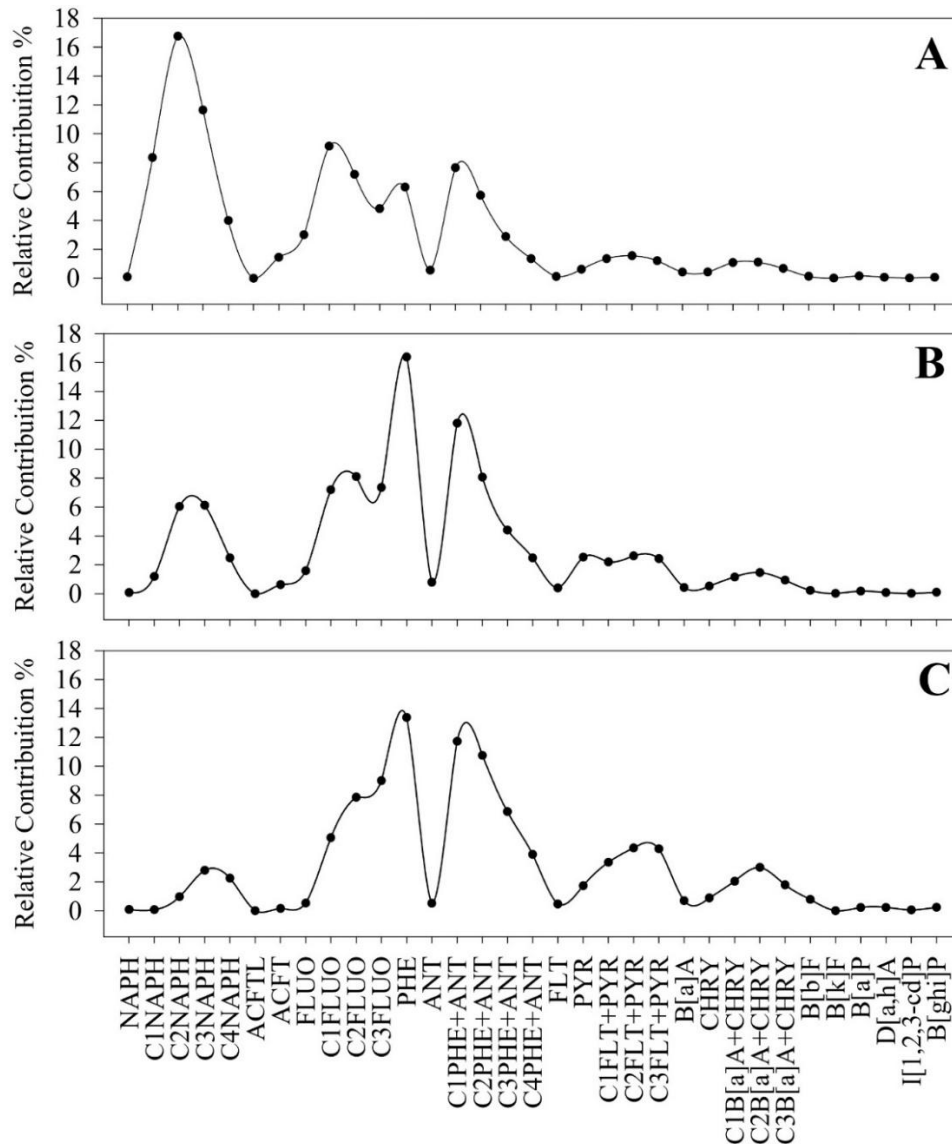


Fig. S1: Relative contribution (% of total polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations) of parent and alkylated PAH molecules in water accommodated fractions (WAF) of oil at different stages of weathering. A: WAF-OM (oil mousse), B: WAF-OS (oil in sand) and C: WAF-OR (oil in rock).

NAPH = naphthalene; ACFTL = Acenaphthylene; ACFT = Acenaphthene; FLUO = Fluorene; PHE = phenanthrene; ANT = anthracene; FLT = fluoranthene; PYR = pyrene; B[a]A = Benz[a]anthracene; CHRY = Chrysene; B[b]F = Benzo[b]fluoranthene; B[k]F = Benzo[k]fluoranthene; B[a]P = Benzo[a]pyrene; D[a,h]A = Dibenzo[a,h]anthracene; I[1,2,3-cd]P = Indeno[1,2,3-cd]pyrene; B[ghi]P = Benzo[ghi]perylene. C1 to C4 indicates the number of alkyl groups attached to the respective PAH.

ANEXO-2

Table S1- Relative fluorescence units (RFU) of the different solutions of water accommodated fractions used during exposure experiments measured daily before exposure water exchanges.

	Σ PAHt $\mu\text{g L}^{-1}$	NAPH		PHE		PYR		CHRY		B[a]P	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
WAF-OR	1.12	2.69	0.24	5.24	0.26	2.36	0.36	1.59	0.05	1.15	0.11
	2.24	3.52	0.15	7.29	0.22	2.44	0.23	1.94	0.09	1.19	0.08
	4.49	5.23	0.14	11.65	0.46	3.13	0.40	2.76	0.21	1.25	0.21
	8.97	8.52	0.30	18.36	0.36	4.19	0.37	4.15	0.15	1.38	0.19
	17.9	14.43	0.21	28.89	0.52	5.44	0.55	6.37	0.18	1.58	0.18
	35.9	25.23	0.62	45.44	0.38	8.23	0.57	10.39	0.28	1.91	0.17
	71.8	41.80	0.96	69.82	0.12	13.10	0.79	16.38	0.34	2.35	0.30
WAF-OS	1.81	2.22	1.39	4.57	0.72	1.74	0.46	1.70	1.25	0.21	0.02
	3.63	3.63	0.97	10.00	2.12	3.38	1.06	2.52	0.51	0.47	0.18
	7.26	5.92	1.54	17.76	4.24	5.02	1.41	4.35	1.01	0.88	0.33
	14.5	10.84	2.71	32.66	7.82	9.49	2.67	7.96	1.88	1.62	0.49
	29.0	19.53	5.20	58.37	15.59	15.65	4.73	14.60	3.62	2.99	0.93
WAF-OR	1.65	1.12	0.43	4.60	0.57	1.68	0.31	1.21	0.15	0.27	0.13
	3.3	2.60	0.29	9.99	0.37	3.89	1.17	2.50	0.21	0.46	0.18
	6.6	4.67	0.49	18.18	0.75	5.36	0.92	4.37	0.09	0.81	0.11
	13.2	8.10	0.52	32.53	0.78	9.04	1.16	7.43	0.32	1.52	0.24
	26.4	14.03	0.50	57.60	1.43	14.27	1.07	12.92	0.51	2.60	0.14

Σ PAHt: Total PAH concentrations including parent + alkylated molecules (GC-MS concentrations)

NAP-RFU: relative fluorescence units for naphthalene

PHE-RFU: relative fluorescence units for phenanthrene

CHR-RFU: relative fluorescence units for chrysene

PYR-RFU: relative fluorescence units for pyrene

BaP-RFU: relative fluorescence units for Benzo(a)pyrene

SD: standard deviation

ANEXO-3

Table. S2: Mortality rate measured every 24 hours of experiment in *Danio rerio* early life stages after exposure to different PAH concentrations of oil water accommodated fractions (WAF) from oil samples at different stages of weathering sampled at Paiva Beach (WAF-OM) and Ponta do Xaréu Beach (WAF-OS and WAF-OR) along the coast of Pernambuco.

	Σ PAHt $\mu\text{g L}^{-1}$	%Mortality							
		N	24	48	72	96	120	144	168 hpf
WAF-OM	0	48	0	0	0	0	0	0	0
	1.12	20	0	0	0	0	0	0	0
	2.24	20	0	0	0	0	0	0	0
	4.49	20	5	5	5	5	5	5	5
	8.97	20	0	0	0	0	0	0	0
	17.9	20	0	0	0	0	0	0	0
	35.9	20	5	5	5	5	50	50	50
	71.8	20	5	5	5	10	65	65	65
WAF-OS	0	48	0	0	0	0	0	0	0
	1.81	20	0	0	0	0	0	0	0
	3.63	20	0	0	0	0	0	0	0
	7.26	20	0	0	0	0	0	0	0
	14.5	20	0	0	0	0	0	0	0
	29	20	0	0	0	0	10	10	10
WAF-OR	0	48	6.25	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3
	1.65	20	0	0	0	0	0	0	0
	3.3	20	0	0	0	0	0	0	0
	6.6	20	0	0	0	0	0	0	0
	13.2	20	0	0	5	5	5	5	5
	26.4	20	0	0	0	0	0	0	0

hpf: hours post-fertilization. (N) number of organisms exposed initially.

IV MANUSCRITO 2 (Ecotoxicological effects of crude oil to early life stages of *Danio rerio*: a molecular, morphological and behavioral approach focused on swim bladder development)

ABSTRACT

Proper development and inflation of the swim bladder is essential for swimming and foraging behavior in fish. To characterize the effects of the Brazilian oil spill that occurred between 2019 and 2020 to early life stages of fish, the expression of genes involved in swim bladder development were evaluated through biochemical assays, morphologic analysis, and behavior. The swim bladder was focused on due to recent findings of being a target of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present in oil. Zebrafish (*Danio rerio*) were exposed to oil water accommodated fractions (WAF) at concentrations measured following the spill, 1.12 to 71.8 total PAHs ($\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$). Larvae exposed to 4.49 and 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ had a downregulation in swim bladder development genes, *hb9*, *sox2*, *has2*, and *elov11a*, at 48 hours post fertilization (hpf). Downregulation in these genes was associated with a high frequency of uninflated swim bladders at 96 and 168 hpf, with uninflated swim bladders detected in 100% of 96 to 168 hpf larvae exposed to 35.9 and 71.8 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$. SOD and CAT levels were inhibited in larvae exposed to 1.12 and 2.24 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively. There was an increase in GST and GSH levels in exposed larvae. Average swimming speed and distance were reduced in larvae exposed to 1.12 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$. This suggests that complex mixtures of PAHs from crude oil can inhibit the transcription of genes involved in swim bladder tissue development and proper swim-up behavior, which may have implications for the viability and success of developing larvae, impacting recruitment.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons, water accommodated fraction, swim bladder, zebrafish, swimming behavior, qPCR

1.1 INTRODUCTION

The oil spill off the northeastern coast of Brazil between 2019 and 2020 was the largest oil spill event in Brazilian history (CHOUERI *et al.*, 2024; DE OLIVEIRA ESTEVO *et al.*, 2021; MAGALHÃES *et al.*, 2022; SOARES *et al.*, 2022). Although the direct cause or source of the spill remains uncertain, it is presumed to be the result of either a leak or intentional dumping by a tanker of 5,000 - 12,500 m³ of oil 400 km off of the coast. A total of 3,000 km of Brazilian coastline was affected (ZACHARIAS; GAMA; HARARI; *et al.*, 2021). Oil residues reaching the coast in September/October 2019 were viscous and similar to classic, semi-solid, brownish water-in-oil emulsions (MELO ALVES *et al.*, 2024). During cleanup operations, a total of 5,379 tons of emulsified oil was removed from the environment (SOARES *et al.*, 2022; ZACHARIAS; GAMA; HARARI; *et al.*, 2021).

Coastal ecosystems were impacted by direct oil exposure following the spill, as evidenced by an increase in spine deformities and yolk sack edema in ichthyoplankton embryos and larvae from affected areas (DE SOUZA *et al.*, 2022). Additionally, reductions in population abundance and species richness of benthic fauna in oil-impacted reef habitats were seen (CRAVEIRO *et al.*, 2021; LIRA *et al.*, 2021; SANTANA *et al.*, 2022), with an increase in ethoxy-resorufin-O-deethylase and catalase activity in reef fish in tandem with accumulated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bile (MELO ALVES *et al.*, 2024). Parent and alkylated PAHs are among the most toxic constituents in crude oil (DUBIEL *et al.*, 2023). Malformations in larval fish mouth, fin, notochord, cardiac, and eye development following oil and PAH exposure can lead to consequences for swimming, orientation and swim bladder formation (ALVES *et al.*, 2017; BRETTE *et al.*, 2017; MAGNUSON *et al.*, 2020; PASPARAKIS *et al.*, 2019; PRICE *et al.*, 2020). Specifically, a reduced capacity of larvae to swallow air for initial bladder inflation has been identified as a sensitive endpoint and potential target of crude oil and its derivatives (BRETTE *et al.*, 2017; PASPARAKIS *et al.*, 2019; PRICE *et al.*, 2020). The swim bladder is a primordial organ that allows fish to achieve neutral buoyancy, and it plays an important role in swimming behavior and foraging success (LINDSEY *et al.*, 2010). Swim bladder development and functional establishment is a three-stage process composed of: 1) normal development of swim bladder structure composed of three tissues (inner epithelium, middle mesenchyme, and outer mesothelium), 2) larva swimming up to the surface to swallow air required for inflation, and 3) regulation of the volume of air inside the swim bladder through the autonomic nervous system.

In zebrafish (*Danio rerio*) that are between 36 and 72 hours post fertilization (hpf), a subset of genes involved in pathways important for swim bladder development and function are upregulated in the epithelium (*foxa2*, *anxa5*, *hb9*, and *sox2*), mesenchyme (*has2* and *acta2*), and mesothelium (*hpert11*, *fgf10a*, *elovl1a*, and *anxa5*) (SHASHA, 2023; WINATA *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2011). The Hedgehog (Hh) and Wnt signaling pathways play a large role in regulating swim bladder chamber development (INGHAM *et al.*, 2001; YIN *et al.*, 2011). In addition, these signaling pathways and swim bladder layer genes are crucial for the emergence, growth, and organization of cells that make up the swim bladder itself (SHASHA, 2023; WINATA *et al.*, 2009). By 72 hpf, the tissues in the posterior chamber of the swim bladder are formed and larvae can start swimming to the surface to gulp air, a behavior dependent on the *sox2* gene, whose knockout leads to deficits in tail flick and swim-up behaviors in zebrafish larvae (SHASHA, 2023).

LI *et al.* (2019) demonstrated that zebrafish exposed to 60% oil water accommodated fractions (WAFs; 2.52 mg L⁻¹ of total petroleum hydrocarbon content) from Oman crude oil exhibited significant downregulations in *hb9* and *anxa5* expression by 120 hpf, suggesting that PAHs can disrupt the specification and development of the epithelium and outer mesothelium of the swim bladder in early life stages of zebrafish. These findings align with observations from the 2019 oil spill off the Brazilian coast, where larval zebrafish exposed to collected weathered oil displayed developmental delays following exposure to 2.24 µg ΣPAH L⁻¹, increased heart and skeletal deformities at 17.9 µg ΣPAH L⁻¹, and uninflated swim bladders at 1.12 µg ΣPAH L⁻¹ (MARIZ JR *et al.*, 2024). Despite these observations, the specific mechanisms by which oil disrupts swim bladder development and function in early life stage fish remains largely unknown.

This study aimed to characterize the effects of PAHs from crude oil to swim bladder development and function in early life stage zebrafish, using molecular, biochemical, morphometric, and swimming behavioral endpoints. We tested the hypothesis that the expression of swim bladder development and swimming behavior-associated genes are disrupted during key developmental stages of zebrafish. Improving the mechanistic understanding of how crude oil impairs the swim bladder during early life stage development in fish will better inform the impact of the Brazilian oil spill, as well as serve as a potential sensitive endpoint to include in ecological risk assessments.

1.2 MATERIALS AND METHODS

1.2.1 Oil water accommodated fraction (WAF) preparation and chemical analysis

Oil that remained on the northeastern coast of Brazil was characterized as oil mousse (OM), with samples submerged among tidal pools in coral reefs of Paiva Beach (8°16'56.7"S, 34°56'48.6"W) and collected on October 3rd, 2019. Samples were wrapped in aluminum foil and transported in coolers to the laboratory, with further details about WAF preparations provided in MARIZ JR et al. (2024). Briefly, 50 g of OM was mixed in 5 L of freshwater, same as that prepared for the zebrafish culture, under moderate agitation by a mechanical stirrer inside a sealed Mariotte flask in the dark for 24 h. This was followed by a filtration of the water phase of the mixture with a 2 µm cellulose filter to eliminate oil droplets, as oil droplets have been previously suggested to induce additional toxic effects (REDMAN *et al.*, 2012). Cellulose filters were used as they were reported to have a low sorption to PAHs (JONKER, 2008). The rate of filtration occurred quite rapidly, ~ 1 L/min. Filtered WAF was stored at 4 °C in amber flask vials. Exposure assays started on the same day as the WAF preparation, where 1 L was extracted for PAH chemical characterization and the remaining 4 L used for dilution and embryo exposures.

A detailed description of the chromatographic procedures used in the analysis of 33 parent and alkylated PAHs quantified in the WAF used for exposures is provided in MARIZ JR et al., (2024). Briefly, this consisted of a hexane-based liquid-liquid extraction of a 1 L WAF 100% solution. The addition of deuterated PAH internal standards was followed by quantitative measurements using a gas chromatograph (GC-Agilent Technologies, model 7820) coupled to mass spectrometry (MS-Agilent Technologies, model 5975C). Exposure concentrations were expressed as total concentrations of 33 parent and alkylated PAHs (µg-ΣPAHt L⁻¹), total concentrations of 16 priority parent PAHs (µg-Σ16PAH L⁻¹) as defined by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA), total concentrations of 17 alkylated PAHs (µg-ΣPAHalk L⁻¹), and concentrations of individual PAHs. The 16 parent PAHs assessed were naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenzo[a,h]anthracene, indeno[1,2,3-cd]pyrene, and benzo[ghi]perylene. The 17 alkylated PAHs assessed were C1 to C4 naphthalenes, C1 to C3 fluorenes, C1 to C4 phenanthrenes + anthracenes, C1 to C3 fluoranthenes + pyrenes, and C1 to C3 benzo[a]anthracenes + chrysenes.

1.2.2 Experimental design

Wild type adult short-tailed zebrafish were maintained at the Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LABECOTOX) from Federal University of Pernambuco (UFPE). Fish were fed daily with freshly hatched *Artemia* nauplii and 40% protein dry fish food (Guabi®), with freshwater used for cultivation. WAF water parameters were monitored with a YSI Professional Plus multiparametric meter (pH 7.6 ± 0.2 , dissolved oxygen 6.0 ± 0.2 mg L⁻¹, and temperature 28 ± 0.5 °C, mean $\pm$ standard deviation). The total ammonia concentration was below 0.02 mg L⁻¹. The day before the experiment, adults were separated in three 15 L aquariums with UV-treated water at 28 °C at a ratio of 3:1 (male:female). The following morning, eggs < 3 hpf were collected and assessed for fertilization and proper development under a Stemi 2000 C stereomicroscope at 40x (Zeiss, Germany), following OECD 236 guidance (OECD, 2013).

For morphometric and behavior endpoints, viable eggs (<3 hpf) were exposed to WAF dilutions of 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, and 1.53% in 24-well polystyrene cell culture plates (Greiner, Cat. No.-662102), with one plate for each WAF dilution (n = 24 embryos per dilution, one in each well). PAH concentrations were measured by fixed fluorescence from the beginning to the end of exposures, with minimal variation in concentrations observed, as previously described (MARIZ JR et al., 2024). Molecular and biochemical evaluations were assessed with pooled larvae exposed in 6-well cell culture plates, with one plate for each dilution. Individual wells of the 24- or 6-well culture plates were filled with 2.5 or 10 mL of exposure solution in a semi-static renewal system, with 2 mL and 8 mL being replaced every 24 hours, respectively. Larvae were randomly selected from plates during sampling to produce pools. All plates were maintained at a constant temperature (27.8 °C $\pm$ 0.03) and light (14h light:10h dark) in a controlled incubator during exposures. The control treatment consisted of two separate 24- and 6-well exposure plates. Embryo exposures started at 3 hpf and continued for up to 168 hpf (7 days). Subsamples were collected for transcript expression assessment in 48, 72, 96, and 168 hpf larvae (Fig. 1). At 96 hpf, larval samples were also collected for biochemical analysis. Individual larvae were examined at 96 and 168 hpf for the presence of a swim bladder. Behavioral parameters, such as swimming speed, distance traveled, and duration, were assessed in 168 hpf larvae (Fig. 1).

	EXPOSURE TO OIL WATER ACCOMMODATED FRACTIONS				
					
Fertilization	< 3 hpf Exposure start	48 hpf Transcript expression	72 hpf Transcript expression	96 hpf - Swim bladder observation - Biochemistry assessment - Transcript expression	168 hpf - Swim bladder observation - Swim bladder measurements - Swimming activity - Transcript expression

Fig. 1. Experimental design and endpoints measured at different developmental stages in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to oil water accommodated fractions (WAF). Hours post fertilization (hpf).

1.2.3 mRNA gene expression analysis

Zebrafish were exposed to control water, low (6.25% WAF dilution, 4.49 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$), and intermediate (25% WAF dilution, 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$) PAH concentrations until larvae were 48, 72, 96, and 168 hpf and then assessed for targeted mRNA gene expression. Each treatment consisted of five replicate pools ($n = 5$), with each pool comprised of 20 larvae. This study used two exposure concentrations and control for the mRNA evaluation due to the limited number of organisms in the entire experiment and financial limitations. Larvae were homogenized using a mechanical homogenizer with a pestle. Total RNA was extracted with QIAzol Lysis (Qiagen, Germany), according to manufacturer's instructions. The quality and concentration of total RNA was determined using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), with 260/280 and 260/230 ratios between 1.9 and 2.1. The synthesis of the first cDNA strand of each RNA sample was achieved using the Roche Universal Transcriptor cDNA Master kit with a total reaction volume of 20 μL in a C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, USA).

The expression of four genes related to swim bladder tissue development and swim-up behavior were targeted: epithelial (*hb9* and *sox2*), mesenchyme (*has2*), mesothelium (*elovl1a*), and swim-up behavior (*sox2*). β -actin was used as a reference gene, as it did not exhibit altered expression between treatments. Furthermore, β -actin has been a reliable reference gene for normalizing expression data, with previous work using it when evaluating swim bladder development in zebrafish throughout different stages of development (XU *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2022). The RT-PCR evaluation was performed using a ReadyMix JumpStart Taq SYBR Green kit. The accession numbers, sequences, amplicon sizes, and primer efficiency (%) of the primers are listed in Table S1. The RT-PCR thermal conditions

were as follows: 2 min at 94 °C followed by 39 cycles of 3 amplification steps (denaturation for 15 s at 94 °C, annealing for 15 s at 50 °C, and extension for 30 s at 60 °C). A melt curve from 60 to 90 °C, with increments of 0.5 °C, was carried out. Expression fold changes between treatment and control groups were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (LIVAK *et al.*, 2001).

1.2.4 Biochemical assessment

A total of 4 pooled, 96 hpf larvae from each treatment was homogenized with 100 μ L of potassium phosphate buffer (KPi 0.1 M, pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 9000 x g for 20 min at 4 °C and used in glutathione-S-transferase (GST) assays. For total glutathione (GSH), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) assays, a pool of 40 larvae that were 96 hpf (n=4) was homogenized in 200 μ L of buffer (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4) and centrifuged at 12000 x g for 15 min at 4 °C. For reactive oxygen species (ROS), pools of 20 larvae that were 96 hpf were homogenized with 100 μ L of sodium phosphate buffer saline (PBS 0.7 M, pH 7.4) and centrifuged at 12000 x g for 30 min at 4 °C. Total protein concentration was determined with the Bradford assay and a bovine serum albumin analytical curve of $R^2 > 0.99$ (BRADFORD, 1976).

1.2.4.1 Glutathione-S-transferase (GST)

GST activity was determined following HABIG *et al.* (1974). A total of 5 μ L of homogenate and 200 μ L of a GST mix (Ultra-pure water, KPi buffer 0.25 M, and GSH 100 mM) was added to wells of 96-well plates. Following a baseline reading, the substrate, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) in ethanol, was added and absorbance measured at a 340 nm wavelength at a temperature of 25 °C. GST activity was quantified using the molar absorptivity coefficient ($\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), with the activity expressed in $\mu\text{mol CDNB min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$.

1.2.4.2 Total glutathione (GSH)

GSH concentrations were determined following BEUTLER *et al.* (1963). An aliquot of the sample was homogenized with trichloroacetic acid (TCA, 6%) at a ratio of 1:1 (v:v), and then centrifuged at 900 x g for 5 min at 4 °C. After centrifugation, the homogenate was mixed with 2.2 mM 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) in KPi solution (0.1 M, pH 7.4) in the wells of a 96-well plate. GSH levels were determined from the conjugation of glutathione (GSH) with 2.2 mM DTNB at a wavelength of 412 nm and temperature of 25 °C. Concentrations were expressed as $\mu\text{g GSH mg protein}^{-1}$.

1.2.4.3 Superoxide dismutase

Superoxide dismutase (SOD) activity was quantified following MARKLUND *et al.* (1974) and adapted by MAHARAJAN *et al.* (2018). In a 96-well microplate, 140 μL of buffer (tris-HCl 0.05 M, EDTA 1 mM, pH 8.5), 52.5 μL of sample, and 52.5 μL of water were added and absorbance read at a wavelength of 420 nm and temperature of 25 °C. After the baseline reading, 35 μL of 6 mM pyrogallol in 0.05 M HCl solution was added to the reaction well. SOD activity was expressed as U SOD min^{-1} mg protein $^{-1}$.

1.2.4.4 Catalase

Catalase (CAT) activity was determined following BEERS *et al.* (1952), adapted by LI, Y. *et al.* (2007). The test was performed by adding 5 μL of sample and 250 μL of reaction mix (KPi 0.05 M, pH 7.4, and 0.15 mM H_2O_2) to a 96-well microplate. Absorbance was measured at a wavelength of 240 nm and temperature of 25 °C. CAT activity was calculated based on the molar absorptivity coefficient ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the values expressed in μmol of H_2O_2 min^{-1} mg protein $^{-1}$.

1.2.4.5 Reactive oxygen species

Reactive oxygen species (ROS) was determined following ZHAO *et al.* (2013). In wells of a black 96-well plate, 20 μL of sample, 100 μL of PBS, and 8.3 μL of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) at 1 mg mL^{-1} in dimethyl sulfoxide (DMSO) were mixed. Subsequently, the plate was incubated for 30 min at 37 °C. After the incubation period, fluorescence was read in relative fluorescence units (RFU) with excitation/emission wavelengths of 485/520 nm, respectively, at a temperature of 25 °C. ROS was expressed as fluorescence measured in exposed samples relative to controls (% control RFU mg protein $^{-1}$).

1.2.5 Swim bladder area

Morphometric measurements were assessed using images generated on a Stemi 2000 C stereomicroscope (Zeiss) under a magnification of 20x. The vertical and horizontal diameter of the swim bladder was measured with an accuracy of 0.1 mm using AxioVision software (Zeiss). The swim bladder area was calculated using the following equation:

$$\text{Ellipse area} = (\text{Vertical diameter}/2) \times (\text{Horizontal diameter}/2) \times (3.1415)$$

1.2.6 Swimming behavior

Surviving larvae at 168 hpf ($n \sim 24$) from each treatment were individually transferred with Pasteur pipettes to 12-well cell culture plates (experimental arenas were 3.8 cm^2) containing 3 mL of clean freshwater. Larvae were acclimated to arenas for 5 min and

subsequently filmed for 5 min at 28 °C in top view with video cameras (model VP600H, Intellbras, São José, Brazil) that had variable zoom lenses (6-60 mm). Illumination came from below through white translucent Plexiglass plates. Videos were recorded on a computer with a video capture card at 30 frames per second (model GV900A, Geovision). Swimming behavior endpoints were measured from 5 min (300 s) video files using the Spontaneous Motor Activity Recording & Tracking (SMART) software (PanLabs, Harvard Apparatus, USA). Average swimming speed and average maximum speed were calculated and expressed in cm s^{-1} , movement time in 300 s was expressed in seconds (s), and the total distance traveled was expressed in cm.

1.2.7 Statistical analysis

Effect (uninflated swim bladder) concentrations in 50% of exposed larvae at 96 and 168 hpf ($\text{EC}_{50_{96\text{h}}}$ and $\text{EC}_{50_{168\text{h}}}$) were calculated based on the logistic model using the DRC package in R software version 4.0.2 (Ritz et al., 2016). Biochemical and molecular biomarkers, morphometric measures, and swimming behavior endpoints were analyzed by a parametric one-way analysis of variance (ANOVA) when the data were normal and homoscedastic, or by a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) otherwise. Normality was verified by a Shapiro-Wilk test and homoscedasticity by Levene's median test. Post hoc comparison tests used a Dunnett (ANOVA) or Dunn (Kruskal-Wallis) to evaluate differences between treatments using SigmaPlot 12.0 software (Jandel Scientific, Erkrath, Germany), which was also used to generate graphs. A p-value < 0.05 was used to denote statistical significance.

1.3 RESULTS

1.3.1 Chemical analysis of PAHs in oil water accommodated fraction

The total concentration of alkylated PAHs, and 16 parent PAHs ($\Sigma 16\text{PAH}$) in undiluted WAF was $71.78 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, $62.11 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHalk L}^{-1}$, and $9.66 \mu\text{g-}\Sigma 16\text{PAH L}^{-1}$, respectively (Fig.2, Table S2).

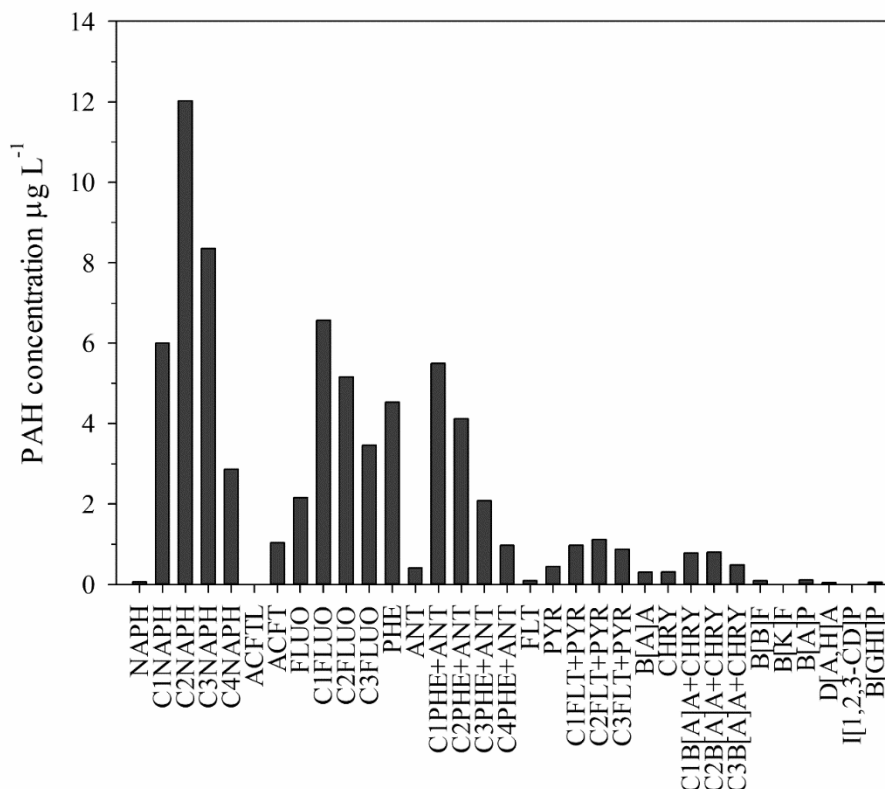


Fig. 2. Concentrations of parent and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to total PAH concentration in a water accommodated fraction (WAF) of oil. (NAPH = Naphthalene; ACFTL = Acenaphthylene; ACFT = Acenaphthene; FLUO = Fluorene; PHE = Phenanthrene; ANT = Anthracene; FLT = Fluoranthene; PYR = Pyrene; B[A]A = Benz[a]anthracene; CHRY = Chrysene; B[B]F = Benzo[B]fluoranthene; B[K]F = Benzo[k]fluoranthene; B[A]P = Benzo[A]pyrene; D[A,H]A = Dibenzo[a,h]anthracene; I[1,2,3-CD]P = Indeno[1,2,3-CD]pyrene; B[GHI]P = Benzo[GHI]perylene. C1 to C4 indicates the number of alkyl groups attached to the respective PAH. Adapted data from Mariz Jr, (2024).

1.3.2 RNA transcript expression during zebrafish development

When comparing expression patterns across controls at different stages of development, *hb9* ($F_{hb9} = 7.16$, $p \leq 0.001$, Dunnett test, $p < 0.05$), *elovl1a* ($F_{elovl1a} = 6.82$, $p = 0.001$, Dunnett test, $p < 0.05$), and *has2* ($F_{has2} = 19.72$, $p \leq 0.001$, Dunnett test, $p < 0.05$) mRNA expression was significantly decreased in 72 and 96 hpf larvae, relative to 48 hpf zebrafish (Fig. 3). The mRNA expression of *sox2* was also significantly decreased in 72 hpf larvae, compared to 48 hpf larvae ($F_{sox2} = 25.93$, $p \leq 0.001$, $p < 0.05$). *sox2* expression was not evaluated in 96 and 168 hpf larvae. In 168 hpf larvae, there was an increase in the mRNA expression of *elovl1a* and *has2* relative to 48 hpf larvae (Fig. 3).

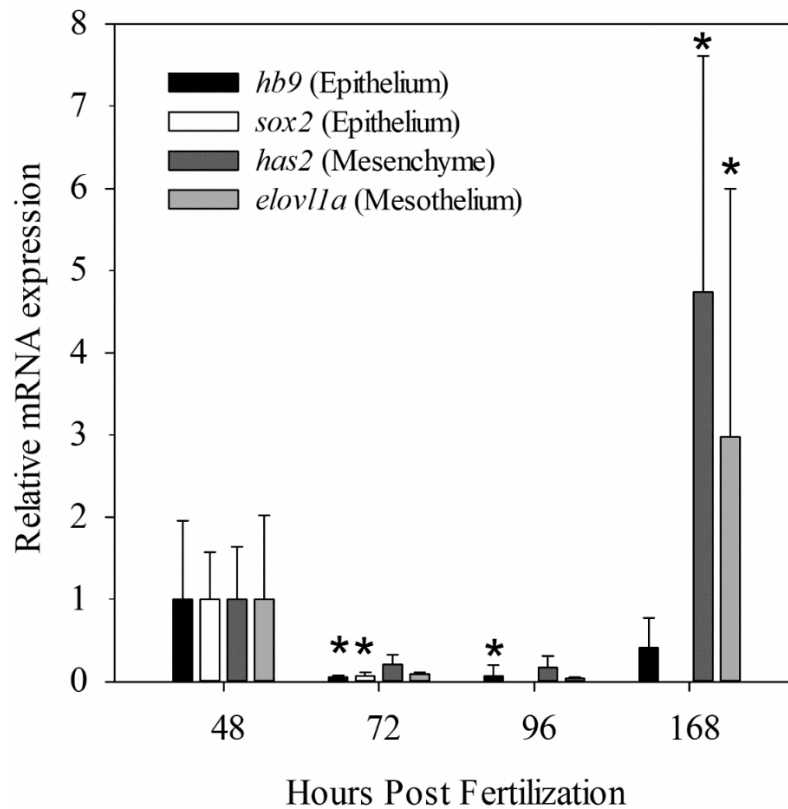


Fig. 3. Comparison of control treatments across developmental time, 48, 72, 96, and 168 hours post fertilization (hpf), to determine the relative mRNA expression (mean $\pm$ standard deviation) of *hb9*, *sox2*, *has2*, and *elov11a* normalized to β -actin in zebrafish (*Danio rerio*). The 72, 96, and 168 hpf time points are compared to differences in 48 hpf larvae ($n=5$). *: statistically different compared to the 48 hpf time point (ANOVA followed by a Dunnett test, $p < 0.05$).

The mRNA expression of *sox2* ($F_{sox2} = 4.86$, $p = 0.016$, Dunnett test, $p < 0.05$), *hb9* ($F_{hb9} = 5.3$, $p = 0.011$, Dunnett test, $p < 0.05$), and *elov11a* ($F_{elov11a} = 5.012$, $p = 0.014$, Dunnett test, $p < 0.05$) was significantly downregulated in 48 hpf larvae exposed to 4.49 and 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ compared to controls, and in *has2* expression in larvae exposed to 4.4 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ ($F_{has2} = 9.63$, $p < 0.001$, Dunnett test, $p < 0.05$) (Fig. 4A). The mRNA expression of *hb9*, *sox2*, *has2*, and *elov11a* was reduced by 22%, 54%, 24%, and 20% in larvae exposed to 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ relative to 48 hpf control larvae. In 72 hpf larvae, no significant differences in mRNA expression were seen between exposed larvae and controls (Fig. 4B). In 96 hpf larvae exposed to 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, *elov11a* expression was significantly upregulated compared to controls ($F_{elov11a} = 6.85$, $p = 0.006$, Dunnett test, $p < 0.05$) (Fig 4C). In 168 hpf larvae exposed to 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, *hb9* ($H_{hb9} = 16.59$, $p \leq 0.001$, Dunn's test, $p < 0.05$), *has2* ($H_{has2} = 15.69$, $p \leq 0.001$, Dunn's test, $p < 0.05$), and *elov11a* ($H_{elov11a} = 10.47$, $p = 0.005$, Dunnett test, $p < 0.05$) expression was downregulated by 18%, 22%, and 25% compared to controls (Fig 4D).

1.3.3 Biochemical biomarkers at 96 hpf

GST activity and GSH concentrations were increased in a concentration-dependent manner, with the lowest observed effect concentration (LOEC) being 17.9 and 8.97 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively ($F_{\text{GST}} = 9.44$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$, Fig. 5A; GSH $F_{\text{GSH}} = 11.90$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$, Fig. 5B). The activity of antioxidant defense enzymes, SOD and CAT, were inhibited in larvae in a concentration-dependent manner and the LOEC was 1.12 and 2.24 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively ($F_{\text{SOD}} = 11.80$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$, Fig. 5C; $F_{\text{CAT}} = 12.98$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$, Fig. 5D). There were no significant alterations in the levels of ROS in larvae across exposure treatments ($F_{\text{ROS}} = 0.201$, $p = 0.982$, Fig. 5E).

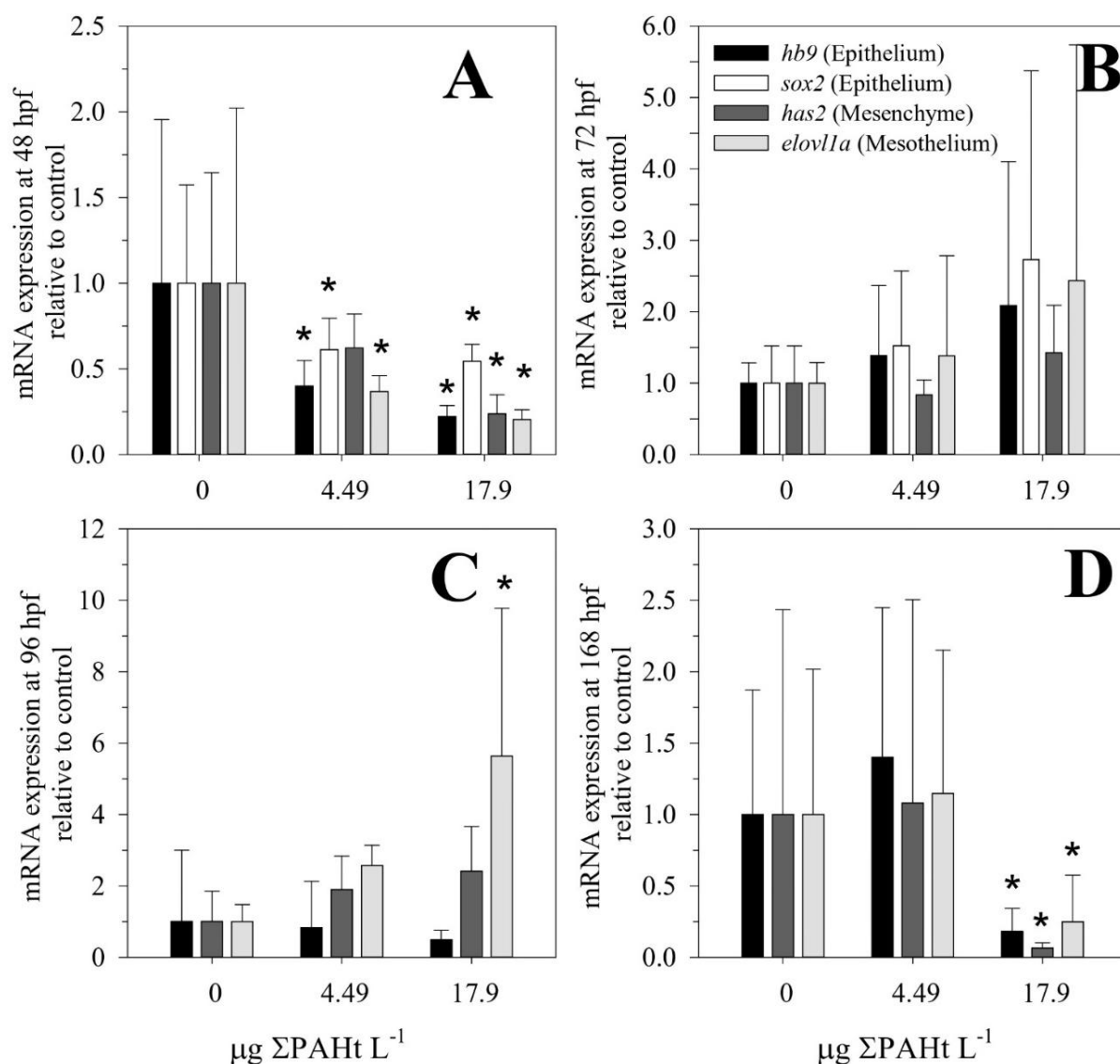


Fig. 4. Relative mRNA expression (mean $\pm$ standard deviation) of *hb9*, *sox2*, *has2*, and *elov11a* normalized to β -actin in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to different total polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations (ΣPAHt) at A) 48 hours post fertilization (hpf) B) 72

hpf, C) 96 hpf, and D) 168 hpf (n=5). (*) Asterisk indicates statistical difference compared to control treatment (0 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$); ANOVA followed by a Dunnet test, $p < 0.05$.

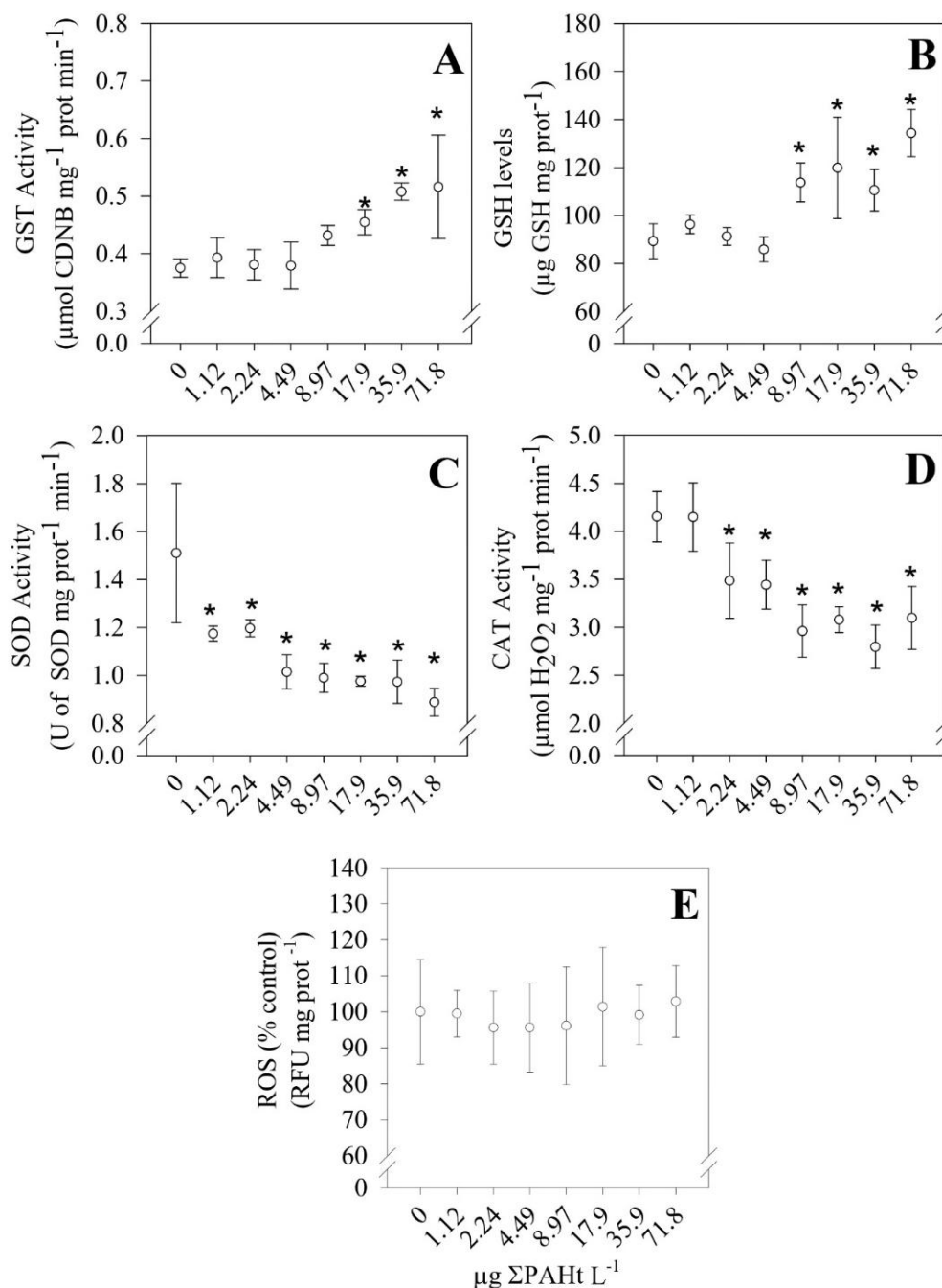


Fig. 5. Biochemical biomarkers (mean $\pm$ standard deviation) in larval zebrafish (*Danio rerio*) at 96 hpf exposed to different total polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations (ΣPAHt). A) Glutathione S-transferase (GST) activity, B) Glutathione (GSH) concentration, C) Superoxide (SOD) activity, D) Catalase (CAT) activity and E) Reactive oxygen species (ROS) Relative fluorescence unit (RFU). (*) Asterisk indicates statistical difference compared to control treatment (0 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$); ANOVA followed by a Dunnet test, $p < 0.05$.

1.3.4 Swim bladder morphology

The $\text{EC}_{50_{96\text{h}}}$ and $\text{EC}_{50_{168\text{h}}}$ for uninflated swim bladders in zebrafish larvae were 1.62 and 17.8 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively (Fig. 6A). Swim bladder area was reduced by 21% in

larvae at 168 hpf exposed to $17.9 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, compared to control larvae ($F = 3.29$, $p = 0.008$, Dunnett, $p < 0.05$, Fig. 6B).

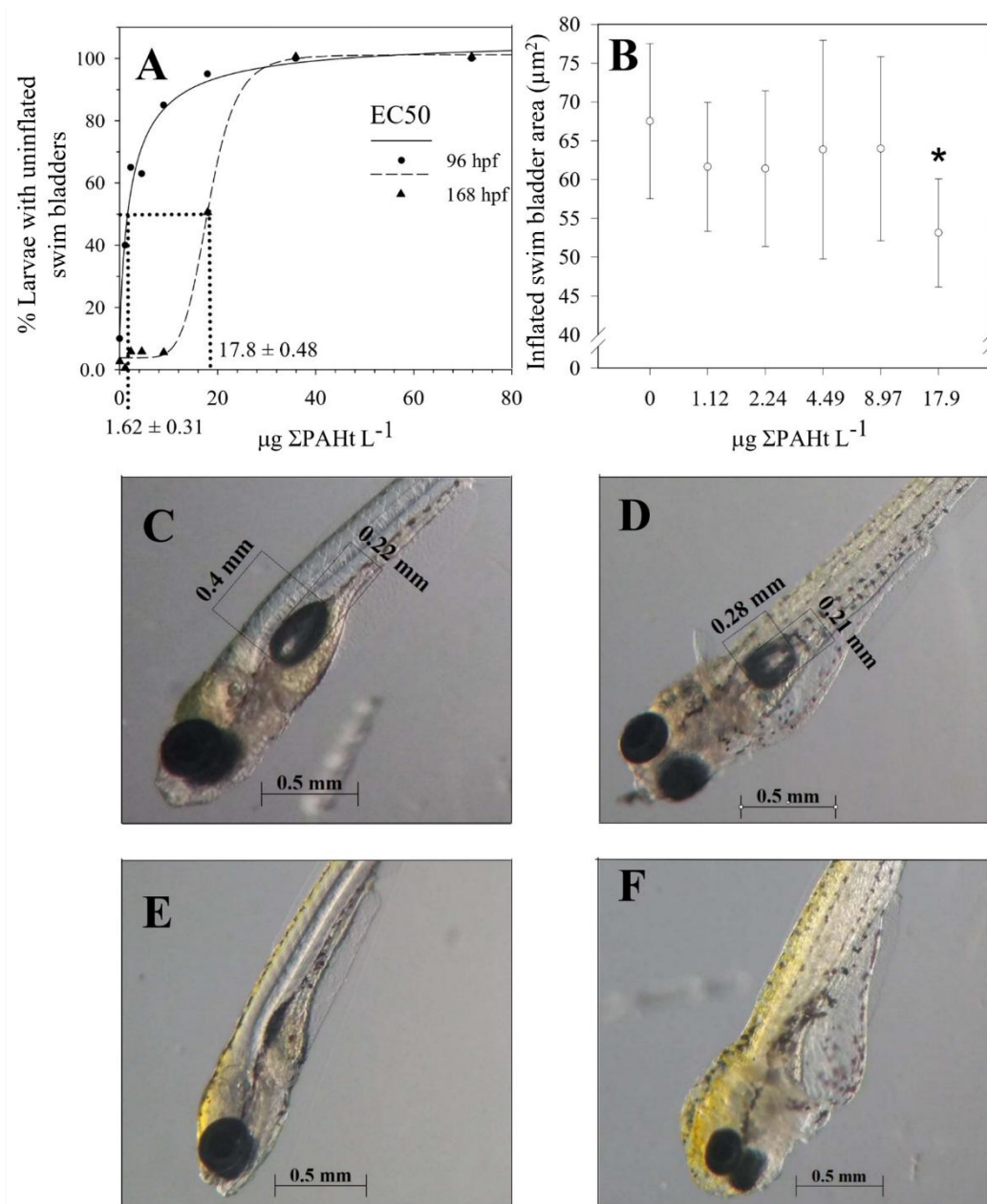


Fig. 6. A) Percentage of zebrafish (*Danio rerio*) larvae at 96 and 168 hours post fertilization (hpf) without inflated swim bladders after exposure to different total polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations (ΣPAHt) and dose response curves based on logistic modelling. Dotted lines indicate effect (uninflated swim bladder) concentration to 50% of the exposed larvae (EC50) at 96 hpf and 168 hpf (mean $\pm$ standard error of EC50s). B) Swim bladder area in 168 hpf larvae exposed to different ΣPAHt . C) Control larva with normal swim bladder. D) Larvae exposed to $17.9 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$. E) Larvae exposed to $17.9 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ with uninflated swim bladder. F) Larvae exposed to $35.9 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ with uninflated swim bladder. (*) Asterisk indicates statistical difference compared to control treatment ($0 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$); ($F=3.29$, $p = 0.008$, Dunnett test, $p < 0.05$).

1.3.5 Swimming activity

Decreases in larval swimming speeds (Fig. 7A) and distances (Fig. 7B) were seen, with LOECs equal to 1.12 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ ($F = 8.12$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$ and $F = 15.4$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$, respectively). Time spent swimming (Fig. 7C) and maximum swimming speed (Fig. 7D) were decreased in exposed larvae, with LOECs equal to 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ ($F = 10.74$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$ and $F = 6.89$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$, respectively).

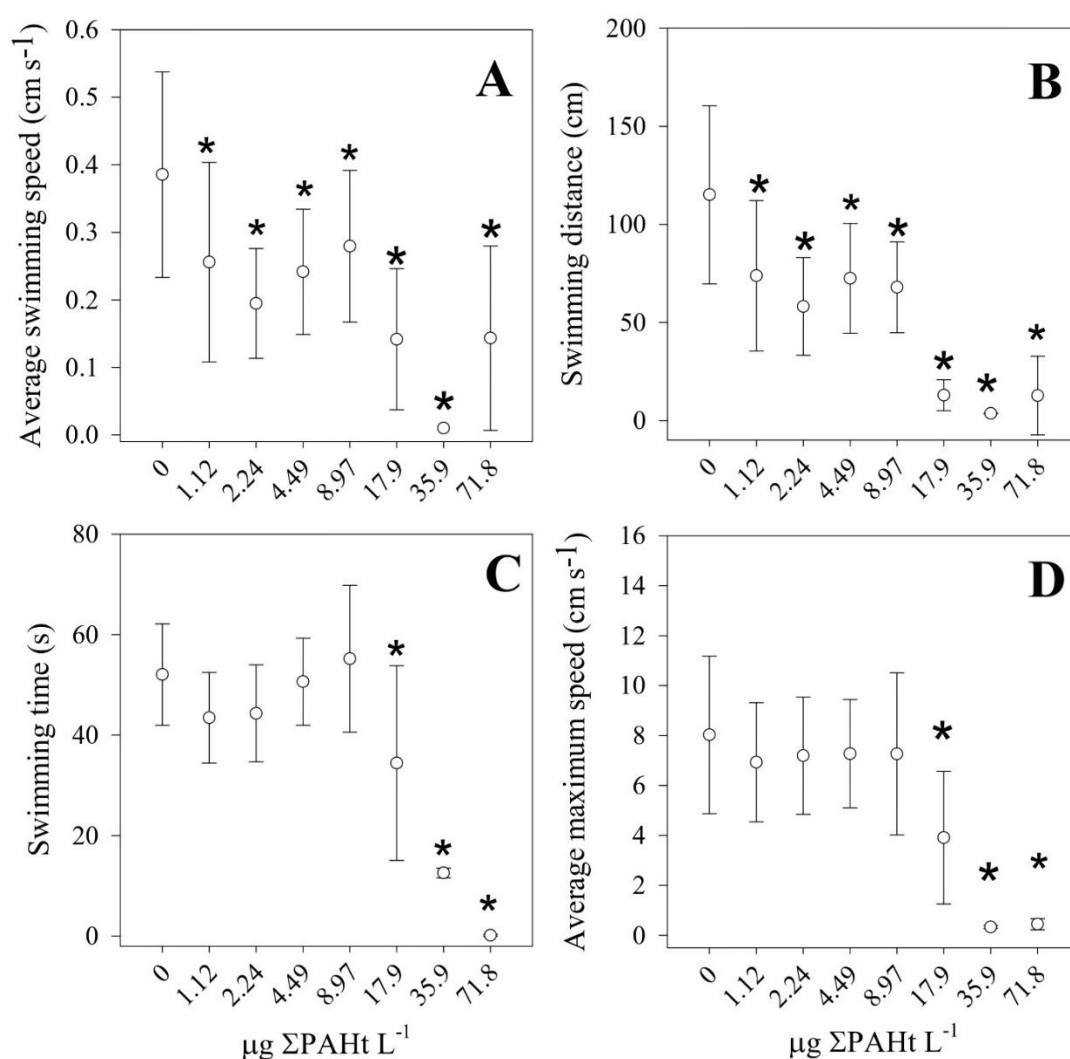


Fig. 7. Swimming behavior endpoints (mean $\pm$ standard deviation) in 168 hour post fertilization (hpf) zebrafish (*Danio rerio*) larvae exposed to different total polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations (ΣPAHt). A) Average swimming speed, B) swimming distance, C) time spent swimming, and D) average maximum swimming speed. (*) Asterisk indicates statistical difference compared to control treatment (0 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$); ANOVA followed by a Dunnett test, $p < 0.05$.

1.4 DISCUSSION

Swim bladder development and inflation is a complex process that can be affected by multiple physiological mechanisms in organisms exposed to different classes of contaminants (HORIE *et al.*, 2017; STINCKENS *et al.*, 2018) and PAH mixtures (PRICE *et al.*, 2020). This study identified a downregulation of genes involved in swim bladder development that was associated with an increased frequency of uninflated swim bladders and decreased swimming speeds in early life stage zebrafish exposed to a complex mixture of PAHs from the 2019 Brazilian oil spill. Larvae (48 hpf) exposed to 4.49 and 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ exhibited a downregulation of swim bladder development genes, including *hb9* (epithelium), *sox2* (epithelium and swim-up behavior), *has2* (mesenchyme), and *elovl1a* (mesothelium). It has been shown that *hb9*, *sox2*, *has2*, and *elovl1a* expression profiles are typically upregulated between 36 and 72 hpf, with these genes important in the development of the cell layers that make up the anterior swim bladder (SHASHA, 2023; WINATA *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2011). Larvae exposed to 4.49 and 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ had a concentration-dependent increase in uninflated swim bladders in 96 hpf and 168 hpf larvae (Fig. 6). Furthermore, 168 hpf larvae exposed to 4.49 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ recovered and inflated their swim bladders properly, whereas larvae exposed to 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ only partially recovered, as 50% of the larvae either did not inflate at all or the remaining 50% that did inflate presented a 21% reduction in overall area (Fig. 6B and D). Although we did not measure gene expression in larvae exposed to the highest concentrations of 35.9 and 71.8 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ due to limited sample size (Fig. 6F), 100% of these individuals did not inflate their swim bladders by 96 hpf or 168 hpf, indicating a lack of recovery in the inflation process (Fig. 6A).

The absence of a visibly inflated swim bladder or the reduction in its area in larvae exposed to 17.9 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ may be a result of alterations in either the development and/or differentiation of swim bladder layers, a deficiency in swimming skills to gulp air during initial inflation, or inadequate maintenance of swim bladder volume after initial inflation. These effects may result from cardiac impairment or direct damage to the gas gland or rete mirabile, making it difficult to differentiate from unsuccessful primary inflation (PRICE *et al.*, 2020). However, future studies could be conducted to assess histological endpoints to support this hypothesis. By 72 hpf, the tissues in the posterior chamber of the swim bladder in healthy larvae are formed. Larvae can then start swimming to the surface to gulp air, a behavior that relies on the expression of the *sox2* gene, whose knockout leads to deficits in motor neuron development and associated tail flick and swim-up behaviors in zebrafish larvae

(SHASHA, 2023). There was a significant downregulation in *sox2* expression in 48 hpf larvae, suggesting that dysregulations at this early time point may influence swim-up behavior and initial inflation. Although there was a significant hypoactivity observed in oil-exposed larvae by 168 hpf, which may be influenced by *sox2* inhibition at 48 hpf, the expression of *sox2* was not assessed at the later time points. Even though there is this limitation in comparisons between molecular and behavioral endpoints in the current study, it is worth a more mechanistic focus in follow up exposure scenarios to better understand this relationship.

A previous study used whole-mount in situ hybridization in early life stage zebrafish to better assess baseline expression profiles of *hb9*, *sox2*, *has2*, and *elovl1a* and relation to swim bladder development, whose genes are typically upregulated between 36 and 72 hpf (SHASHA, 2023; WINATA *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2011). We found that our expression results in control larvae, through targeted qPCR, are consistent with these findings, as these genes were detected from 48 hpf to 96 hpf. However, we found that *hb9*, *sox2*, *elovl1a*, and *has2* expression are greater at 48 hpf, with significant decreases in 72 and 96 hpf larvae (Fig. 3). The first stage of the posterior swim bladder is a bud of epithelial tissue detected between 30 and 60 hpf, which is associated with the expression of *hb9* (WINATA *et al.*, 2009) and *sox2* (YIN *et al.*, 2011). The expression of *has2* (mesenchyme) and *elovl1a* (mesothelium) was greater in 168 hpf larvae compared to 48 hpf (Fig. 3). The upregulation of these genes is likely to be related to the development of the subsequent layers that form the posterior swim bladder. When exposed to $17.9 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, larvae had a downregulation in *elovl1a* and *has2* expression, which could possibly affect the development of the posterior swim bladder that typically inflates at 21 days post fertilization (WINATA *et al.*, 2009). Furthermore, there was a downregulation in the epithelium gene, *hb9*, in 48 hpf larvae exposed to $2.43 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHp L}^{-1}$. This was similarly seen in zebrafish larvae exposed to Oman and Meray crude oil WAFs at concentrations of 3.81 and $4.88 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHp L}^{-1}$, respectively, which also indicated a downregulation of *hb9*, as well as a gene from the mesothelium, *anxa5*, although in 120 hpf larvae (LI *et al.*, 2019). Larval zebrafish exposed to $14.19 \mu\text{g S-metolachlor L}^{-1}$, an herbicide, also exhibited a downregulation of epithelium and mesothelium *anxa5* expression in 144 hpf larvae, which was associated with a reduction in swim bladder area (YANG *et al.*, 2021).

Fish exposed to oil and PAHs are susceptible to oxidative stress from the imbalance between the production of ROS and antioxidant defenses, among which SOD and CAT catabolize the superoxide anion and hydrogen peroxide, respectively (ESTEBAN-SÁNCHEZ *et al.*, 2021; LUSHCHAK, 2016). WAF exposure inhibited antioxidant defense in early life

stage zebrafish larvae, as SOD and CAT levels were reduced in larvae, with LOECs of 1.12 and 2.24 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively (Fig. 5). Although ROS was not significantly dysregulated after WAF exposure, GST and GSH can have a significant supplemental antioxidant role in the cell (GUERREIRO *et al.*, 2024). ZHANG *et al.* (2022) demonstrated that larval zebrafish exposed to 0.25 mg L^{-1} Cd had an excessive induction in ROS production leading to the inhibition of Wnt and Hh signaling pathways, which are responsible for the signaling and organization of swim bladder tissues. The inhibition of antioxidant defenses in larvae exposed to baseline ROS levels may have contributed to the downregulation of membrane regulatory genes, potentially due to increased cellular vulnerability to those molecules. GAO *et al.* (2023) found that the exposure of eight chemicals (not including PAHs) to embryonic zebrafish can induce an excessive production of ROS leading to an inhibition of the activity of the deiodinase (DIO) enzymes, which are expressed in the three tissue layers of primordium in the swim bladder at the early life stage from 36 to 72 hpf and are vital to swim bladder inflation. Future studies that assess if PAH-induced oxidative stress is involved in the downregulation of the genes measured in this study may be beneficial to better characterize this direct relationship.

Swimming performance is a fundamental trait that mediates fitness and survival in aquatic animals, having important roles in dispersal processes, habitat selection, predator-prey interactions, and reproduction (CARVALHO, 2014; SLOMAN *et al.*, 2012). Average swimming speed and distance traveled were reduced in a concentration-dependent manner in WAF-exposed larvae with a LOEC of 1.12 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (Fig. 7), whereas the percentage of larvae lacking inflated swim bladders also increased in a concentration-dependent manner (Fig. 6). This suggests that the absence of a swim bladder may have contributed to a reduction in swimming activity, which would likely impair survival and fitness, as proper swim bladder inflation is needed for successful recruitment of fish larvae (CZESNY *et al.*, 2005). This study identified toxic responses in early life stage fish exposed to concentrations of PAHs detected in the environment, impairing proper swim bladder development and swimming speed. Water concentrations of PAHs in coral reef areas following the spill ranged from 0.75 to 7.1 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (MELO ALVES *et al.*, 2024), suggesting that these effects could happen in the natural system to early life stage fish.

CONCLUSION

Concentrations of crude oil detected from a Brazilian oil spill dysregulated genes involved in swim bladder formation and swim-up behavior. Subsequently, swim bladder

inflation and area were decreased in oil-exposed larvae. Reductions in swimming activity were likely due to impaired swim bladder development, which could have implications for early life stage fish survival in the wild following exposure. This suggests that the swim bladder is a sensitive endpoint following crude oil exposure and that follow up studies may be beneficial to gain a better understanding of the underlying upstream factors that could influence swim bladder development and inflation in fish.

REFERENCES

- ALVES, R. N.; MARIZ JR, C. F.; PAULO, D. V. d.; CARVALHO, P. S. M. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere*, 178, p. 224-230, 7// 2017.
- BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of biological chemistry*, 195, n. 1, p. 133-140, 1952/03// 1952.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, p. 882-888, May 1963.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07/ 1976.
- BRETTE, F.; SHIELS, H. A.; GALLI, G. L. J.; CROS, C. *et al.* A Novel Cardiotoxic Mechanism for a Pervasive Global Pollutant. *Scientific Reports*, 7, p. 41476, 01/31/online 2017.
- CARVALHO, P. S. M. Behavioral Biomarkers and Pollution Risks to Fish Health and Biodiversity. *In: Almeida, E. A. d. e Ribeiro, C. A. d. O. (Ed.). **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems***. Boca Raton, FL: CRC Press, 2014. v. 1, p. 350-378.
- CHOUERI, R. B.; DE SOUZA ABESSA, D. M.; DE CARVALHO, M. U.; PAZINI, B. *et al.* PAH residues and toxicity levels two years after an extensive oil spill on the northeast Brazilian coast. *Marine Pollution Bulletin*, 200, p. 116063, 2024/03/01/ 2024.
- CRAVEIRO, N.; DE ALMEIDA ALVES, R. V.; DA SILVA, J. M.; VASCONCELOS, E. *et al.* Immediate effects of the 2019 oil spill on the macrobenthic fauna associated with macroalgae on the tropical coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 165, p. 112107, 2021/04/01/ 2021.
- CZESNY, S. J.; GRAEB, B. D. S.; DETTMERS, J. M. Ecological Consequences of Swim Bladder Noninflation for Larval Yellow Perch. *Transactions of the American Fisheries Society*, 134, n. 4, p. 1011-1020, 2005.
- DE OLIVEIRA ESTEVO, M.; LOPES, P. F. M.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. C.; JUNQUEIRA, A. B. *et al.* Immediate social and economic impacts of a major oil spill on Brazilian coastal fishing communities. *Marine Pollution Bulletin*, 164, p. 111984, 2021/03/01/ 2021.

DE SOUZA, C. S.; DE OLIVEIRA MAFALDA, P.; DE KIKUCHI, R. K. P.; DOMINGUEZ, J. M. L. Assessment of the Brazilian Coast Oil Spill Impact in the fish eggs and larvae development from the Tropical Continental Shelf. *Regional Studies in Marine Science*, 56, p. 102635, 2022/11/01/ 2022.

DUBIEL, J.; JOHNSON, H.; ERIKSSON, A. N. M.; HONTELA, A. *et al.* Effects of Alkylation on Potency of Benz[a]anthracene for AhR2 Transactivation in Nine Species of Freshwater Fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42, n. 7, p. 1575-1585, 2023/07/01 2023.

ESTEBAN-SÁNCHEZ, A.; JOHANN, S.; BILBAO, D.; PRIETO, A. *et al.* Multilevel responses of adult zebrafish to crude and chemically dispersed oil exposure. *Environmental Sciences Europe*, 33, n. 1, p. 106, 2021/09/06 2021.

GAO, Y.; YANG, P. The impaired swim bladder via ROS-mediated inhibition of the Wnt / Hedgehog pathway in zebrafish embryos exposed to eight toxic chemicals and binary chemical mixtures. *Chemosphere*, 338, p. 139593, 2023/10/01/ 2023.

GUERREIRO, F. C.; ALVES, T. C.; SALDAÑA-SERRANO, M.; GOMES, C. *et al.* Integrating pollutant levels and biochemical biomarkers in oysters (*Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gasar*) indicates anthropic impacts on marine environments along the coast of Santa Catarina state, Brazil. *Mar Environ Res*, 194, p. 106309, Feb 2024.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. *Journal of Biological Chemistry*, 249, n. 22, p. 7130-7139, November 25, 1974 1974.

HORIE, Y.; YAMAGISHI, T.; TAKAHASHI, H.; SHINTAKU, Y. *et al.* Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. *Journal of Applied Toxicology*, 37, n. 10, p. 1245-1253, 2017.

INGHAM, P. W.; MCMAHON, A. P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, 15, n. 23, p. 3059-3087, Dec 1 2001.

JONKER, M. T. O. Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to cellulose. *Chemosphere*, 70, n. 5, p. 778-782, 2008/01/01/ 2008.

LI, X.; XIONG, D.; DING, G.; FAN, Y. *et al.* Exposure to water-accommodated fractions of two different crude oils alters morphology, cardiac function and swim bladder development in early-life stages of zebrafish. *Chemosphere*, 235, p. 423-433, 2019/11/01/ 2019.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. Rapid kinetic microassay for catalase activity. *Journal of Biomolecular Techniques*, 18, p. 185-187, 2007.

LINDSEY, B. W.; SMITH, F. M.; CROLL, R. P. From Inflation to Flotation: Contribution of the Swimbladder to Whole-Body Density and Swimming Depth During Development of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 7, n. 1, p. 85-96, 2010.

LIRA, A. L. d. O.; CRAVEIRO, N.; DA SILVA, F. F.; ROSA FILHO, J. S. Effects of contact with crude oil and its ingestion by the symbiotic polychaete *Branchiosyllis* living in sponges (*Cinachyrella* sp.) following the 2019 oil spill on the tropical coast of Brazil. *Science of The Total Environment*, 801, p. 149655, 2021/12/20/ 2021.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, n. 2, p. 711-747, 2016/04/01 2016.

MAGALHÃES, K. M.; CARREIRA, R. S.; ROSA FILHO, J. S.; ROCHA, P. P. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. *Marine Pollution Bulletin*, 175, p. 113334, 2022/02/01/ 2022.

MAGNUSON, J. T.; BAUTISTA, N. M.; LUCERO, J.; LUND, A. K. *et al.* Exposure to Crude Oil Induces Retinal Apoptosis and Impairs Visual Function in Fish. *Environmental Science and Technology*, 54, n. 5, p. 2843-2850, 2020.

MAHARAJAN, K.; MUTHULAKSHMI, S.; NATARAJ, B.; RAMESH, M. *et al.* Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. *Aquat Toxicol*, 196, p. 132-145, Mar 2018.

MARIZ JR, C. F.; NASCIMENTO, J. V. G.; MORAIS, B. S.; ALVES, M. K. M. *et al.* Toxicity of the oil spilled on the Brazilian coast at different degrees of natural weathering to early life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Marine Pollution Bulletin*, 207, p. 116819, 2024/10/01/ 2024.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MELO ALVES, M. K. d.; MARIZ JR, C. F.; MELO, T. J. B. d.; ALVES, R. N. *et al.* Oil spill impact on Brazilian coral reefs based on seawater polycyclic aromatic hydrocarbon contamination, biliary fluorescence and enzymatic biomarkers in damselfish *Stegastes fuscus* (Teleostei, Pomacentridae). *Marine Pollution Bulletin*, 208, p. 116958, 2024/11/01/ 2024.

OECD. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Paris: OECD Publishing, 2013.

PASPARAKIS, C.; ESBAUGH, A. J.; BURGGREN, W.; GROSELL, M. Physiological impacts of Deepwater Horizon oil on fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 224, p. 108558, 2019/10/01/ 2019.

PRICE, E. R.; MAGER, E. M. The effects of exposure to crude oil or PAHs on fish swim bladder development and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 238, p. 108853, 2020/12/01/ 2020.

REDMAN, A. D.; MCGRATH, J. A.; STUBBLEFIELD, W. A.; MAKI, A. W. *et al.* Quantifying the concentration of crude oil microdroplets in oil-water preparations. *Environ Toxicol Chem*, 31, n. 8, p. 1814-1822, Aug 2012.

SANTANA, J. L.; RIOS, A. S.; CALADO, T. C. S.; ZANARDI-LAMARDO, E. *et al.* Reef crab population changes after oil spill disaster reach Brazilian tropical environments. *Marine Pollution Bulletin*, 183, p. 114047, 2022/10/01/ 2022.

SHASHA, C. Z., Dong; Xiaohua, Dong; Wenshuang, Jia; Fuyou, Zhou; and Qingshun, Zhao. Zebrafish *sox2* Is Required for the Swim Bladder Inflation by Controlling the Swim-Up Behavior. 20, n. 1, p. 10-18, 2023.

SLOMAN, K. A.; MCNEIL, P. L. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *Journal of Fish Biology*, 81, n. 7, p. 2175-2198, 2012.

SOARES, M. O.; TEIXEIRA, C. E. P.; BEZERRA, L. E. A.; RABELO, E. F. *et al.* The most extensive oil spill registered in tropical oceans (Brazil): the balance sheet of a disaster. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, n. 13, p. 19869-19877, 2022/03/01 2022.

STINCKENS, E.; VERGAUWEN, L.; ANKLEY, G. T.; BLUST, R. *et al.* An AOP-based alternative testing strategy to predict the impact of thyroid hormone disruption on swim bladder inflation in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 200, p. 1-12, 7// 2018.

WINATA, C. L.; KORZH, S.; KONDRYCHYN, I.; ZHENG, W. *et al.* Development of zebrafish swimbladder: The requirement of Hedgehog signaling in specification and organization of the three tissue layers. *Dev Biol*, 331, n. 2, p. 222-236, Jul 15 2009.

XU, J.; ZHANG, R.; ZHANG, T.; ZHAO, G. *et al.* Copper impairs zebrafish swimbladder development by down-regulating Wnt signaling. *Aquat Toxicol*, 192, p. 155-164, Nov 2017.

YANG, L.; IVANTSOVA, E.; SOUDERS, C. L.; MARTYNIUK, C. J. The agrochemical S-metolachlor disrupts molecular mediators and morphology of the swim bladder: Implications for locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, p. 111641, 2021/01/15/ 2021.

YIN, A.; KORZH, S.; WINATA, C. L.; KORZH, V. *et al.* Wnt Signaling Is Required for Early Development of Zebrafish Swimbladder. *PLOS ONE*, 6, n. 3, p. e18431, 2011.

ZACHARIAS, D. C.; GAMA, C. M.; HARARI, J.; DA ROCHA, R. P. *et al.* Mysterious oil spill on the Brazilian coast – Part 2: A probabilistic approach to fill gaps of uncertainties. *Marine Pollution Bulletin*, 173, p. 113085, 2021/12/01/ 2021.

ZHANG, T.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; LIN, J. *et al.* Cadmium impairs zebrafish swim bladder development via ROS mediated inhibition of the Wnt / Hedgehog pathway. *Aquatic Toxicology*, 247, p. 106180, 2022/06/01/ 2022.

ZHAO, X.; WANG, S.; WU, Y.; YOU, H. *et al.* Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 136–137, p. 49-59, 7/15/ 2013.

ANEXO-1

Table S1. Target and reference genes with their respective primer sequences, accession number, and efficiency.

Gene	Primer Forward (F) and Reverse (R) (5'-3')	Accession	Nº	Efficiency (%)
<i>hb9</i>	R: ACA CGC AGT GGT CAT GGA TA F: TGC AGA GGT GAC ATC CAC AT	NM_001009885.2	26 pb	79.3
<i>sox2</i>	R: GCC TCT GTT CGT TCT CTC AT F: GAA CGG TAG GAA CTC CAC AC	NM_213118.1	23 pb	120.0
<i>has2</i>	R: CGC AGG TAG GTA ATG GGC GT F: CGT GGG TCT CCT TCC TGA GC	NM_153650.2	21 pb	84.1
<i>elovl1a</i>	R: CGC ATT ACC GTT TTC CAA GT F: CAT CCT GAT CTA CGG CAC CT	NM_001005989.3	20 pb	93.0
<i>β-actin</i>	R: CAA CGG AAA CGC TCA TTG C F: CGA GCA GGA GAT GGG AAC C	AF_057040.1	20 pb	82.7

ANEXO-2

Table S2. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) in water accommodated fractions (WAF) of oil samples from Paiva Beach, off the coast of Pernambuco, Brazil.

Analyte	n-Ar	WAF
Naphthalene	2	0.064
C1 Naphthalenes	2	5.999
C2 Naphthalenes	2	12.027
C3 Naphthalenes	2	8.357
C4 Naphthalenes	2	2.868
Acenaphthylene	2	ND
Acenaphthene	2	1.040
Fluorene	2	2.159
C1 Fluorenes	2	6.561
C2 Fluorenes	2	5.160
C3 Fluorenes	2	3.457
Sum of 2 aromatic ring molecules	2	47.69
Phenanthrene	3	4.527
Anthracene	3	0.404
C1 Phenanthrenes + Anthracenes	3	5.489
C2 Phenanthrenes + Anthracenes	3	4.120
C3 Phenanthrenes + Anthracenes	3	2.075
C4 Phenanthrenes + Anthracenes	3	0.974
Fluoranthene	3	0.090
Sum of 3 aromatic ring molecules	3	17.680
Pyrene	4	0.442
C1 Fluoranthenes + Pyrenes	4	0.974
C2 Fluoranthenes + Pyrenes	4	1.116
C3 Fluoranthenes + Pyrenes	4	0.870
Benzo[a]anthracene	4	0.304
Chrysene	4	0.309
C1 Benzo[a]anthracenes + Chrysenes	4	0.780
C2 Benzo[a]anthracenes + Chrysenes	4	0.797
C3 Benzo[a]anthracenes + Chrysenes	4	0.483
Benzo[b]fluoranthene	4	0.095
Benzo[k]fluoranthene	4	0.006
Sum of 4 aromatic ring molecules	4	6.175
Benzo[a]pyrene	5	0.113
Dibenzo[a,h]anthracene	5	0.047
Sum of 5 aromatic ring molecules	5	0.160
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	6	0.012
Benzo[ghi]perylene	6	0.048
Sum of 6 aromatic ring molecules	6	0.059
Σ total PAH (parent + alkylated): Σ PAHt		71.8
Σ parent 16 PAH (% of Σ PAHt)		9.7
Σ alkylated PAH (% of Σ PAHt)		62.1
Total LPAH		65.4
Total HPAH		6.4
Ratio LPAH/HPAH > 2.3 *		5.6
Ratio alkylated/parent PAH > 2.3 *		6.4
Ratio Ant/Ant + Phe < 0.1*		0.08
Ratio Flu/Flu + Pyr < 0.4*		0.2
Ratio C1-C4 Naphthalenes/ Σ PAHt		0.41

n-Ar: number of aromatic rings in molecule. ND: not detected. LPAH: Low molecular weight PAHs, HPAH: High molecular weight PAHs.; Ant: anthracene; Phe: Phenanthrene; Fluo: Fluoranthene; Pyr: Pyrene. *: expected ratio value for petrogenic origin of PAH mixture according to Ghetu et al., (2021). Table adapted from Mariz Jr et al., (2024).

Ghetu, C., Scott, R., Wilson, G., Liu-May, R., Anderson, K., 2021. Improvements in identification and quantitation of alkylated PAHs and forensic ratio sourcing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 413, 1-14. 10.1007/s00216-020-03127-0

Mariz Jr, C.F., Nascimento, J.V.G., Morais, B.S., Alves, M.K.M., Rojas, L.A.V., Zanardi-Lamardo, E., Carvalho, P.S.M., 2024. Toxicity of the oil spilled on the Brazilian coast at different degrees of natural weathering to early life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Marine pollution bulletin* 207, 116819.

V MANUSCRITO 3 (Photoenhanced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from Brazilian oil spill water accommodated fraction (WAF) on *Danio rerio* early life stages exposed to natural sunlight)

ABSTRACT

Oil spills on the ocean have been studied due to their proportion and acute destructive capacity for aquatic ecosystems. The Brazilian coast experienced an incident with emulsified weathered oil, that bring consequences to economy, ecosystems and socials between 2019-2020. A total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) concentration of $32.95 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ was measured in the 100% water accommodated fraction (WAF) sample. Of this, 22.4% were parent PAHs without alkylation, and 77.6% were alkylated PAHs. The lethal concentration for 20% of the *Danio rerio* exposed (LC20) of the WAF presented a $\text{LC20}_{168\text{hpf}} = 29.11 \pm 5.83 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, while the organisms exposed WAF plus UV radiation presented a $\text{LC20}_{168\text{hpf}} = 8.416 \pm 0.66 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$. Embryonic development delays assessed by GMS, pathology development assessed by GTS, and heart rate presented a fourfold reduction in LOEC in early life stage (ELS) exposed to WAF-UV. Other endpoints such as total length and eye area had their LOECs reduced by eight and sixteen times in ELS exposed to WAF-UV, respectively. In this study, the absence of cardiac looping observed during the experiment reached 52 and 64% at concentrations of 32.95 and $8.24 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, for WAF and WAF-UV, respectively. This factor may have been one of the aggravating factors in the evaluation of heart rate, which was statistically reduced in the higher treatments compared to the control and compared between experimental situations. Biochemical parameters evaluated in this work demonstrate induction of the state of oxidative stress and a possible correlation with an increase in the frequency of pathology and delay in the development of fish.

Keywords: Solar radiation, Oil spill, GMS, GTS, oxidative stress.

1.1 INTRODUCTION

Marine environments are frequently exposed to oil contamination as a result of transportation, oil drilling, fuel usage, or spillage (BRUSSAARD *et al.*, 2016). Between the 2019-2020, 3000 km of the Brazilian coast were affected by ~5400 tons of weathered oil with emulsified texture (SOARES *et al.*, 2022; ZACHARIAS; GAMA; HARARI; *et al.*, 2021). The weathered and emulsified oil adhered to irregular surfaces such as coral reefs and roots of the mangroves, making it difficult to remove the residues. This oil remains induced the emergence of pathologies in the fish early life stage (ELS) (DE SOUZA *et al.*, 2022) and bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) metabolites in bile of adult fish

resulting in biochemical alterations (ALVES *et al.*, 2024). Additionally, oil-impacted reef habitats showed a reduction in benthic fauna species richness and population abundance (CRAVEIRO *et al.*, 2021; LIRA *et al.*, 2021; SANTANA *et al.*, 2022).

Brazil is a tropical country with high levels of solar and consequently ultraviolet (UV) radiation (PEREIRA *et al.*, 2017), and it is impossible not to expose aquatic organisms to UV radiation and PAHs simultaneously. The oil remnants in the reef provided a slow but constant introduction of some PAH molecules to the water, making them bioavailable to local organisms. Water concentrations of PAHs in coral reef areas visibly impacted by oil ranged from 0.75 to 7.1 $\mu\text{g PAH L}^{-1}$. PAHs are considered the most toxic component of oil (PULSTER *et al.*, 2020). These molecules are linked to numerous biological changes, such as cardiac dysfunctions (MAGER *et al.*, 2024), teratogenic (ALVES *et al.*, 2017), and genotoxic alterations for DNA damage (PERRICHON *et al.*, 2016). Sunlight can interact with certain xenobiotic compounds in a phenomenon known as photo-induced, photo-enhanced, photo-activated, or photo-toxicity (ROBERTS *et al.*, 2017). The same process occurs with PAHs under solar radiation (BARRON, 2017).

The phototoxicity of oil occurs through two mechanisms: the formation of directly toxic intermediates via photo-modification, or the photo-induction of bioaccumulated residues that cause tissue damage through a process known as photosensitization – when sunlight activates an oxidized molecule in the body causing damage to healthy cells (BARRON, 2017). The exposure of juvenile fish to PAH and UV radiation induces anthracene toxicity which when pure is non-toxic (ORIS *et al.*, 1986; ORIS *et al.*, 1984; ORIS *et al.*, 1985). The transparency of tissues and chorion in embryo stages facilitate the photo-induction of biotransformed PAHs. The effects for embryos are increase in mortality and the incidence of developmental malformations, with the skin and gills being the most affected tissues in larvae (ALVES *et al.*, 2020). Despite lower tissue PAH concentrations, *Gadus morhua* transparent embryos exposed to oil and UV radiation exhibited a heightened *cyp1a* expression response, indicating that photomodification of absorbed PAHs may be occurring (ARANGUREN-ABADÍA *et al.*, 2022). Furthermore, same situation resulted in severe tissue necrosis in *Melanogrammus aeglefinus* transparent embryos and reduced in 60% the lethal concentrations to 50% (LC50) of embryos (SØRHUS *et al.*, 2022).

This study used a water accommodated fraction (WAF) prepared from the oil that arrived at the Brazilian coast. The emulsified oil sample has natural weathering processes and presented a low concentration of parental PAHs and high concentrations of alkylated PAH

species (MARIZ JR *et al.*, 2024). The establishment of this oil in coral reefs and natural areas during the accident provided combined exposure of WAF and intense solar radiation, due to the tropical climate of the country. The objective of this work was to perform a combined exposure of *Danio rerio* embryo/larva stages to WAF and solar radiation simulating what happen in coral reefs in Brazilian coastline, to answer the hypothesis that during the accident the PAH was photoinduced and compounds dissolved/dispersed in the tide pools were harmful to local biota.

1.2 MATERIALS AND METHODS

1.2.1 Zebrafish culture and experimental design

Wild short-tailed *Danio rerio* (zebrafish) cultivated at the Laboratory of Aquatic Ecotoxicology (LABECOTOX) were kept in 100 L aquariums, and the culture water quality standards remained constant, with total ammonia concentration below $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$, pH between 6.6 and 7.4, and dissolved oxygen between $6.0 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$, temperature 28 ± 0.2 °C. The daily diet of the breeding is carried out with a diet of 40% fish protein and freshly hatched live nauplios of *Artemia salina*. To obtain the fertilized eggs, 9 mature females and 18 males were transferred to spawning aquariums (15 L) in the afternoon of the day before the beginning of the experiment. After spawning and fertilization at dawn, a screening and selection of fertilized and viable eggs was performed by direct observation on a Zeiss® stereomicroscope with 50x magnification. The fertilization rate was over 90% and the eggs were used up to <3 hours post-fertilization (hpf). The fertilized eggs were arranged in 24-well polystyrene plates, following the exposure system laid out in OECD 236 (OECD, 2013). In each well, 2.5 mL of the WAF solution was added at different concentrations and 2 mL was changed daily for the purpose of maintaining internal concentrations and oxygenation.

Sun exposure was performed in an experimental cold bath that kept the plate solution at a stable temperature during the period of sun exposure of 5 h-48 hpf and 5 h-72 hpf (Fig. S1). The plates were arranged in floating stations in a temperature-controlled aquarium with a thermostat coupled to a reservoir of cold water that constantly pumped water at low temperature into the cold bath. Cold water enters the system where it was homogenized by a pump that kept the water homogeneous and circulating internally, consequently bringing the thermostat to 28 °C. Both the protected (WAF) and UV-exposed (WAF-UV) plates were kept in the same system, with the WAF covered with a UV-protective fabric. The average temperature inside the sun-exposed embryo/larva wells was 28.00 ± 0.08 °C and at the non-exposed wells (or the sun-protected wells) the temperature remained at 28.1 ± 0.2 °C.

1.2.2 UV radiation measurement

Daily time series of UV A (315-400 nm) and B (280-315) were obtained from GOME-2 instrument (Global Ozone Monitoring Experiment) on board the Metop-A/B/C satellites and just readings from December 6th and 7th, 2023 were used, corresponding to the days of the exposure experiment. The data were expressed in kilojoules per square meter (Kj m^{-2}) and are available online and free for download through the website (<https://safserver.fmi.fi/index.html>).

1.2.3 Oil water accommodated fraction (WAF) preparation and chemical analysis

WAF production followed established protocols (JULIE ADAMS, 2017; SINGER *et al.*, 2000). Oil samples were weighed to the nearest 0.01 g and transferred to 10-liter glass Mariotte flasks. A 1:100 oil-to-water ratio (1 g oil: 100 mL water) was used to prepare 10 liters of WAF. The freshwater used for WAF preparation was the same as the Zebrafish culture, and it was monitored twice weekly using a multiparameter instrument. The following parameters were maintained: pH 7.2 ± 0.2 , conductivity $115 \pm 20 \mu\text{S cm}^{-1}$, alkalinity $60 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$, hardness $70 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$, dissolved oxygen $7.0 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$, and temperature $27.5 \pm 0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Oil and water mixtures were subjected to 24 hours of moderate agitation in sealed, dark aquariums. Subsequently, the water phase was decanted and filtered through a 2-micrometer cellulose filter to remove oil particles. The filtered WAF samples were stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in 4-liter amber glass vials. The WAF was then diluted with zebrafish culture water in proportions of 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13% and 1.53% and kept in amber glass vials at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. During the daily changes, the solutions were warmed to the exposure temperature of $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ before changing the solutions in the exposure wells.

On the day of zebrafish exposure solution preparation, 1-liter aliquots of oil WAF samples were subjected to liquid-liquid extraction with 20 mL of n-hexane to quantify PAH concentrations. To ensure accurate quantification, deuterated PAHs (acenaphthene-d10, phenanthrene-d10, and chrysene-d12) were added as surrogate standards. After extraction, samples were concentrated to 1 mL, and additional deuterated PAHs (fluorene-d10, benzo[a]anthracene-d12, and benzo[a]pyrene-d12) were added as internal standards. Extracts were stored at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis, which occurred within two weeks of preparation. Both parent and alkylated PAHs (2-6 rings homologs) were analyzed using a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS). A total of 33 analytes were investigated, with detailed analytical procedures described in previous studies (ARRUDA-SANTOS *et al.*, 2018; DE SOUZA

DIAS DA SILVA *et al.*, 2024; ZANARDI-LAMARDO *et al.*, 2019). Surrogate recoveries ranged from 44.1% to 117.9%, and fortified blank recoveries were between 62% and 101%. These values are within acceptable limits according to Lauenstein (1998). The limit of quantification (LOQ) for all analytes was determined as the ratio of the lowest concentration at analytical curve and the volume analyzed, resulting in 1 ng L⁻¹. Diagnostic ratios to distinguish petrogenic or pyrogenic sources followed GHETU *et al.* (2021).

1.2.4 Mortality and General Morphology Score

General Morphology Score (GMS) is an index that evaluates the morphological development of fundamental structures for a healthy *Danio rerio* embryo/larva. The original GMS evaluates the *Danio rerio* development from 24 to 96 hpf (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015), however in this study the GMS index was evaluated following LI *et al.* (2019), which evaluates from 24 to 120 hpf. This new index includes the presence of otolith at 24 hpf, presence of optomotor movement at 96 hpf, the displacement of the yolk sac absorption assessment from 96 hpf to 120 hpf, caudal movement at 120 hpf, and the swim bladder at 120 hpf. The data are arranged in the maximum-minimum system where all the data are distributed between the highest and the lowest scores found. This put the data on a scale 0-100%, where the closer the value is to zero, the smaller the change in development, and the closer to 100, the greater the delay in the development of the embryos. Mortality was evaluated during the entire exposure period, and considered when the individual coagulates, does not develop somites, the tail not detached of yolk sac, and/or heart rate is absent from 48 hpf OECD (2013).

1.2.5 General Teratology Score and pathology

General Teratology Score (GTS) index was created for this study based on the survey of the most common pathologies in *Danio rerio* (VON HELLFELD *et al.* (2020), and the daily scoring system is based on LI *et al.* (2019). The embryo/larvae with any of the pathologies at any time receives 1 point and, if the pathology remains the next day, it receives another point. The animal will continue to score until the end of the experiment if there is no recovery. The score over the days of exposure was added at the end of the exposure time. The GTS values are converted into a minimum - maximum scale, considering the minimum - maximum score determined within the data matrix. The GTS calculated in this study was up to 120 hpf. The main pathologies values were ratio between the number of organisms with the pathology to the number of organisms alive on the specific day. The final values were added

and divided by the number of exposure days (5 days). Those pathologies found were arranged in a table with the average percentage obtained from the entire experiment.

1.2.6 Heart rate

Heart rate measurements were taken at 72 hpf in 10 larvae from each treatment group. Observations were conducted using an inverted microscope (DIGILAB®) at a 20X magnification. Ventricular contractions were counted for 30 seconds using a stopwatch and counter. Heart rate was calculated as beats per minute (bpm).

1.2.7 Morphometric measurement

Morphometric measurements were assessed using a Stemi 2000 C stereomicroscope (Zeiss®) at a 20X magnification. The vertical and horizontal diameters of the swim bladder were measured with an accuracy of 0.1 mm using AxioVision (Zeiss®) software. The swim bladder and eyes areas were calculated using the following equation:

$$\text{Ellipse area} = (\text{Vertical diameter}/2) \times (\text{Horizontal diameter}/2) \times (3.1415)$$

1.2.8 Biochemistry assessment

1.2.8.1 Homogenate production and protein quantification

Each treatment had 4 representative pools of 40 larvae exposed on 6-well culture cells plates with 10 mL of WAF and daily changes of 8 mL. The plates used for biochemistry had the same sun exposure system already described. Pools were homogenized with 300 µL of PBS buffer (0.15 M, pH 7.4) using a mechanical homogenizer and pistil. The samples were centrifuged at 12000g, for 30 min at 4 °C. Protein quantification was performed using the Bradford total protein evaluation method, using a protein curve with $r^2 > 0.99$ (BRADFORD, 1976).

1.2.8.2 Glutathione-S-transferase (GST)

GST enzyme activity assessment was determined according to HABIG *et al.* (1974). A total of 5 µL of homogenate and 200 µL of a GST mix (Ultra-pure water, KPI buffer 0.25 M, and GSH 100 mM) were added to duplicate wells of 96-well plates. Following baseline reading, the substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) in ethanol was added and absorbance measured at a 340 nm wavelength at a temperature of 25 °C. GST activity was quantified using the molar absorptivity coefficient ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the activity expressed in $\mu\text{mol CDNB min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$.

1.4.1.1 Total glutathione (GSH)

Total GSH level was adapted to microplate following the method of BEUTLER *et al.* (1963). An aliquot of the sample was homogenized with trichloroacetic acid (TCA) 6% at a ratio of 1:1 (v:v), and then centrifuged at 900g for 5 min at 4 °C. After centrifugation, the homogenate was mixed with 2.2 mM 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) in KPI (0.1 M, pH 7.4) solution on duplicate wells of a 96-well plate. The glutathione (GSH) conjugated with 2.2 mM DTNB, forming thiolate (TNB), which was detected at a wavelength of 412 nm at 25 °C. Concentrations were expressed as $\mu\text{g GSH mg protein}^{-1}$.

1.4.1.2 Reactive oxygen species (ROS)

ROS was determined in duplicate using the protocol described by ZHAO *et al.* (2013). In a black 96-well plate for fluorescence, aliquots of 20 μL of each sample were mixed with 100 μL of PBS (0.15 M, pH 7.4), and 8.3 μL of 2,7- dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) at 1 mg mL^{-1} in dimethyl sulfoxide (DMSO) with subsequent incubation of the plate for 30 min at 37 °C. After that, fluorescence was assessed in relative fluorescence units (RFU) with excitation/emission wavelengths of 485/520 nm, respectively, at a temperature of 25 °C. ROS was expressed as fluorescence measured in exposed samples relative to controls (% control RFU mg protein^{-1}).

1.4.1.3 Superoxide dismutase (SOD)

The SOD enzyme activity assessed was established by MARKLUND *et al.* (1974), adapted to microplates (MAHARAJAN *et al.*, 2018). SOD assay is based on the pyrogallol autooxidation inhibition that occurs at alkaline pH. In a microplate of 96-wells were added 140 μL of buffer (tris-HCl 0.05 M and EDTA 1 mM, pH 8.5), 52.5 μL of sample, 52.5 μL of water. The assay followed with a baseline assessed at 420 nm. After baseline evaluated, 35 μL of 6 mM pyrogallol solution diluted in 0.05 M HCl and the absorbance was assessed again on the same wavelength. Enzyme activity was expressed in units of SOD ($\text{U SOD min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$).

1.4.1.4 Catalase (CAT)

The activity of the enzyme catalase was performed following the method of BEERS *et al.* (1952) adapted to microplates (LI, YI *et al.* (2007)). The test was performed using 5 μL of sample and 250 μL of the reaction mix (KPI 0.5 M, pH 7.4 and 0.15 mM H_2O_2) on a translucent UV reading plate. The reaction was quantified by absorbance at 240 nm in the fluorimeter spectrum (SpectraMax® M3) and quantifying the consumption of the (H_2O_2) was

calculated based on the molar absorptivity coefficient ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The activity values were expressed in ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$).

1.4.1.5 Lipid Peroxidation (LPO)

The quantification of lipid peroxidation followed the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method following UTLEY *et al.* (1967) with adaption established by ADEYEMI *et al.* (2014). LPO quantification was performed using a mix of 20 μL of homogenate, 160 μL of PBS buffer (0.15 M, pH 7.4), 10 μL of butylated hydroxytoluene (BHT), and 50 μL of 50% trichloroacetic acid (TCA), and the baseline fluorescence reading was performed in the spectrum (SpectraMax® M3) at excitation/emission of 535/590 nm. After this procedure, 75 μL of 1.3% thiobarbituric acid (TBA) was added and the plate was incubated at 60 °C for 60 min. Then a new assessment was done in the spectrum with same wavelength. The fluorescence values obtained were applied to the MDA analytical curve $r^2 > 0.99$. The values were quantified in ($\mu\text{M MDA mg protein}^{-1}$).

1.2.9 Statistical evaluation

The effective concentrations (EC) and lethal concentration (LC) for 50% or 20% of the exposed organisms were calculated based on the logistic model using the DRC package in the R version software 4.0.2 (RITZ *et al.*, 2016). Biochemical biomarkers, GTS index, GMS index, heart rate, morphometric and biochemical measurements were analyzed by ANOVA when the data were normal and homoscedastic, or by Kruskal-Wallis (KW) when normality or homoscedasticity failed. Normality was verified by the Shapiro-Wilks test and homoscedasticity by the Levene median test. When differences were detected, multiple comparison tests using Dunnett (ANOVA) or Dunn (Kruskal Wallis) were used to assess differences between different treatments and controls using the Sigmaplot 12.0 software (Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Frequencies of pathologies were compared with the control using the two-sample t test for proportions using the Statistic Calculator software (StatPac, Northfield, USA).

1.3 RESULTS

1.3.1 Oil water accommodated fraction preparation and chemical analysis

The total PAHs (alkylated PAHs + parental PAHs expressed as ΣPAHt) concentration in the 100% WAF was $32.95 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$. Most of them (77.6%) were alkylated PAHs (ΣPAHa) (Table 1). The relative distribution of PAH showed a predominance of two and three -rings compounds (46.5% and 48.4%, respectively) (Fig. S2). In addition, the

distribution reveals a clear bell shape among parent and homologous alkylated PAH, typical of petroleum oils well preserved or little degradation.

1.3.2 UV radiation measurement

The UV-A and UV-B doses for the first day of sunlight exposure (48 hpf- 5h exposure) were 349.4 and 10.3 KJ m⁻², respectively, and on the second day (72 hpf- 5h exposure) it was 253.5 and 7.6 KJ m⁻², respectively. The irradiance per hour was 465.8 and 13.7 Wh m⁻² of UV-A and UV-B at 48 hpf, respectively, and 388.1 and 10.1 Wh m⁻² of UV-A and UV-B at 72 hpf, respectively. The total exposure value during the 10 h were 4019.4 and 119.1 Wh m⁻² of UV-A and UV-B, respectively.

1.3.3 Mortality and General Morphology Score

The mortality of embryos exposed to WAF (32.95 µg-ΣPAHt L⁻¹) was 25% at 168 hpf (Table S1). Embryos exposed to the natural UV sunlight at the same concentration presented 100% mortality 24 h after the first battery of 5 h of sunlight exposure at 72 hpf (Table S1) and the other concentrations tested in the WAF-UV experiment also had relevant mortality. The lethal concentration for 50% (LC50) and for 20% (LC20) of the organisms were calculated resulting in LC50_{120hpf} = 10.45 ± 0.63 µg-ΣPAHt L⁻¹ (estimated value ± standard error) for the WAF-UV exposed organisms; LC20_{168hpf} = 29.11 ± 5.83 µg-ΣPAHt L⁻¹ for WAF and LC20_{168hpf} = 8.416 ± 0.66 µg-ΣPAHt L⁻¹ for WAF-UV experiments.

The low observed effect concentration (LOEC) for GMS in WAF-UV was 2.06 µg-ΣPAHt L⁻¹ (Fig.1A), while the larvae exposed to WAF had LOEC of 8.24 µg-ΣPAHt L⁻¹ (Fig.1B). The evaluation of the effect concentration for 20% of the organisms exposed (EC20) for the larvae exposed to WAF was EC20_{120hpf} = 15.94 ± 2.04 µg-ΣPAHt L⁻¹, while for the larvae exposed to WAF-UV it was twice as low EC20_{120hpf} = 7.00 ± 1.01 µg-ΣPAHt L⁻¹. Delayed endpoints were observed, except for absence of pectoral fin, absence of heartbeat, and absence of somites that did not present altered values (Table 2).

Table 1. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons concentrations (PAH) in oil water accommodated fractions (WAF) from oil samples collected at Paiva Beach.

Analitos	n-Ar	$\mu\text{g L}^{-1}$	% dentro de $\sum \text{HPAt}$
Naftaleno	2	0.065	0.2%
1-Metilnaftaleno	2	1.10	3.2%
2-Metilnaftaleno	2	1.53	4.4%
C1 Naftalenos	2	2.63	7.6%
C2 Naftalenos	2	7.07	20.5%
C3 Naftalenos	2	4.04	11.7%
C4 Naftalenos	2	1.12	3.2%
Acenaftileno	2	0.003	0.0%
Acenafteno	2	0.399	1.2%
Fluoreno	2	0.813	2.4%
C1 Fluorenos	2	2.12	6.2%
C2 Fluorenos	2	2.24	6.5%
C3 Fluorenos	2	1.14	3.3%
Fenantreno	3	5.58	16.2%
Antraceno	3	0.172	0.5%
C1 Fenantrenos + Antracenos	3	2.20	6.4%
C2 Fenantrenos + Antracenos	3	0.988	2.9%
C3 Fenantrenos + Antracenos	3	0.473	1.4%
C4 Fenantrenos + Antracenos	3	0.219	0.6%
Fluoranteno	3	0.054	0.2%
Pireno	4	0.139	0.4%
C1 Fluorantenos + Pirenos	4	0.308	0.9%
C2 Fluorantenos + Pirenos	4	0.319	0.9%
C3 Fluorantenos + Pirenos	4	0.249	0.7%
Benzo[a]antraceno	4	0.023	0.1%
Criseno	4	0.093	0.3%
C1 Benzo[a]antracenos + Crisenos	4	0.177	0.5%
C2 Benzo[a]antracenos + Crisenos	4	0.180	0.5%
C3 Benzo[a]antracenos + Crisenos	4	0.119	0.3%
Benzo[b]fluoranteno	4	0.004	0.0%
Benzo[k]fluoranteno	4	0.010	0.0%
Benzo[a]pireno	5	0.006	0.0%
Dibenzo[a,h]antraceno	5	0.003	0.0%
Indeno[1,2,3-cd]pireno	5	ND	ND
Benzo[ghi]perileno	6	0.004	0.0%
$\sum \text{HPAp}$			7.36
$\sum \text{HPAa}$			27.07
$\sum \text{HPAt}$			34.43
$\sum \text{LHPA}$			33.94
$\sum \text{HHPA}$			1.63
Razão LHPA/HHPA > 2.3 *			25.09
Razão alquilado/parental HPA > 2.3 *			3.68
Razão Ant/Ant + Fen < 0.1*			0.03
Razão Flu/Flu + Pir < 0.4*			0.28
Razão C1-C4 Naftaleno/ $\sum \text{HPAt}$			0.43

n-Ar: number of aromatic rings in molecules. ND: not detected. LPAH: Low molecular weight PAHs, HPAH: High molecular weight PAHs. Ant: Anthracene, Phe; Phenanthrene, Flu; Fluoranthene, Pyr; Pyrene.

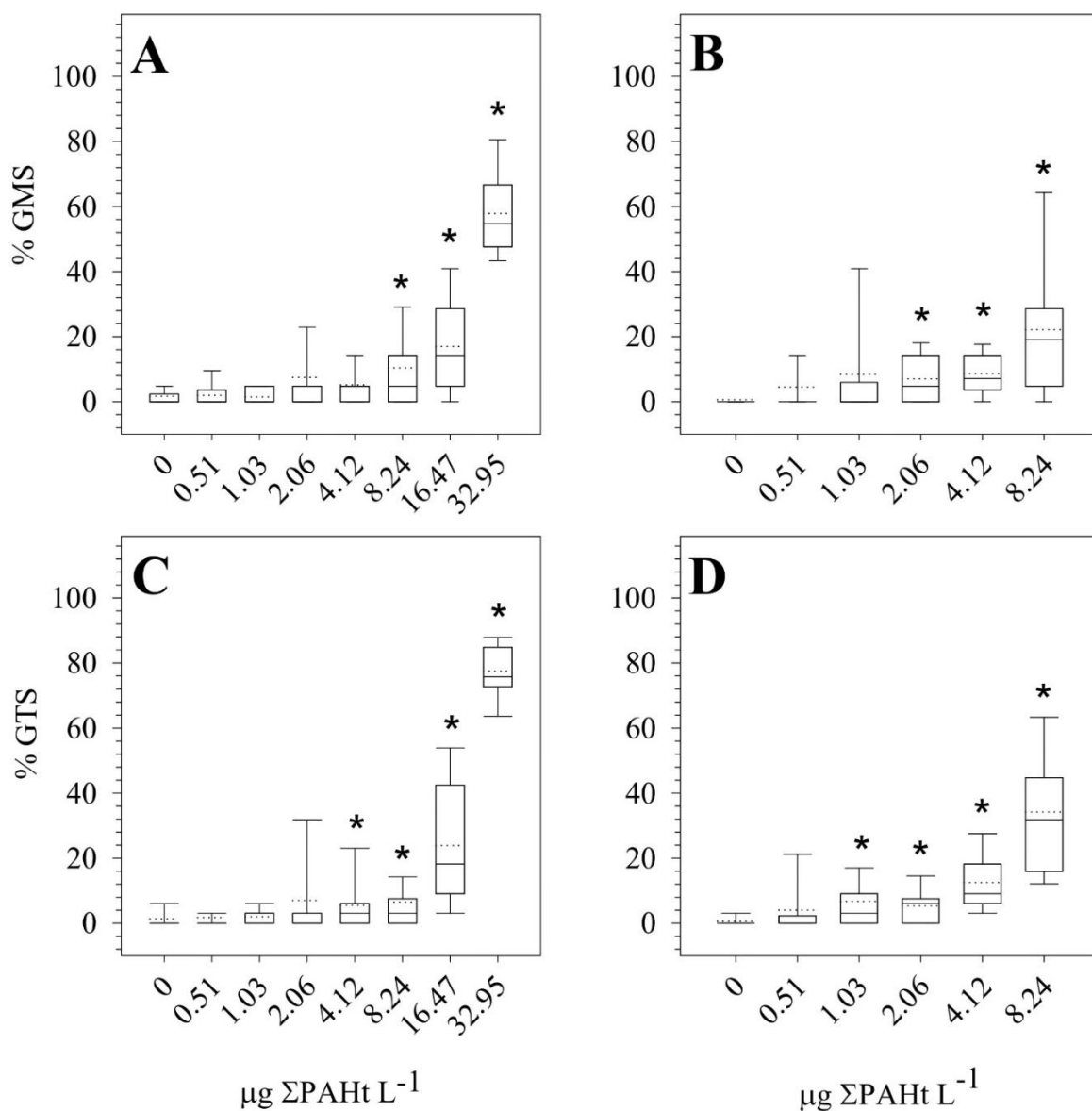


Fig. 1. GMS and GTS indices of *Danio rerio* 120 hpf embryos/larva exposed to WAF dilutions. A: GMS of larvae exposed to FSA; B: GMS of larvae exposed to WAF-UV; C: GTS of larvae exposed to WAF and D: GTS of larvae exposed to WAF-UV. Box plot dashed horizontal lines indicate mean values, and box plot continuous horizontal lines (lower, middle, and upper) indicate quartiles of 25, 50 (median), and 75 %, respectively.

A: (KW, $H = 95.59$, $p \leq 0.001$, Dunn, $p < 0.05$); B (KW, $H = 57.20$, $p \leq 0.001$, Dunn, $p < 0.05$); C: (KW, $H = 109.31$, $p \leq 0.001$, Dunn, $p < 0.05$); D: (KW, $H = 89.48$, $p \leq 0.001$, Dunn, $p < 0.05$).

(*): Statistical difference when compared to the control group (0 µg-ΣPAHt L⁻¹).

Table 2. GMS index details are from 24 to 120 hpf. Frequency (%) of endpoint absence in *Danio rerio* larvae 120 hpf after exposure to different PAH concentrations of oil water accommodated fractions (WAF) from oil samples.

	120	24-120 ^a	24-120	24-120	24-120	24-120	48-120	48-120	72-120	120	72-120	120	
	$\mu\text{g L}^{-1}$ ΣPAHt	N at	Yolk sac tail detachment	Eye development alteration	Otolith lack	Embryo movement and tail beat lack	Blood stasis	Head and body pigment lack	Tail pigment lack	Hatch absent	Yolk sack absorption lack	Mouth development delay	Swim bladder lack
WAF	0	47	0	0	0	2.1	8.5	2.1	0	19.1	4.3	4.3	4.3
	0.51	24	0	4.2	0	0	16.7	0	0	16.7	0	0	4.2
	1.03	23	4.3	4.3	0	4.3	17.4	4.3	0	8.7	4.3	4.3	0
	2.06	23	13	17.4	8.7	4.3	21.7	13	0	13	4.3	17.4	17.4
	4.12	23	0	0	0	8.7	13	47.8	0	4.3	4.3	4.3	4.3
	8.24	23	8.7	4.3	8.7	30.4	17.4	47.8	0	17.4	8.7	17.4	21.7
	16.47	23	4.3	13	17.4	17.4	34.8	34.8	8.7	13	21.7	39.1	65.2
	32.95	20	40	40	30	40	50	10	0	40	90	85	95
WAF-UV	0	47	0	0	0	0	4.3	4.3	0	0	0	0	2.1
	0.51	23	4.3	4.3	8.7	4.3	17.4	4.3	0	8.7	0	0	17.4
	1.03	23	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	0	0	4.3	8.7	13
	2.06	23	4.3	8.7	4.3	8.7	17.4	26.1	0	0	8.7	26.1	13
	4.12	22	9.1	9.1	9.1	31.8	22.7	31.8	0	4.5	13.6	13.6	22.7
	8.24	20	20	10	15	20	20	10	0	5	65	35	60

^a, Assessment time in hours post-fertilization; Bold, indicates statistically significant differences between treatments compared to the control (0 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$). (t-test, $p < 0.05$)

1.3.4 General Teratology Score and pathology

The WAF LOEC for the GTS index was 4.12 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (Fig.1C), while for the WAF-UV 1.03 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (Fig.1D). WAF-UV LOEC was four times lower than the embryos that were not exposed just to WAF. The EC20 found for the embryos exposed just to WAF was three times lower 15.94 $\pm$ 2.04 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ than WAF-UV 5.19 $\pm$ 0.5 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$. The pathologies that contributed most to the significant increases observed in the GTS of embryos exposed to WAF were pericardial edema, yolk sac edema, lack of swim bladder, deformed mouth and unabsorbed yolk sac (Table 3). The pathologies that most influenced GTS in WAF-UV were heart deformation, lack of swim bladder, deformed pectoral and tail fins, and unabsorbed yolk sac, which presented frequencies higher than 50% at 8.24 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (Table 3). The EC50 estimate for malformed hearts, which constitute individuals with heart absence of looping, in embryos exposed to WAF dilutions was 17.86 $\pm$ 0.1 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ and WAF-UV was 6.98 $\pm$ 0.86 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$. The lack of swim bladder had EC50 = 12.84 $\pm$ 1.196 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ for WAF and EC50 = 6.57 $\pm$ 1.39 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ for WAF-UV. The unabsorbed yolk sac presented EC50 = 21.26 $\pm$ 1.51 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ for embryos exposed to WAF and 6.33 $\pm$ 0.42 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ for WAF-UV. Other pathologies that have contributed little to GTS index are available on Table S2 and Table S3.

Table 3. GTS index details are from 24 to 120 hpf. Frequency (%) of developmental abnormalities in *Danio rerio* larvae 120 hpf after exposure to different PAH concentrations of oil water accommodated fractions (WAF) from oil sample.

	ΣPAHt $\mu\text{g L}^{-1}$	N~	Deformed heart	Pericardic edema	Yolk sac edema	Lack of swim bladder	Pectoral fin malformed	Tail malformed	Yolk sac deformation	Unabsorbed Yolk sac	Deformed mouth	Otolith deformation or absence
WAF	0	48	0	4.3	2.1	4.3	2.1	0	0	4.3	0	0
	0.51	24	4.2	4.2	4.2	2.1	0	0	4.2	0	0	0
	1.03	24	0	8.7	0	0	0	4.3	0	4.3	4.3	4.3
	2.06	24	8.7	23.9	0	17.4	8.7	13	4.3	13	8.7	4.3
	4.12	24	4.3	8.7	4.3	4.3	4.3	0	4.3	0	4.3	0
	8.24	24	4.3	28.3	0	21.7	4.3	7.6	6.5	8.7	10.9	7.2
	16.47	24	18.3	34.8	30.4	65.2	5.8	4.3	13	21.7	18.8	12
	32.95	24	52	80.4	97.5	100	36	23.9	29.8	90	88.4	47.7
WAF-UV	0	48	0	4.3	0	4.3	0	0	0	0	0	0
	0.51	24	0	7.2	4.3	17.4	6.5	4.3	0	0	0	4.3
	1.03	24	21.7	14.5	6.5	13	8.7	13	4.3	4.3	10.1	5.8
	2.06	24	4.3	10.9	8.7	13	15.9	10.9	4.3	13	4.3	4.3
	4.12	24	13	18.9	0	22.7	28.7	28.3	6	18.2	8.7	6.5
	8.24	24	64	36.8	34.3	65	83.4	51.3	18.3	70	18.8	12

Bold indicates statistically significant differences between treatments compared to the control (0 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$). (t-test, $p < 0.05$)

1.3.5 Heart rate

The LOEC found for organisms exposed to WAF was $8.24 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, while organisms exposed to WAF-UV was $4.12 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (Fig. 2). Embryos exposed to WAF-UV 8.24 and $16.47 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ had a lower heart rate than animals exposed to the same WAF treatments (ANOVA, $F = 23.96$, $p < 0.001$, Tukey, $p < 0.05$).

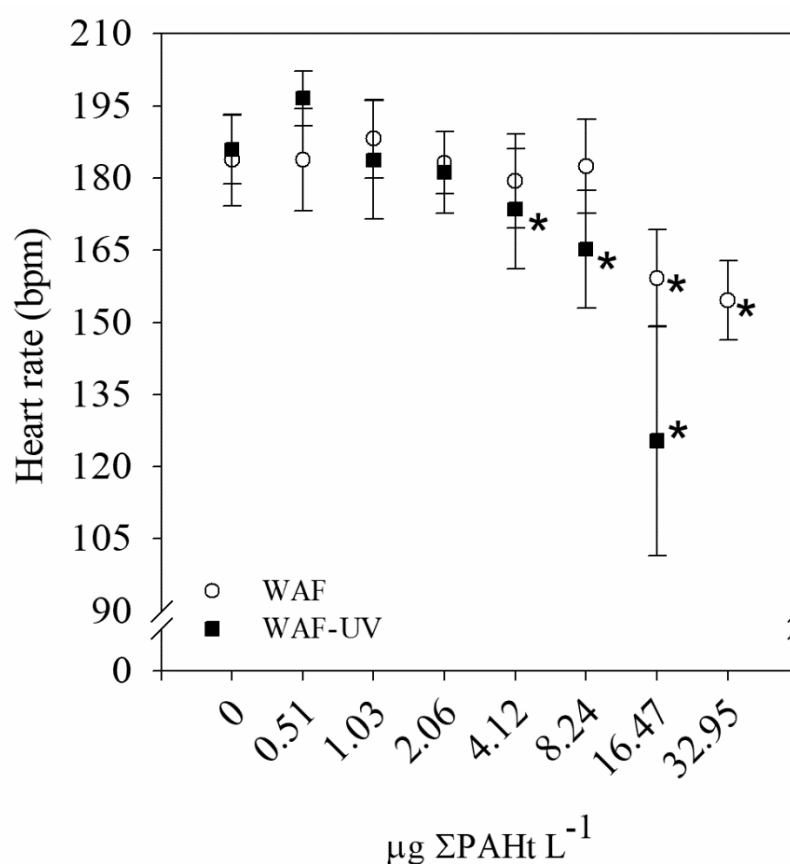


Fig. 2. Frequency of ventricular contractions (mean and standard deviation) quantified in *Danio rerio* 72 hpf larvae exposed to different PAH concentrations of oil water accommodated fractions (WAF) and WAF-UV. (*) Statistically significant difference compared to Control ($0 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$).

A: WAF, (ANOVA, $F=19.46$, $p<0.001$, Dunnett, $p<0.05$);
 B WAF-UV, (ANOVA, $F=30.60$, $p<0.001$, Dunnett, $p<0.05$).

1.3.6 Morphometric measurement

The total length of larvae exposed to WAF and WAF-UV decreased at 168 hpf and presented LOEC of 16.47 and $2.06 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectively (Fig. 3A). The eye area of the larvae presented an LOEC of 8.24 and $0.51 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ for the larvae exposed to WAF and WAF-UV, respectively (Fig. 3B). A statistical reduction in the swim bladder area was observed in larvae exposed to WAF from $8.24 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ treatment (Fig. 3C).

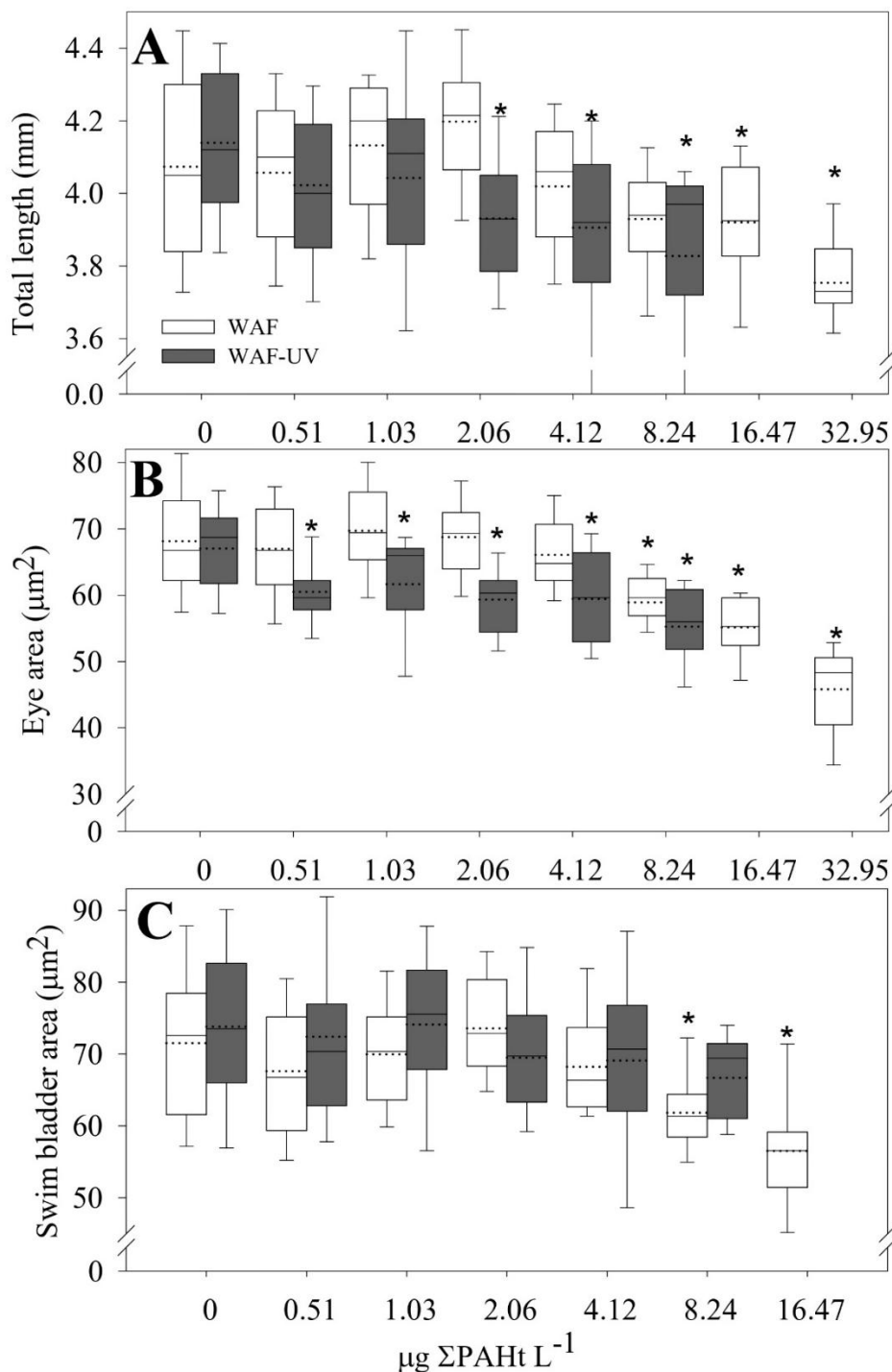


Fig. 3. Morphometric measurements assessed in *Danio rerio* larvae 168 hpf exposed to different WAF and WAF-UV dilutions. A: Total length larvae 168 hpf; B: Eye area 168 hpf and C: Swim bladder area 168 hpf. Box plot dashed horizontal lines indicate mean values, and box plot continuous horizontal lines (lower, middle, and upper) indicate quartiles of 25, 50 (median), and 75 %, respectively.

A: WAF ANOVA, $F = 9.16$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$, WAF-UV KW, $H = 26.58$, $p \leq 0.001$, Dunn, $p < 0.05$;

B: WAF KW, $H = 96.82$, $p \leq 0.001$, Dunn, $p < 0.05$, WAF-UV ANOVA, $F = 9.15$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$;

C: WAF KW, $H = 35.58$, $p \leq 0.001$, Dunn, $p < 0.05$, WAF-UV ANOVA, $F = 1.41$, $p = 0.224$.

(*): Statistical difference when compared to the control group (0 $\mu\text{g } \Sigma\text{PAHt L}^{-1}$).

1.3.7 Biochemistry assessment

GST activity enzyme was statistically induced in embryos exposed to WAF 16.47 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (ANOVA, $F = 36.76$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$), while organisms exposed to WAF-UV were induced in 4.12 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (ANOVA, $F = 22.24$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$), compared to their respectively control (Fig. 4A). An induction was observed in larvae exposed to 4.12 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ of WAF-UV compared to larvae of the same treatment in WAF only (ANOVA, $F=28.29$, $p<0.001$, Tukey, $p<0.05$). Despite this, GSH concentrations did not present statistical differences compared to the control or between experiments (ANOVA, $F=3.82$, $p=0.01$, Tukey, $p<0.05$) (Fig. 4B).

ROS levels and SOD activity were statistically higher in organisms exposed to WAF 16.47 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (ANOVA, $F = 20.88$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$ and ANOVA, $F = 24.13$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$, respectively). Larvae exposed to WAF-UV presented a reduction in ROS levels and SOD activity in lower PAH concentration (4.12 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, ANOVA, $F = 4.57$, $p = 0.043$, Dunnett, $p < 0.05$ and ANOVA, $F = 7.53$, $p = 0.012$, Dunnett, $p < 0.05$) (Fig. 4C; 4D). The evaluation of both experiments among similar treatments did not show statistical differences (ANOVA, $F=21.28$, $p<0.001$, Tukey, $p<0.05$).

CAT activity was induced in WAF 16.47 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (ANOVA, $F = 13.78$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$), while the organisms exposed to WAF-UV did not present differences compared to the control (ANOVA, $F = 2.20$, $p = 0.167$) (Fig. 4E). Larvae compared between experimental situations did not present alterations (ANOVA, $F = 8.99$, $p < 0.001$, Tukey, $p < 0.05$).

LPO levels were reduced in organisms exposed to a WAF 16.47 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (ANOVA, $F = 15.83$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$), while organisms exposed to WAF-UV 4.12 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ presented an LPO level increase (ANOVA, $F=7.53$, $p=0.012$, Dunnett, $p<0.05$) (Fig. 4F). The comparison between similar treatments showed no statistical alterations (ANOVA, $F = 11.98$, $p < 0.001$, Tukey, $p < 0.05$).

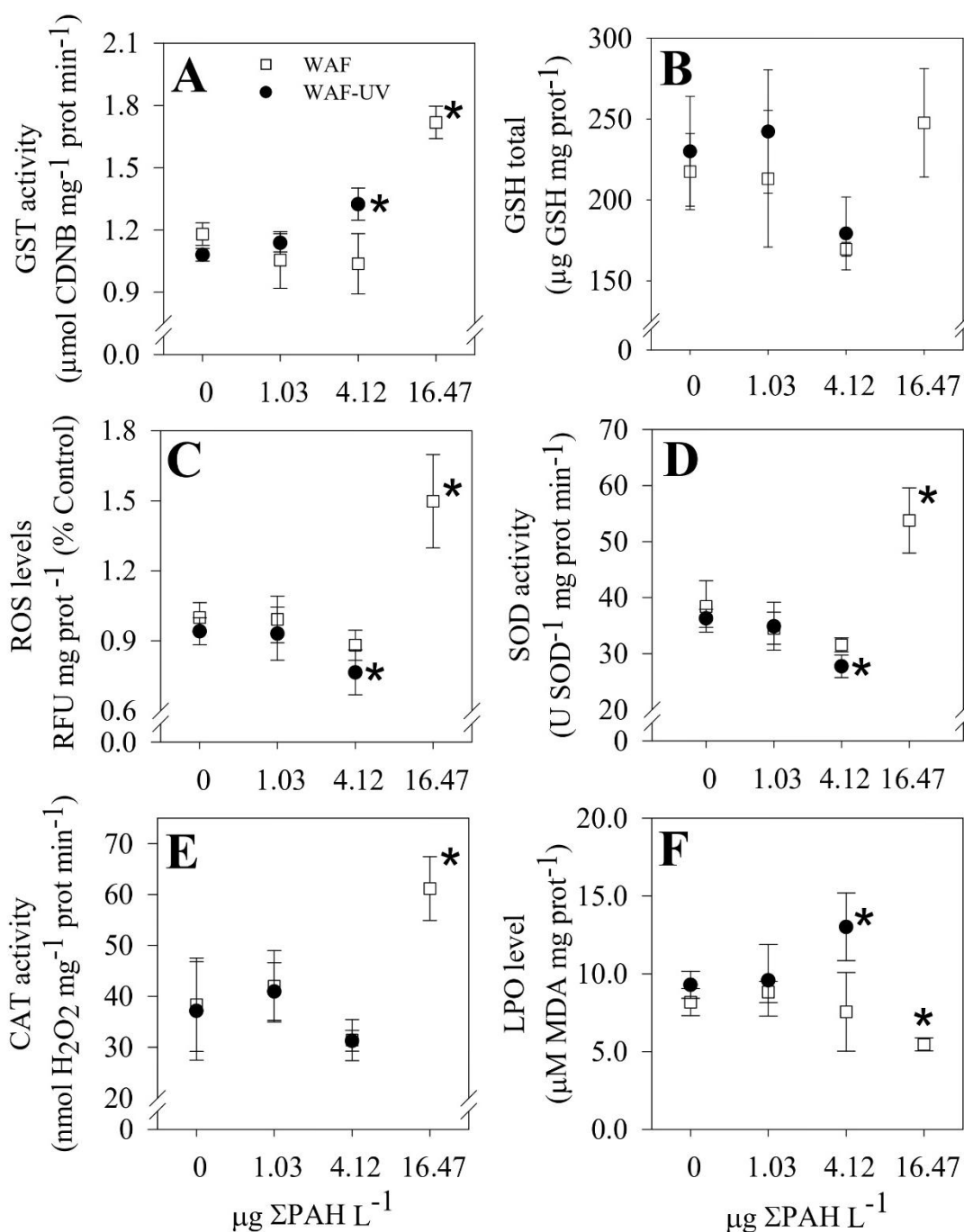


Fig. 4. Biochemical analyses performed on *Danio rerio* 120 hpf larvae exposed to dilutions of WAF and WAF-UV. A: GST enzyme activity; B: total GSH levels; C: ROS levels; D: Activity of the SOD enzyme; E: Activity of the enzyme CAT and F: LPO levels.

(*): Statistical difference when compared to the control group (0 µg-ΣPAHt L⁻¹).

1.4 DISCUSSION

The emulsified oil that arrived on the Brazilian coast had a great toxic potential (MARIZ JR *et al.* (2024). An increase in its toxicity is expected when under UV radiation, as demonstrated by the significant alterations in organisms exposed to WAF-UV compared to

those exposed only to WAF. Larvae exposed to WAF presented a $LC_{20_{168hpf}} = 29.11 \pm 5.83 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, while the organisms exposed WAF-UV presented a much lower $LC_{20_{168hpf}} = 8.416 \pm 0.66 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$. Embryonic development delays assessed by GMS, pathology development assessed by GTS, and heart rate presented a fourfold reduction in LOEC in ELS exposed to WAF-UV. Other endpoints such as total length and eye area had their LOECs reduced by eight and sixteen times in ELS exposed to WAF-UV, respectively. Photoenhanced toxicity is the twofold to greater than 1000-fold increase in toxicity of a chemical in the presence of UV light compared to normal condition (BARRON, 2017; WILLIS *et al.*, 2014).

PAH with high molecular weight (3-5 ring PAHs and heterocycles) are primarily responsible for petroleum's enhanced toxicity under UV light, however alkyl PAHs have no effect or increase the degree of photoenhanced toxicity (BARRON, 2017; FINCH, 2015). Larger conjugated μ -orbital systems absorb light at longer wavelengths, with four-or-more-ring PAHs showing greater absorption than two-or-three-ring PAHs (WANG *et al.*, 2007). Benzo[b]fluoranthene, fluoranthene, naphthalene, phenanthrene, and dibenz[a,h]anthracene have been shown no photomutagenic activity to bacteria (FU *et al.*, 2012). Furthermore, Two-or-three-ring PAHs, except anthracene, lack acute photocytotoxicity to human skin cells, while four-or-more-ring PAHs are generally photocytotoxic, excluding chrysene and benzo[k]fluoranthene (WANG *et al.*, 2007). The WAF used in this study was dominated by compounds with 2- 3 rings PAHs, where two and Three rings PAH represents $31.26 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$. Despite that, $1.69 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ are four-or-more-ring PAHs that could be them toxicity photoenhanced. Among 2- 3 rings PAHs in WAF used in this study, 18% is phenanthrene that has a significantly lower phototoxic development, with a twice increase and its toxic potential under UV radiation, on the other hand, anthracene and pyrene photoenhance their toxic potential by 18 and 26 times, respectively (WILLIS *et al.*, 2014). Therefore, it is plausible to conclude that the toxicity observed in this study was related to the low PAH concentrations of 3-6 rings PAHs, even though at low concentrations.

After the exposure period under sunlight, an increase in the mortality rate of organisms exposed to higher concentrations of WAF-UV was observed. At the end of the 168 hpf experiment period, the LC_{50} verified for the *Danio rerio* ELS was $9.6 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ to WAF-UV treatments. A $LC_{50} = 3.42 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ was calculated for newly hatched larvae of *Sciaenops ocellatus* and $LC_{50} = 0.827 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ for *Cynoscion nebulosus*, after exposed to WAF from the weathered oil of the Deepwater Horizon (DWH) accident (ALLOY *et al.*, 2017). This suggests that those organisms are more sensitive to combining WAF + UV

radiation than *D. rerio* or the unknown degradation period may turn the oil much more toxic. In a similar experiment the LC50 for *Melanogrammus aeglefinus* larvae was 0.241 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ (SØRHUS *et al.*, 2022), suggesting that *Danio rerio* ELS is more resistant than marine fish larvae.

The embryo development delay in organisms exposed to PAH mixtures demonstrate a clear sensitivity of *Danio rerio* to these compounds disregarding solar radiation (ALVES *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019). The exposure to solar radiation is an important factor to increase the toxic potential as observed to GMS (EC20 decreased two times). The morphological structures most delayed were mouth development, uninflated swim bladder and lack of yolk sac absorption, in addition to embryonic movement and blood circulation (Table 2). The greatest delay in embryonic development seen in *Danio rerio* larvae exposed to WAF-UV is mainly due to the translucent condition of these organisms. These results point out that photoenhanced toxicity should be considered in risk management of oil spills due to the vulnerability of transparent pelagic fish embryos and larvae, often found near the surface (ARANGUREN-ABADÍA *et al.*, 2022).

The swim bladder is a fundamental organ for the maintenance of fish in the water column. It is known that swim bladder tissues are compromised in larvae exposed from 4.49 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, which is directly related to the absence of the organ at 96 hpf and the reduction of its area (Mariz Jr *et al.*, 2025, submitted). Other factors such as low local hydrodynamics and the physical barrier due to the oil film adhered to the organism are factors that influence the maintenance of the gas inside the organ and the insufflation itself, respectively (PRICE *et al.*, 2020; WINATA *et al.*, 2010). In this study, a 2-fold reduction in the EC50 value uninflated swim bladder of larvae exposed to WAF-UV was observed. Although the swim bladder evaluation is performed at 120 hpf, it has been seen that the effect of combined WAF-UV exposure during the embryonic and larval stages lasts up to 120 hpf.

Fish ELS exposure to crude oil causes a characteristic syndrome of cardiotoxic effects, of which the most prominent and widely reported is pericardiac and yolk sac edema (MAGER *et al.*, 2023). This study demonstrates that in addition to these most common pathologies, there is a significant increase in the absence of cardiac loop (Table 3) and a reduction in cardiac function indicated by the presence of bradycardia in embryos with 72 hpf in WAF and WAF-UV (Fig. 2). A similar situation was found in 284 and 383 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ WAF from Iranian and Alaskan oil that resulted in 44 and 40% absence of cardiac looping in *Danio rerio* 48 hpf, respectively, as well as 43 and 30% reduction of ventricular contractions, respectively

(JUNG *et al.*, 2013). In this study, the absence of cardiac looping observed at 48 hpf was 52 and 64% at concentrations of 32.95 and 8.24 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, of the WAF and WAF-UV, respectively. These results demonstrate not only the high toxic potential of the weathered oil that reached the coast of Brazil, but also the photoinduction of toxicity generated in organisms exposed to WAF-UV. The reduction in heart rate, in turn, was lower than those exposed by (JUNG *et al.*, 2013) where our data show a reduction of 16 and 33% in ventricular contractions in larvae exposed to 32.95 and 8.24 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, from WAF and WAF-UV, respectively. In another study using *Melanogrammus aeglefinus* larvae, it has been seen that only larvae co-exposed to WAF and UV showed changes in cardiac morphology (SØRHUS *et al.*, 2022) while in our work we found in both experimental situations, but more severe with the addition of the UV light.

Bone deformities, such as craniofacial and notochord deformations, as well as the non-absorption of the yolk sack that can delay the development of embryos are factors that can influence the ELS growth (HILTON *et al.*, 2008; INCARDONA *et al.*, 2004b; KAMLER, 2007). The total length evaluation presented LOECs of 16.47 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ and 2.06 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ for organisms exposed to WAF and WAF-UV, respectively. This was a photoinduction of eight-fold. *Danio rerio* 96 hpf exposed to DWH-WAF at 38.5 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ had been shorter than larvae exposed to control, where the WAF used presented a predominance of 3- (>60%) and 4- (>20%) PAHs rings (MAGNUSON *et al.*, 2020). The present study dealt with a mixture predominated by lower PAHs 2 rings >65% 3 rings >28% had a high similarity of results. Furthermore, larvae exposed to WAF-UV had a LOEC of 0.51 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, while organisms exposed only to WAF was 8.24 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, clearly demonstrating a 16-fold increase in the toxic potential of WAF. MAGNUSON *et al.* (2020) found reductions in optomotor activity and eye diameter in *Danio rerio* larvae exposed to 12.8, 38.5 and 64.2 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ of WAF, finding a relationship between eye development and behavior to predatory response.

It was verified that in the larvae exposed to 16.47 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ of WAF there was an induction of the oxidative stress represented by the increase of the antioxidant defenses SOD, CAT and GST, while the ROS concentration increased and the LPO concentration decreased. In larvae exposed to 4.12 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ WAF-UV, there was SOD inhibition, GST induction, followed by a reduction in ROS concentration and an increase in LPO concentration. Larvae exposed to WAF-UV demonstrate an inhibitory or inert response of the main antioxidant defenses, SOD and CAT, which certainly led to increased oxidative damage, represented by

the LPO concentration increase. On the other hand, ROS showed lower concentration at 4.12 $\mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$ WAF-UV, indicating possible activity of other defense pathways or even GST activity induced on the same treatment. However, it is known that biotransformed molecules within the translucent organism when exposed to UV radiation acquire the ability to interact with biomolecules through the oxidative molecule generation, in a process called photosensitization. In this process, the energy transfer to oxygen generates reactive oxygen species, triggering a cascade of lipid peroxidation and cell death, ultimately causing mortality with prolonged exposure (WILLIS *et al.*, 2014).

CONCLUSION

In this study, 2- to 16-fold increases in the toxic potential of WAF for *Danio rerio* early life stages were observed when addicted UV radiation. The LC20 for larvae exposed to WAF-UV was significantly lower, indicating increased mortality after UV exposure. Notably, UV radiation significantly amplified the toxicity of the WAF, resulting in a fourfold reduction in LOEC for developmental delays and heart rate. The dramatic reduction in LOEC for total length and eye area, by eight and sixteen times respectively, further highlights the synergistic impact of UV exposure. The observed absence of cardiac looping, coupled with statistically reduced heart rates, reveals critical physiological disruptions. Furthermore, the induction of oxidative stress, evidenced by biochemical parameters, directly links PAH exposure to increased pathology and developmental delays. The study highlights the potential for photoenhanced toxicity of weathered oil, where UV radiation amplifies the harmful effects of the oil. Furthermore, these findings emphasize the long-term ecological risks associated with weathered oil spills and the heightened vulnerability of early life stages to combined chemical and environmental stressors.

REFERENCES

ADEYEMI, J. A.; ADEWALE, O. O.; OGUMA, A. Y. Mortality, Oxidative Stress and Hepatotoxicity in Juvenile African Catfish, *Clarias gariepinus* Burchell, Exposed to Lead and Cypermethrin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92, n. 5, p. 529-533, 2014/05/01 2014.

ALLOY, M.; GARNER, T. R.; BRIDGES, K.; MANSFIELD, C. *et al.* Co-exposure to sunlight enhances the toxicity of naturally weathered Deepwater Horizon oil to early lifestage red drum (*Sciaenops ocellatus*) and speckled seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Environ Toxicol Chem*, 36, n. 3, p. 780-785, Mar 2017.

ALVES, M.; FREIRE MARIZ JR, C.; MELO, T.; ALVES, R. *et al.* **Oil Spill Impact on Brazilian Coral Reefs Based on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contamination,**

Biliary Bioconcentration and Enzymatic Biomarkers in Damselfish *Stegastes Fuscus*. 2024.

ALVES, R. N.; AGUSTÍ, S. Effect of ultraviolet radiation (UVR) on the life stages of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 30, n. 2, p. 335-372, 2020/06/01 2020.

ALVES, R. N.; MARIZ JR, C. F.; PAULO, D. V. d.; CARVALHO, P. S. M. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere*, 178, p. 224-230, 7// 2017.

ARANGUREN-ABADÍA, L.; YADETIE, F.; DONALD, C. E.; SØRHUS, E. *et al.* Photo-enhanced toxicity of crude oil on early developmental stages of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Science of The Total Environment*, 807, p. 150697, 2022/02/10/ 2022.

ARRUDA-SANTOS, R. H. d.; SCHETTINI, C. A. F.; YOGUI, G. T.; MACIEL, D. C. *et al.* Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. *Science of The Total Environment*, 624, p. 935-944, 2018/05/15/ 2018.

BARRON, M. G. Photoenhanced Toxicity of Petroleum to Aquatic Invertebrates and Fish. *Arch Environ Contam Toxicol*, 73, n. 1, p. 40-46, Jul 2017.

BEEKHUIJZEN, M.; DE KONING, C.; FLORES-GUILLÉN, M. E.; DE VRIES-BUITENWEG, S. *et al.* From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology*, 56, p. 64-76, 2015.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of biological chemistry*, 195, n. 1, p. 133-140, 1952/03// 1952.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, p. 882-888, May 1963.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07/ 1976.

BRUSSAARD, C. P. D.; PEPERZAK, L.; BEGGAH, S.; WICK, L. Y. *et al.* Immediate ecotoxicological effects of short-lived oil spills on marine biota. *Nature Communications*, 7, n. 1, p. 11206, 2016/04/04 2016.

CRAVEIRO, N.; DE ALMEIDA ALVES, R. V.; DA SILVA, J. M.; VASCONCELOS, E. *et al.* Immediate effects of the 2019 oil spill on the macrobenthic fauna associated with macroalgae on the tropical coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 165, p. 112107, 2021/04/01/ 2021.

DE SOUZA, C. S.; DE OLIVEIRA MAFALDA, P.; DE KIKUCHI, R. K. P.; DOMINGUEZ, J. M. L. Assessment of the Brazilian Coast Oil Spill Impact in the fish eggs and larvae development from the Tropical Continental Shelf. *Regional Studies in Marine Science*, 56, p. 102635, 2022/11/01/ 2022.

DE SOUZA DIAS DA SILVA, M. F.; ZANARDI-LAMARDO, E.; VALCARCEL ROJAS, L. A.; DE OLIVEIRA ALVES, M. D. *et al.* Traces of oil in sea turtle feces. *Marine Pollution Bulletin*, 200, p. 116088, 2024/03/01/ 2024.

FINCH, B. E. Photo-enhanced Toxicity of Oil Constituents and Corexit 9500 to Gulf of Mexico Marine Organisms. 2015. Dissertation -, Oregon State University. Acesso em: 2020-02-19.

FU, P. P.; XIA, Q.; SUN, X.; YU, H. Phototoxicity and Environmental Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)—Light-Induced Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and DNA Damage. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 30, n. 1, p. 1-41, 2012/01/01 2012.

GHETU, C. C.; SCOTT, R. P.; WILSON, G.; LIU-MAY, R. *et al.* Improvements in identification and quantitation of alkylated PAHs and forensic ratio sourcing. *Anal Bioanal Chem*, 413, n. 6, p. 1651-1664, Mar 2021.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. *Journal of Biological Chemistry*, 249, n. 22, p. 7130-7139, November 25, 1974 1974.

HILTON, Z.; POORTENAAR, C. W.; SEWELL, M. A. Lipid and protein utilisation during early development of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Marine Biology*, 154, n. 5, p. 855-865, 2008/06/01 2008.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity in early life history stages of fish. *Marine Environmental Research*, 58, n. 2-5, p. 363, 2004b.

JULIE ADAMS, K. C., Danielle Tuori, R. Stephen Brown, and Peter V. Hodson. **Review of Methods for Measuring the Toxicity to Aquatic Organisms of the Water Accommodated Fraction (WAF) and Chemically-Enhanced Water Accommodated Fraction (CEWAF) of petroleum.** School of Environmental Studies/ Queen's University. Fisheries and Oceans Canada. 2017.

JUNG, J. H.; HICKEN, C. E.; BOYD, D.; ANULACION, B. F. *et al.* Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish. *Chemosphere*, 91, n. 8, p. 1146-1155, 2013.

KAMLER, E. Resource allocation in yolk-feeding fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 18, n. 2, p. 143, 2007/08/18 2007.

LI, X.; XIONG, D.; DING, G.; FAN, Y. *et al.* Exposure to water-accommodated fractions of two different crude oils alters morphology, cardiac function and swim bladder development in early-life stages of zebrafish. *Chemosphere*, 235, p. 423-433, 2019/11/01/ 2019.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. Rapid kinetic microassay for catalase activity. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 18, n. 4, p. 185-187, 2007/09// 2007.

LIRA, A. L. d. O.; CRAVEIRO, N.; DA SILVA, F. F.; ROSA FILHO, J. S. Effects of contact with crude oil and its ingestion by the symbiotic polychaete *Branchiosyllis* living in sponges

(*Cinachyrella* sp.) following the 2019 oil spill on the tropical coast of Brazil. *Science of The Total Environment*, 801, p. 149655, 2021/12/20/ 2021.

MAGER, E. M.; PASPARAKIS, C. Crude oil-induced cardiotoxicity in fishes. *In: Reference Module in Life Sciences*: Elsevier, 2023.

MAGER, E. M.; PASPARAKIS, C. Crude oil-induced cardiotoxicity in fishes. *In: Alderman, S. L. e Gillis, T. E. (Ed.). Encyclopedia of Fish Physiology (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, 2024. p. 721-754.

MAGNUSON, J. T.; BAUTISTA, N. M.; LUCERO, J.; LUND, A. K. *et al.* Exposure to Crude Oil Induces Retinal Apoptosis and Impairs Visual Function in Fish. *Environmental Science and Technology*, 54, n. 5, p. 2843-2850, 2020.

MAHARAJAN, K.; MUTHULAKSHMI, S.; NATARAJ, B.; RAMESH, M. *et al.* Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. *Aquat Toxicol*, 196, p. 132-145, Mar 2018.

MARIZ JR, C. F.; NASCIMENTO, J. V. G.; MORAIS, B. S.; ALVES, M. K. M. *et al.* Toxicity of the oil spilled on the Brazilian coast at different degrees of natural weathering to early life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Marine Pollution Bulletin*, 207, p. 116819, 2024/10/01/ 2024.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

OECD. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Paris: OECD Publishing, 2013.

ORIS, J. T.; GIESY, J. P. Photoinduced toxicity of anthracene to juvenile bluegill sunfish (*Lepomis Macrochirus Rafinesque*): Photoperiod effects and predictive hazard evaluation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5, n. 8, p. 761-768, 1986.

ORIS, J. T.; GIESY, J. P.; ALLRED, P. M.; GRANT, D. F. *et al.*, 1984, English, **Photoinduced toxicity of anthracene in aquatic organisms: An environmental perspective**. 639-658. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77956993002&doi=10.1016%2fS0166-1116%2808%2972143-5&partnerID=40&md5=a95bb80b148cf440d49e6801679c6926>.

ORIS, J. T.; GIESY JR, J. P. The photoenhanced toxicity of anthracene to juvenile sunfish (*Lepomis* spp.). *Aquatic Toxicology*, 6, n. 2, p. 133-146, 1985.

PEREIRA, E. B.; MARTINS, F. R.; GONÇALVES, A. R.; COSTA, R. S. *et al.* Atlas brasileiro de energia solar. Espaciais), I. I. N. d. P. São José dos Campos: INPE: 80 p. 2017.

PERRICHON, P.; LE MENACH, K.; AKCHA, F.; CACHOT, J. *et al.* Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach. *Sci Total Environ*, 568, p. 952-966, Oct 15 2016.

PRICE, E. R.; MAGER, E. M. The effects of exposure to crude oil or PAHs on fish swim bladder development and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 238, p. 108853, 2020/12/01/ 2020.

PULSTER, E. L.; GRACIA, A.; ARMENTEROS, M.; TORO-FARMER, G. *et al.* A First Comprehensive Baseline of Hydrocarbon Pollution in Gulf of Mexico Fishes. *Scientific Reports*, 10, n. 1, p. 6437, 2020/04/15 2020.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10, n. 12, p. e0146021, 2016.

ROBERTS, A. P.; ALLOY, M. M.; ORIS, J. T. Review of the photo-induced toxicity of environmental contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 191, p. 160-167, 2017/01/01/ 2017.

SANTANA, J. L.; RIOS, A. S.; CALADO, T. C. S.; ZANARDI-LAMARDO, E. *et al.* Reef crab population changes after oil spill disaster reach Brazilian tropical environments. *Marine Pollution Bulletin*, 183, p. 114047, 2022/10/01/ 2022.

SINGER, M. M.; AURAND, D.; BRAGIN, G. E.; CLARK, J. R. *et al.* Standardization of the Preparation and Quantitation of Water-accommodated Fractions of Petroleum for Toxicity Testing. *Marine Pollution Bulletin*, 40, n. 11, p. 1007-1016, 2000/11/01/ 2000.

SOARES, M. O.; TEIXEIRA, C. E. P.; BEZERRA, L. E. A.; RABELO, E. F. *et al.* The most extensive oil spill registered in tropical oceans (Brazil): the balance sheet of a disaster. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, n. 13, p. 19869-19877, 2022/03/01 2022.

SØRHHUS, E.; DONALD, C. E.; NAKKEN, C. L.; PERRICHON, P. *et al.* Co-exposure to UV radiation and crude oil increases acute embryotoxicity and sublethal malformations in the early life stages of Atlantic haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Science of The Total Environment*, p. 160080, 2022/11/11/ 2022.

UTLEY, H. G.; BERNHEIM, F.; HOCHSTEIN, P. Effect of sulfhydryl reagents on peroxidation in microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 118, n. 1, p. 29-32, 1967/01/01/ 1967.

VON HELLFELD, R.; BROTZMANN, K.; BAUMANN, L.; STRECKER, R. *et al.* Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe*, 32, n. 1, p. 122, 2020/09/29 2020.

WANG, S.; SHENG, Y.; FENG, M.; LESZCZYNSKI, J. *et al.* Light-induced cytotoxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons on the US EPA priority pollutant list in human skin HaCaT keratinocytes: Relationship between phototoxicity and excited state properties. *Environmental Toxicology*, 22, n. 3, p. 318-327, 2007/06/01 2007.

WILLIS, A. M.; ORIS, J. T. Acute photo-induced toxicity and toxicokinetics of single compounds and mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33, n. 9, p. 2028-2037, 2014.

WINATA, C. L.; KORZH, S.; KONDRYCHYN, I.; KORZH, V. *et al.* The role of vasculature and blood circulation in zebrafish swimbladder development. *BMC Developmental Biology*, 10, 2010.

ZACHARIAS, D. C.; GAMA, C. M.; HARARI, J.; DA ROCHA, R. P. *et al.* Mysterious oil spill on the Brazilian coast – Part 2: A probabilistic approach to fill gaps of uncertainties. *Marine Pollution Bulletin*, 173, p. 113085, 2021/12/01/ 2021.

ZANARDI-LAMARDO, E.; MITRA, S.; VIEIRA-CAMPOS, A. A.; CABRAL, C. B. *et al.* Distribution and sources of organic contaminants in surface sediments of Hooghly river estuary and Sundarban mangrove, eastern coast of India. *Mar Pollut Bull*, 146, p. 39-49, Sep 2019.

ZHAO, X.; WANG, S.; WU, Y.; YOU, H. *et al.* Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 136–137, p. 49-59, 7/15/ 2013.

ANEXO-1

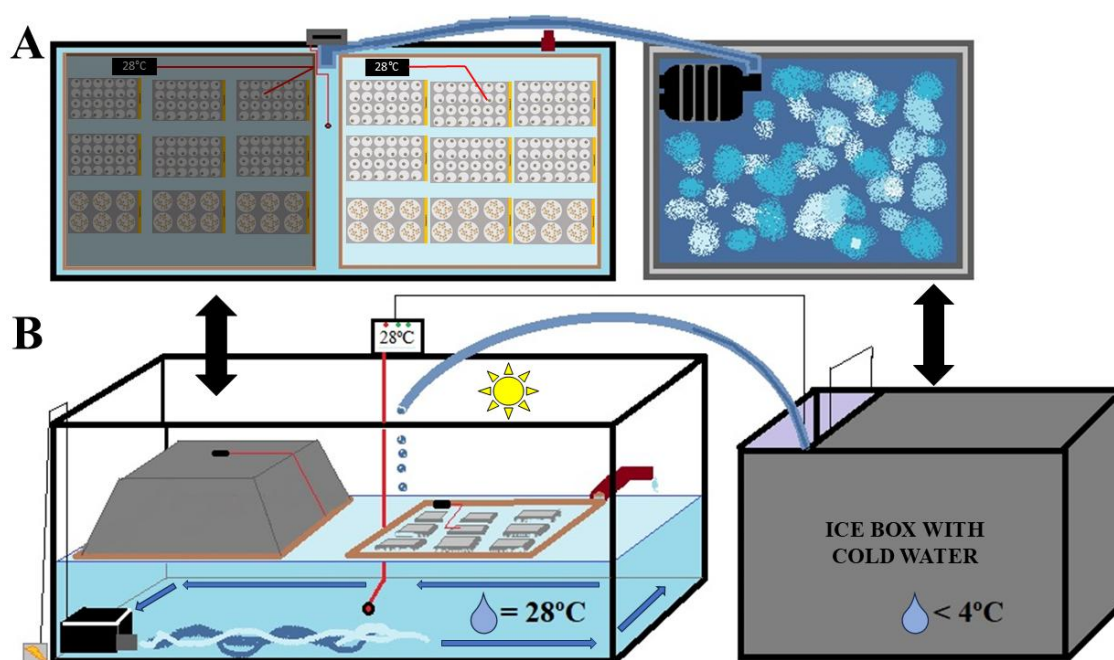


Fig. S1. Experimental cold bath developed in the laboratory to keep the temperatures in the exposure wells at 28 °C, including the protected (WAF) and UV-exposed plates. A: Overhead view of the cold shower and B: Side view of the cold shower.

ANEXO-2

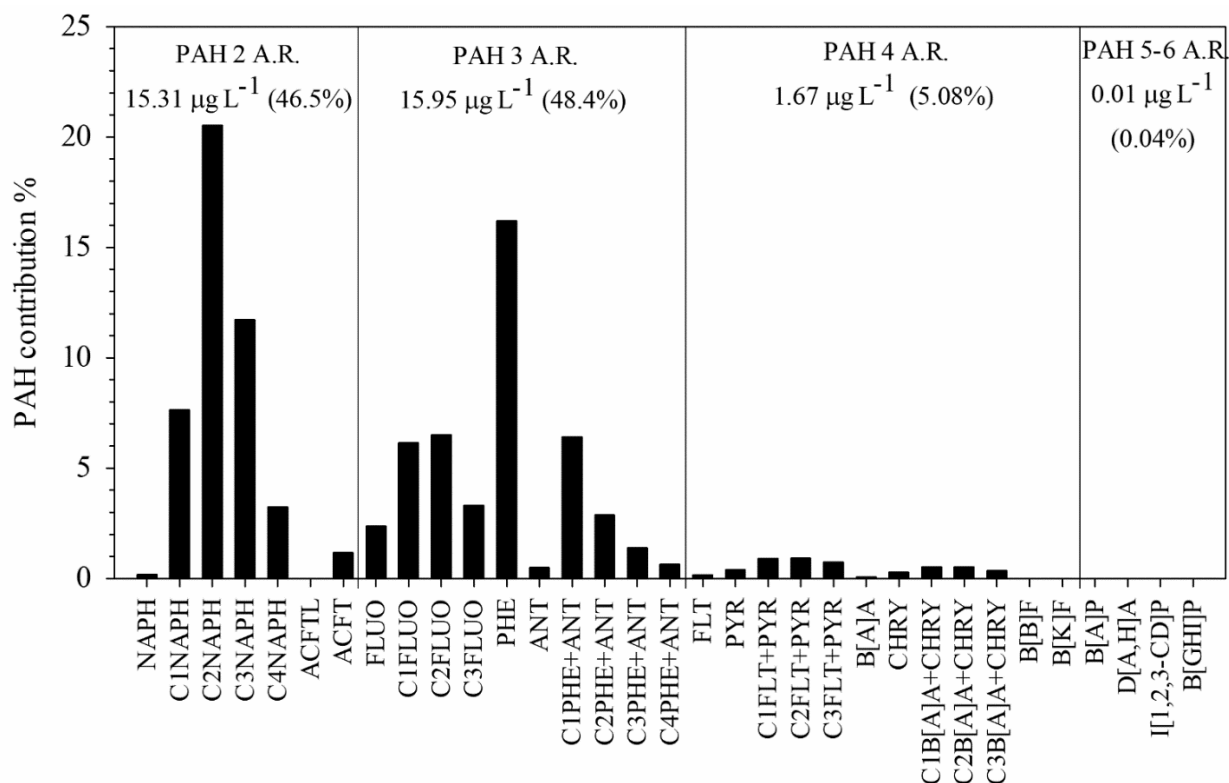


Fig. S2. Contribution of parent and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) evaluated in 100% treatment of water accommodated fraction (WAF) of oil.

A.R. – Aromatic rings. NAPH = naphthalene; ACFTL = Acenaphthylene; ACFT = Acenaphthene; FLUO = Fluorene; PHE = phenanthrene; ANT = anthracene; FLT = fluoranthene; PYR = pyrene; B[A]A = Benz[A]anthracene; CHRY = Chrysene; B[B]F = Benzo[B]fluoranthene; B[K]F = Benzo[K]fluoranthene; B[A]P = Benzo[A]pyrene; D[A,H]A = Dibenzo[A,H]anthracene; I[1,2,3-CD]P = Indeno[1,2,3-CD]pyrene; B[GHI]P = Benzo[GHI]perylene. C1 to C4 indicates the number of alkyl groups attached to the respective PAH.

ANEXO-3

Table. S1. Mortality rate (%) over the period of exposure of *Danio rerio* to water accommodated fraction (WAF) and WAF added of ultraviolet light (WAF-UV).

	ΣPAHt $\mu\text{g L}^{-1}$	n	24	48*	72*	96	120	144	168
WAF	0.00	48	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	4.2
	0.51	24	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2
	1.03	24	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
	2.06	24	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
	4.12	24	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
	8.24	24	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	8.3
	16.47	24	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
	32.95	24	0.0	4.2	4.2	16.7	16.7	16.7	25.0
WAF-UV	0.00	24	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	4.2
	0.51	24	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
	1.03	24	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	8.3	8.3
	2.06	24	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	12.50	12.5
	4.12	24	4.2	4.2	4.2	8.3	8.3	8.3	8.3
	8.24	24	0.0	0.0	12.5	16.7	16.7	16.7	16.7
	16.47	24	4.2	4.2	75.0	95.8	95.8	95.8	100
	32.95	24	4.2	4.2	100	100	100	100	100

(*): period of sunlight exposure for 5 h. ($0 \mu\text{g-}\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$)

ANEXO-4

Table S2. Frequency (percentage) of developmental abnormalities in *Danio rerio* larvae after exposure to different PAH concentrations of oil water accommodated fractions (WAF) from oil samples.

	Σ PAHt $\mu\text{g L}^{-1}$	n	Blood stasis	Blood congestion	Haemorrhage	Head edema	Tail edema	Other edema	Hatching delay	Lordosis
WAF	0.00	48	9%	0%	0%	0%	0%	0%	21%	0%
	0.51	24	17%	0%	0%	0%	4%	8%	17%	0%
	1.03	24	9%	4%	0%	0%	0%	0%	4%	4%
	2.06	24	11%	4%	4%	0%	0%	9%	13%	4%
	4.12	24	13%	0%	0%	0%	0%	4%	4%	4%
	8.24	24	9%	4%	0%	4%	4%	4%	17%	0%
	16.47	24	9%	9%	7%	0%	0%	17%	22%	0%
	32.95	24	56%	10%	22%	20%	15%	49%	39%	39%
WAF-UV	0.00	48	4%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	0.51	24	17%	0%	4%	0%	0%	0%	9%	0%
	1.03	24	4%	0%	4%	0%	0%	9%	0%	4%
	2.06	24	11%	0%	4%	0%	0%	9%	9%	4%
	4.12	24	17%	0%	4%	0%	0%	0%	4%	0%
	8.24	24	8%	0%	0%	0%	0%	5%	0%	5%

Bold indicates statistically significant differences between treatments compared to the control (t-test, $p < 0.05$)

ANEXO-5

Table S3. Frequency (percentage) of developmental abnormalities in *Danio rerio* larvae after exposure to different PAH concentrations of oil water accommodated fractions (WAF) from oil samples.

	ΣPAHt $\mu\text{g L}^{-1}$	n	Kyphosis	Scoliosis	Notochord Deformation	Exophthalmos	Craniofacial deformation	Low pigmentation	Necrosis
WAF	0.00	48	2%	0%	0%	2%	0%	4%	0%
	0.51	24	0%	0%	0%	4%	0%	0%	0%
	1.03	24	4%	9%	4%	13%	0%	4%	4%
	2.06	24	9%	8%	9%	13%	0%	13%	0%
	4.12	24	9%	4%	0%	0%	0%	26%	0%
	8.24	24	9%	6%	4%	4%	0%	30%	4%
	16.47	24	14%	4%	4%	11%	22%	17%	0%
	32.95	24	0%	5%	0%	64%	95%	5%	50%
WAF-UV	0.00	48	4%	0%	0%	0%	0%	4%	0%
	0.51	24	4%	7%	9%	4%	0%	4%	0%
	1.03	24	0%	6%	7%	4%	0%	7%	6%
	2.06	24	0%	7%	4%	9%	0%	13%	0%
	4.12	24	14%	9%	0%	7%	0%	16%	0%
	8.24	24	20%	5%	0%	13%	5%	5%	13%

Bold indicates statistically significant differences between treatments compared to the control (t-test, $p < 0.05$)

VI MANUSCRITO 4 (Avaliação toxicológica de três complexos estuarinos ao longo do litoral pernambucano utilizando o peixe sentinela *Eugerres brasiliensis* como modelo biológico: uma abordagem bioquímica, genotóxica e avaliativa de metabolitos biliares de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos)

RESUMO

Os manguezais são ecossistemas costeiros de transição únicos, entre ambientes marinhos e terrestres, geralmente confinados às regiões tropicais e subtropicais, com os componentes marinhos, fluviais, terrestres e atmosféricos, cada um influenciando a ocorrência, especiação, biodisponibilidade e destino de vestígios químicos. Entre os anos de 2019 e 2020 o litoral brasileiro foi acometido pelo desastre com óleo emulsificado que alcançou o manguezal em diferentes pontos do litoral do estado de Pernambuco, levantando a ideia de que estas regiões poderiam estar com concentrações ainda maiores destes compostos. Dentre as regiões afetadas estavam os Complexos estuarinos de Barra de Catuama (BCEC), Complexo estuarino de Suape (SEC) e Complexo estuarino de Rio Formoso (FRES). Nesse contexto, juvenis do peixe *Eugerres brasiliensis*, conhecido como carapeba, se apresentam como uma importante ferramenta para avaliação desses ambientes impactados dada sua ecologia. Os estuários avaliados neste trabalho são capazes de induzir algum nível de alteração biológica nos peixes residentes, contudo foi demonstrado que os peixes coletados em FRES e SEC apresentaram uma maior similaridade de efeitos como demonstrado pela PC1-71,03%. Em contrapartida, os peixes coletados em BCEC representam um grupo oposto dentro da PCA. A PERMANOVA realizada a partir dos dados bioquímicos, de metabolitos biliares totais e alterações nucleares demonstra que existem três grupos distintos sendo avaliado ($p < 0,05$), apesar da similaridade de FRES e SEC. A EROD e GST, biomarcadores de biotransformação de fase 1 e 2 esteve fortemente correlacionado a BCEC, apesar das baixas concentrações de HPAs biliares, bem como os marcadores CAT, POL e GSH de estresse oxidativo. O aumento nas concentrações de HPAs biliares estiveram correlacionados com o ponto FRES e SEC. A SOD foi inversamente proporcional ao somatório de alterações nucleares, indicando que a presença destas alterações está relacionada a inibição da enzima que é responsável pela defesa inicial contra a espécie oxidativa superóxido. Este trabalho apresenta dados relevantes para entender a saúde dos estuários nesta região, contudo estes estuários ainda merecem maior atenção, principalmente com relação a composição de xenobióticos presente na água para entender melhor como isso pode estar alterando estas medidas biológicas registradas neste trabalho.

1.1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são ecossistemas costeiros de transição únicos, entre ambientes marinhos e terrestres, geralmente confinados às regiões tropicais e subtropicais, com os componentes marinhos, fluviais, terrestres e atmosféricos, cada um influenciando a ocorrência, especiação, biodisponibilidade e destino de vestígios químicos (BAYEN, 2012). Por décadas os manguezais sofrem pressões antrópicas, tornando a água desse ecossistema uma mistura complexa de diferentes contaminantes químicos, provenientes de processos industriais, escoamento urbano e esgoto doméstico. Nos países latino-americanos cerca de 20% das águas residuais geradas passam por tratamento, em parte porque muitos países não possuem sistemas bem desenvolvidos de coleta e tratamento destes efluentes (SATO *et al.*, 2013). Como consequência estes ecossistemas recebem cargas de diferentes moléculas como: hormônios (FROEHNER *et al.*, 2011), HPAs, (MARTINS *et al.*, 2011), metais pesados (BAYEN, 2012), produtos de higiene pessoal e farmacêuticos (VERLICCHI *et al.*, 2015), entre outros. Tais contaminantes podem gerar misturas potencialmente tóxicas e desconhecidas para os organismos residentes.

Os HPAs são originários de várias fontes antropogênicas, incluindo queima de combustíveis fósseis, efluentes municipais e industriais, transporte atmosférico e derramamento ou descarte de petróleo e derivados, bem como escoamento urbano e agrícola, produção de asfalto e incineração de resíduos (MIRZA *et al.*, 2014). Entre os anos de 2019 e 2020 o litoral brasileiro foi acometido pelo desastre com óleo emulsificado que alcançou o manguezal em diferentes pontos do litoral do estado de Pernambuco, levantando a ideia de que estas regiões poderiam estar com concentrações ainda maiores destes compostos. Apesar disso, alguns destes manguezais já apresentava a contaminação por estas moléculas como demonstrado por (SILVA *et al.*, 2021), que atribuiu a presença de metabólitos biliares de HPAs em *Eugerres brasiliensis* à alta urbanização e atividades turísticas.

Os HPAs possuem potencial mutagênico, carcinogênico, teratogênico, imunossupressor, altera o processo reprodutivo de organismos, bem como seus comportamentos (KENNEDY, 2014). A avaliação do potencial tóxico dos diferentes grupos de moléculas encontrados em misturas de HPAs, até em experimentação usando os HPAs isoladamente, tem demonstrado que moléculas com alto peso molecular, 4-6 anéis aromáticos, possui caminhos de alterações biológicas diferentes dos encontrados para HPAs de baixo peso molecular. Um dos processos envolvidos está naqueles mediados pelo receptor de hidrocarboneto aril (AhR), típico de toxicidade de dioxina (INCARDONA *et al.*, 2004a). O

contato destes HPAs de alto peso molecular com o receptor AhR desencadeia um processo para remoção deste grupo xenobióticos de dentro do organismo. Enzimas de biotransformação de fase I e fase II estão envolvidas nesse processo, como CYP1A etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e glutathione S-transferase (GST), respectivamente (SILVA *et al.*, 2021). Este processo facilita a excreção destes metabólitos biotransformados nos hepatócitos que em seguida são concentrados na vesícula biliar para posterior excreção. Portanto, as concentrações de HPAs biliares em peixes que vivem em ambientes contaminados são geralmente de ordens de grandeza superiores às concentrações de HPAs na água, facilitando a detecção, uma das razões pelas quais a quantificação de HPAs biliares de peixes tornou-se um importante biomarcador de exposição a HPAs em ambientes aquáticos (BEYER *et al.*, 2010).

Os HPAs, assim como outros grupos de moléculas que interagem com o material genético, são denominados agentes genotóxicos (ADAM *et al.*, 2010). Essa interação pode ocorrer de diferentes maneiras. Os HPAs, especificamente, são considerados agentes genotóxicos intercalantes, ou seja, são capazes de se posicionar entre as hélices do DNA, modificando a informação genética e lesionando a molécula. Algumas destas alterações, quando no nível cromossômico, podem gerar quebras nestas estruturas, e durante o processo de divisão celular gerar os micronúcleos (MN) e outras alterações nucleares. Outros fatores também podem induzir processos genotóxicos dentre eles as espécies reativas de oxigênio (ERO), que são tipicamente inativadas por enzimas como, Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx), além do peptídeo glutathione (GSH). Os produtos de redução do oxigênio molecular podem reagir com macromoléculas celulares críticas, possivelmente levando à inativação enzimática, peroxidação lipídica (POL), dano ao DNA e consequentemente morte celular (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Nesse contexto, juvenis do peixe *Eugerres brasiliensis*, conhecido como carapeba, se apresentam como uma importante ferramenta para avaliação desses ambientes impactados dada sua ecologia. O *E. brasiliensis* possui uma parte de seu desenvolvimento em estuário e quando adulto transita entre o ambiente marinho e estuarino, sendo considerado eurialino, além de possuir hábitos alimentares onívoro bentônicos (FIGUEIREDO, 1980; FRANCO *et al.*, 2012). A soma destas características fez o *E. brasiliensis* ser considerada uma espécie sentinela útil para monitoramento ambiental (BERTHET, 2013). Os recentes eventos que ocorreram na costa brasileira com o petróleo emulsificado gerou questionamento sobre a qualidade de vida dos peixes residentes, sendo necessário uma avaliação pós impacto de regiões afetadas. Portanto, este estudo tem como objetivo quantificar metabólitos biliares de

HPAs, biomarcadores bioquímicos EROD, GST, GSH, CAT, SOD, POL e AChE e avaliação genotóxica em *E. brasiliensis* em três importantes estuários ao longo da costa do nordeste do Brasil.

1.2 MATERIAL E METODOS

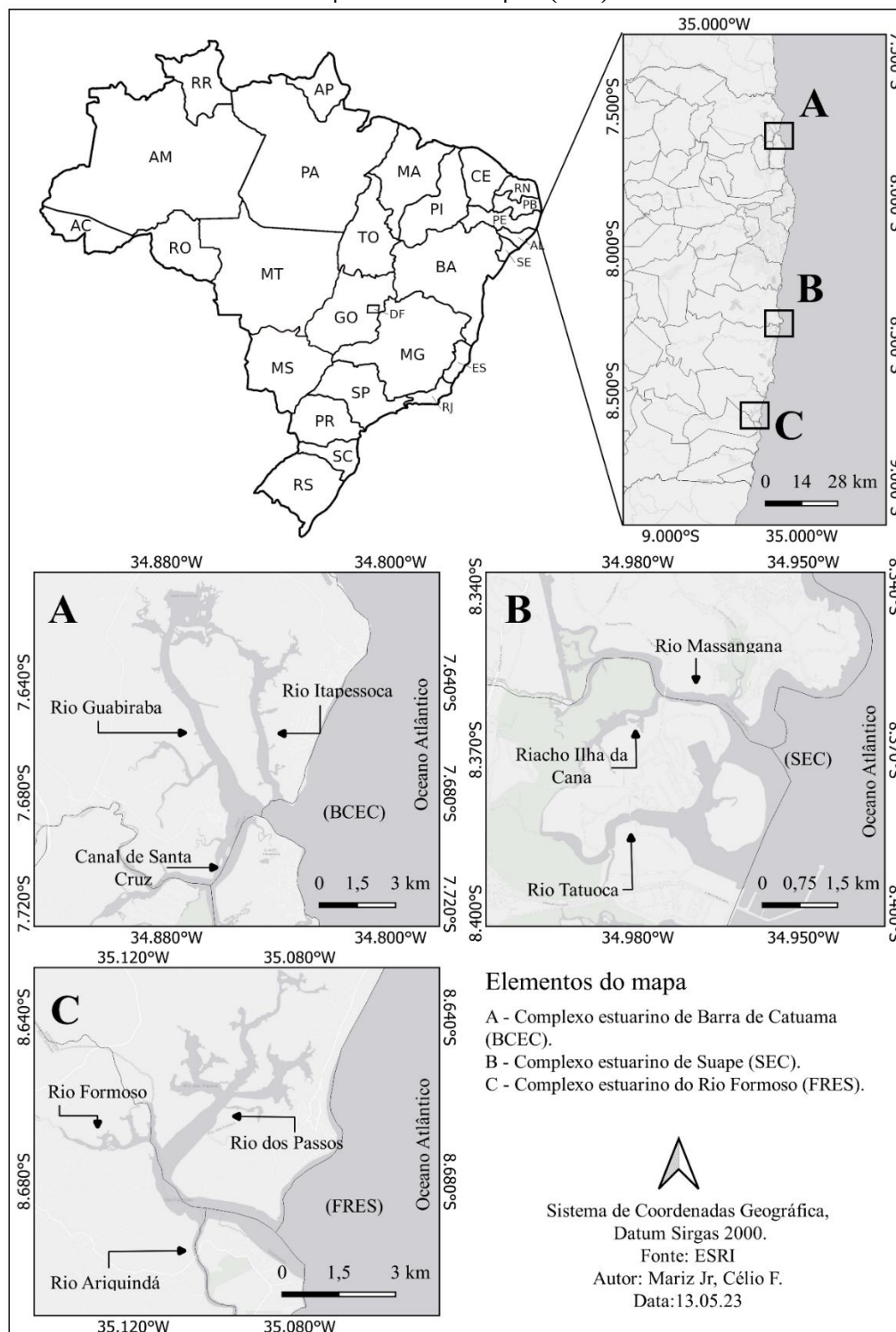
1.2.1 Locais de coleta

As coletas realizadas neste trabalho ocorreram no primeiro semestre de 2022. As coletas foram realizadas em três complexos estuarinos do litoral pernambucano, nordeste do Brasil. No Litoral Norte foram coletados peixes do complexo estuarino de Barra de Catuama (BCEC) e no litoral sul, foram coletados peixes dos complexos estuarinos de Rio Formoso (FRES) e Suape (SEC) (Figura 1). Em cada local foram realizadas duas coletas de peixes *Eugerres brasiliensis* (Carapeba). As três regiões estudadas foram impactadas pelo óleo entre os anos de 2019 e 2020, contudo são regiões que historicamente já recebem carga significativa de poluentes, dentre eles os HPAs fruto de atividades turísticas e escoamento urbano detectadas em SEC e FRES (SILVA *et al.*, 2021).

O complexo estuarino de Barra de Catuama (BCEC) se localiza na região norte do estado de Pernambuco entre os municípios de Goiana e da Ilha de Itamaracá correspondendo as coordenadas 7°41'00"S a 7°42'00"S e 34°50'00"W, local onde há a desembocadura do canal de Santa Cruz (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; MELO JÚNIOR, 2005) (Figura 1A). A região possui cerca de 1,4 km de extensão no sentido norte-sul e apresenta influência dos rios Catuama, Carrapicho, Botafogo e Congo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017). As cidades de Goiana e Itamaracá apresentam populações de 80.347 e 27.076 habitantes, segundo censo de 2021 do IBGE. Segundo pesquisas do IBGE em 2021 92,44% da população de Goiana não possui esgoto doméstico enquanto a ilha de Itamaracá não possui nem dados sobre saneamento.

O complexo estuarino de Suape (SEC) fica localizado entre os municípios de Ipojuca e Cabo de Santo Agostinho no estado de Pernambuco 8°34'0" S a 8°40'0" S e 35°00'0" W a 34°55'0" W (Figura 1B). SEC é composto pelos rios Massangana, Tatuoca, Merepe e Ipojuca. Segundo o censo de 2021 do IBGE os municípios de Ipojuca e Cabo de Santo Agostinho que circundam a região, possuem populações de 99.101 e 210.796 habitantes, respectivamente. Ambos os municípios possuem mais de 80% de sua população sem esgotamento doméstico segundo IBGE 2021. A região comporta o complexo portuário industrial de Suape que engloba cerca de 100 diferentes métodos de operações incluindo petroquímica, refinaria de petróleo, estaleiros, entre outros (LEMOS *et al.*, 2014).

Figura 1 - Mapa do Brasil e os três sistemas estuarinos ao longo do nordeste do Brasil onde o *E. brasiliensis* foi coletado: Barra de Catuama Estuarine Complex; Formoso River Estuarine System (FRES) e Suape Estuarine Complex (SEC).



Fonte: O autor

O estuário do rio formoso (FRES) é formado pela união dos rios Formoso, Ariquindá e Rio dos Passos, sendo localizado no litoral Sul do estado de Pernambuco situado entre 8°39'-8°42'S e 35°10'-35°05'W (FIDEM, 1987) (Figura 1C). O estuário está inserido na área de preservação ambiental (APA) estuarina de Rio Formoso, correspondendo a uma região de

2.724 hectares, sendo titulada em 1986, através da Lei N° 9.931/86. O estuário do Rio formoso está inserido dentro de três municípios do estado de Pernambuco, Rio formoso, Sirinhaém e Tamandaré. Segundo IBGE 2021 essas regiões possuem populações de 23.719, 46.845 e 23.852 habitantes, respectivamente, com ausência de tratamento de esgoto doméstico para 84% e 83%, respectivamente.

1.2.2 Coleta dos animais e processamento inicial das amostras biológicas

Os peixes foram coletados utilizando uma camboa método onde é pregada na saída do rio uma rede enquanto a maré está enchendo e quando a maré está vazando é realizada a coleta dos peixes em uma região da camboa chamada de curral, onde os peixes ficam presos. Quando a camboa não apresentou resultado na captura dos peixes ou houve a impossibilidade de uso pelos pescadores foram utilizadas redes de arrasto ou tarrafas. Em SEC foram realizadas coletas no mês 09 de 2021 e 08 de 2022, em FRES 12 de 2021 e 08 de 2022 e em BCEC em 08 de 2022. Os animais foram transportados vivos na própria água do mangue em galões de 60 L com aeração até o laboratório onde foi realizada a eutanásia em gelo, com posterior corte na espinha dorsal e coleta do fígado, cérebro, líquido biliar e sangue para realização dos testes. As amostras biológicas foram guardadas no freezer -80 até o momento da homogeneização e realização dos testes, com exceção do sangue que foi prontamente utilizado para a análise genotóxica.

1.2.3 Avaliação dos HPAs biliares

Para avaliação da bile foi necessário fazer uma diluição na proporção de 1:500 (v/v) utilizando metanol 50% grau HPLC em água ultrapura. Em seguida as biles foram analisadas pelo método de fluorescência fixa (FF) utilizando cubeta com quatro faces polidas de quartzo em um espectro fluorímetro (Spectramax M3, Molecular Devices). Na avaliação foram utilizados os pares de excitação e emissão para fenantreno (FEN) 260/380, naftaleno (NAF) 290/335, criseno (CRIS) 310/360, pireno (PIR) 341/383 e benzo[a]pireno (B[a]P) como descrito por (AAS, E. *et al.*, 2000; IOC, 1984; KRAHN *et al.*, 1993). A linearidade da fluorescência ($r^2 > 0,98$) foi avaliada a partir de uma faixa de diluição entre 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000, onde foi confirmada a ausência de um inner filter effect como descrito por (AAS, E. *et al.*, 2000). Os valores dos HPAs biliares foram dados em unidade de fluorescência relativa (UFR) para cada grupo de HPAs.

1.2.4 Avaliação bioquímica

O homogenato utilizado para avaliação dos testes Etoxiresorufina – O – desetilase (EROD), Glutathione-S-transferase (GST), glutathione total (GSH), Catalase (CAT), Superóxido

Dismutase (SOD) e Peroxidação lipídica (POL) foi obtido a partir de uma proporção 1:4 (p/v) de fígado em solução tampão KPI fosfato de sódio e fosfato de potássio a 0,25 M. O tampão foi mantido gelado e a homogeneização foi realizada em um processador de tecido (modelo 125, Omni International) seguindo com a centrifugação (modelo 5415R, Eppendorf) a 12000 g por 20 min a 4 °C. O cérebro foi homogeneizado numa proporção de 1:4 (p/v) utilizando um tampão KPI fosfato de potássio a 0,1M seguido de centrifugação a 9000g por 20 min a 4 °C. O cérebro foi utilizado para fazer a avaliação da atividade enzimática da acetilcolinestese (AChE). Em ambos os casos foi coletado o sobrenadante pós-mitocondrial (PMS ou fração S9) para realização dos testes bioquímicos.

1.2.4.1 Etoxi-resorufina – O – desetilase (EROD)

A atividade da EROD foi determinada de acordo com o método de (HAHN *et al.*, 1993) e adaptado para microplacas por (SILVA *et al.*, 2021). No poço foi adicionado 10 µL de homogenato, descrito em (1.2.4), 150 da solução a 2,67 µM de 7-etoxi-resorufina e 40 µL de uma solução a 6,68 mM de NADPH. A atividade foi calculada por fluorescência utilizando excitação e emissão de 530/585 nm no espectro fluorímetro (Spectramax M3, Molecular Devices). A curva de calibração de resorufina foi realizada utilizando concentrações de 0 a 400 pmol de resorufina considerando um ($r^2 > 0,99$). A atividade da EROD foi dada em pmol Resorufina min⁻¹ mg proteína⁻¹.

1.2.4.2 Glutathione-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida como descrita por (HABIG *et al.*, 1974). Em cada poço foi adicionado 5 µL do homogenato, descrito em (1.2.4), 35 µL de água ultrapura, 200 µL do mix (solução de GSH 1,25mM em tampão fosfato de potássio com pH 7,4). Foi realizada uma leitura basal e em seguida foi adicionado 10 µL de 5,1 g L⁻¹ 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e lida a atividade da GST. A atividade foi lida no espectro fluorímetro por absorbância em 340 nm para quantificar a formação do 1- (Sglutationil) - 2,4-dinitrobenzeno (GS-DNB), considerando um coeficiente de extinção molar de $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da GST foi dada em µmol (GS-DNB) min⁻¹ mg proteína⁻¹.

1.2.4.3 Glutathione total (GSH)

O método para a quantificação do GSH foi adaptado pra microplaca seguindo o método de (BEUTLER *et al.*, 1963). O homogenato já pronto descrito em 1.2.4 foi homogeneizado na proporção 1:2 total com ácido tricloroacético (TCA 6%) e depois centrifugado novamente a 4000 rpm a 4°C por 5 min. Após a centrifugação 25 µL do homogenato foi colocado no poço da placa de 96 poços com 50 µL da solução de ácido 5,5-

ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) e mais 150 μL do tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,4. A quantificação de GSH foi determinada a partir da conjugação da glutathiona (GSH) com o DTNB 2,2 mM, formando o tiolato (TNB) que é detectado a 412 nm no espectro fluorímetro. As concentrações foram dadas em $\mu\text{g GSH mg proteína}^{-1}$.

1.2.4.4 Catalase (CAT)

A catalase (CAT) foi avaliada mediante consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) usado como substrato iniciador segundo método de (BEERS *et al.*, 1952) e adaptado pra microplacas por (LI, YI *et al.*, 2007). Em cada poço da placa UV foram adicionados 5 μL do homogenato, descrito em (1.2.4) e 250 μL da solução mix (0,053 M H_2O_2 em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,4). A atividade catalítica da CAT foi avaliada por absorbância no espectro fluorímetro a 250 nm, quantificando a decomposição do H_2O_2 , considerando o coeficiente de extinção molar de ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

1.2.4.5 Superóxido Dismutase (SOD)

A leitura de atividade da enzima SOD foi estabelecida por (MARKLUND *et al.*, 1974) e adaptada por (MAHARAJAN *et al.*, 2018), e se baseia na inibição da autooxidação do pirogalol. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 50 μL de homogenato descrito em (2.4), 140 μL de tampão (tris-HCl 0,05 M pH 8,5 EDTA 1 mM), 55 μL de água e foi realizada uma leitura basal a 420 nm no espectro fluorímetro. Após a leitura basal foram adicionado 35 μL de solução de pirogalol 6 mM em 0,05 M de HCl. A atividade da enzima foi dada em $\text{U SOD min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

1.2.4.6 Peroxidação Lipídica (POL)

A peroxidação lipídica foi quantificada baseada no método de *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) (UTLEY *et al.*, 1967). Em cada poço foi colocado 10 μL de homogenato descrito em (1.2.4), 160 μL de tampão PBS pH 7,4, 10 μL de hidroxitolueno butilado diluído em álcool absoluto (BHT) a 1 mM, 50 μL de ácido tricloroacético 50% (TCA) e 75 μL de ácido 1-tiobarbitúrico 1,3% (TBA). Em seguida a placa foi colocada para incubar a 60 °C por 60 min. A fluorescência é medida utilizando excitação e emissão de 535/590 nm em um espectro fluorímetro. Os valores de fluorescência foram aplicados a curva de malondialdeído (MDA) 0,3 a 30 μM MDA ($r^2 > 0,99$). A concentração de POL foi dado em $\mu\text{g MDA mg proteína}^{-1}$.

1.2.4.7 Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da enzima acetilcolinesterase foi avaliada seguindo o método de (ELLMAN *et al.*, 1961) adaptado para microplacas. Em cada poço foram adicionados 50 μL do homogenato de cérebro descrito em 1.2.4, 200 μL da solução 5-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) a 0,3 g L^{-1} e 50 μL de iodeto de acetiltiocolina 2,6 g L^{-1} . A reação foi avaliada medindo a presença do composto 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB, $\epsilon = 14,15 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por absorvância a 415 nm no espectro fluorímetro. A atividade da AChE foi expressa em $\mu\text{mol TNB min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

1.2.5 Avaliação de anormalidades nucleares

Durante a eutanásia dos peixes foi realizada uma pequena incisão na dorsal de cada indivíduo, retirando cerca de 0,5 ml de sangue periférico com um auxílio de uma pipeta. O sangue foi utilizado para a confecção de duas lâminas de esfregaço para cada peixe individualmente. Após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas por cerca de 10 minutos em metanol puro, sendo posteriormente lavadas em água destilada e coradas com corante Giemsa puro por 5 minutos. Em seguida uma nova lavagem com água corrente para a retirada do excesso de corante e as lâminas foram novamente deixadas para secagem em temperatura ambiente.

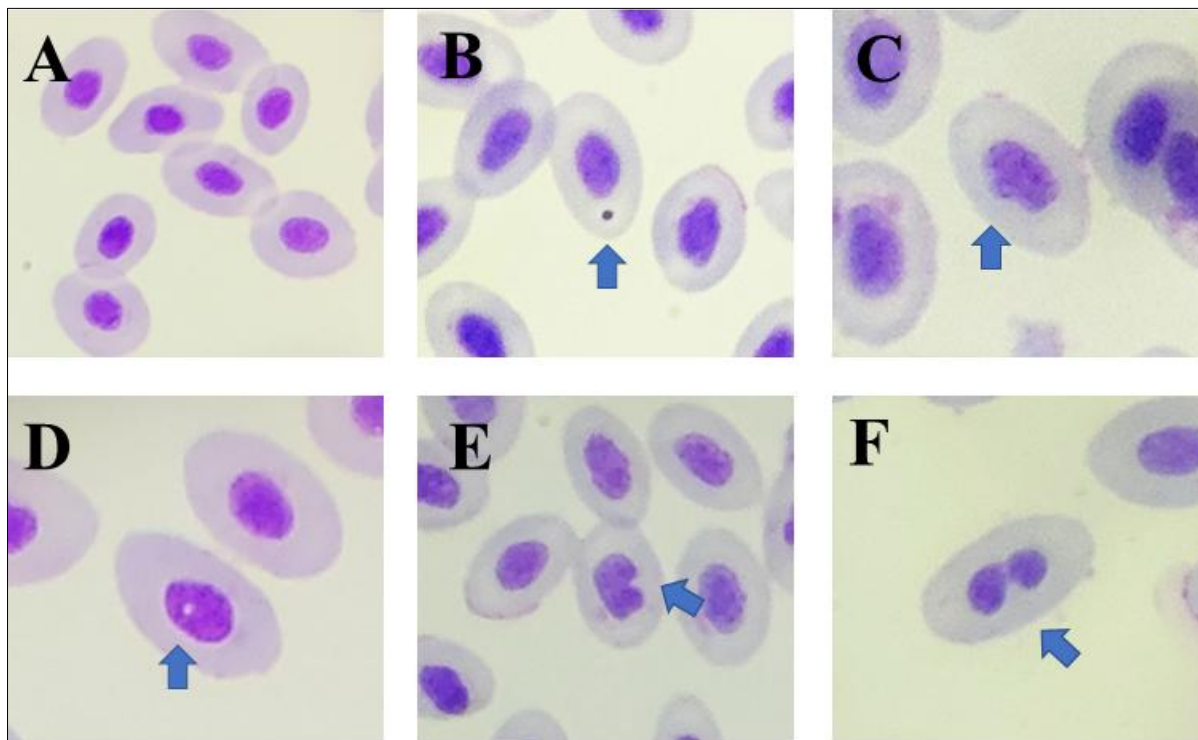
Em cada lâmina de esfregaço foram avaliadas 3000 células utilizando microscópio ótico. Durante a análise foram observadas alterações nucleares dos tipos: corpúsculos extranucleares (micronúcleos) correspondentes ao material genômico danificado, que não foram incluídos no núcleo da célula no processo de divisão celular (UDROIU, 2006); núcleo “blebbed”; núcleo “vacuolated”; núcleo “notched” e célula binucleada (GUSSO-CHOUEIRI *et al.*, 2016) (Figura 2).

1.2.6 Testes estatísticos

Os biomarcadores bioquímicos, de metabolitos biliares e alterações nucleares foram analisados por ANOVA quando os dados foram normais e homocedásticos seguido de teste de Tukey. Quando uma das duas premissas falharam no teste foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW), seguido de teste posterior de Dunn utilizando o software Sigmaplot 12.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany) também utilizado para criação dos gráficos. Para a avaliação non-metric multidimensional scaling (nMDS) e PERMANOVA foi utilizado uma matriz Bray-Curtis de dados transformada utilizando raiz quarta. Tanto a PERMANOVA quanto o nMDS, bem como os gráficos, foram calculados utilizando o software PRIMER v6 (ANDERSON *et al.*, 2008). A PCA, bem como seu gráfico, foi

realizada utilizando o software PAST 4.03 (HAMMER *et al.*, 2001) a partir de uma matriz de correlação entre áreas de avaliação.

Figura 2 - Alterações nucleares encontradas em esfregaço de sangue de *E. brasiliuanus* de três estuários na costa do nordeste do Brasil: Barra de Catuama Estuarine Complex; Formoso River Estuarine System (FRES) e Suape Estuarine Complex (SEC). A: Eritrócito com núcleo normal, B: Eritrócito com Micronúcleo, C: Eritrócito com núcleo Blebbed, D: Eritrócito com núcleo Vacuolated, E: Eritrócito com núcleo Notched e F: Eritrócito Binucleado.

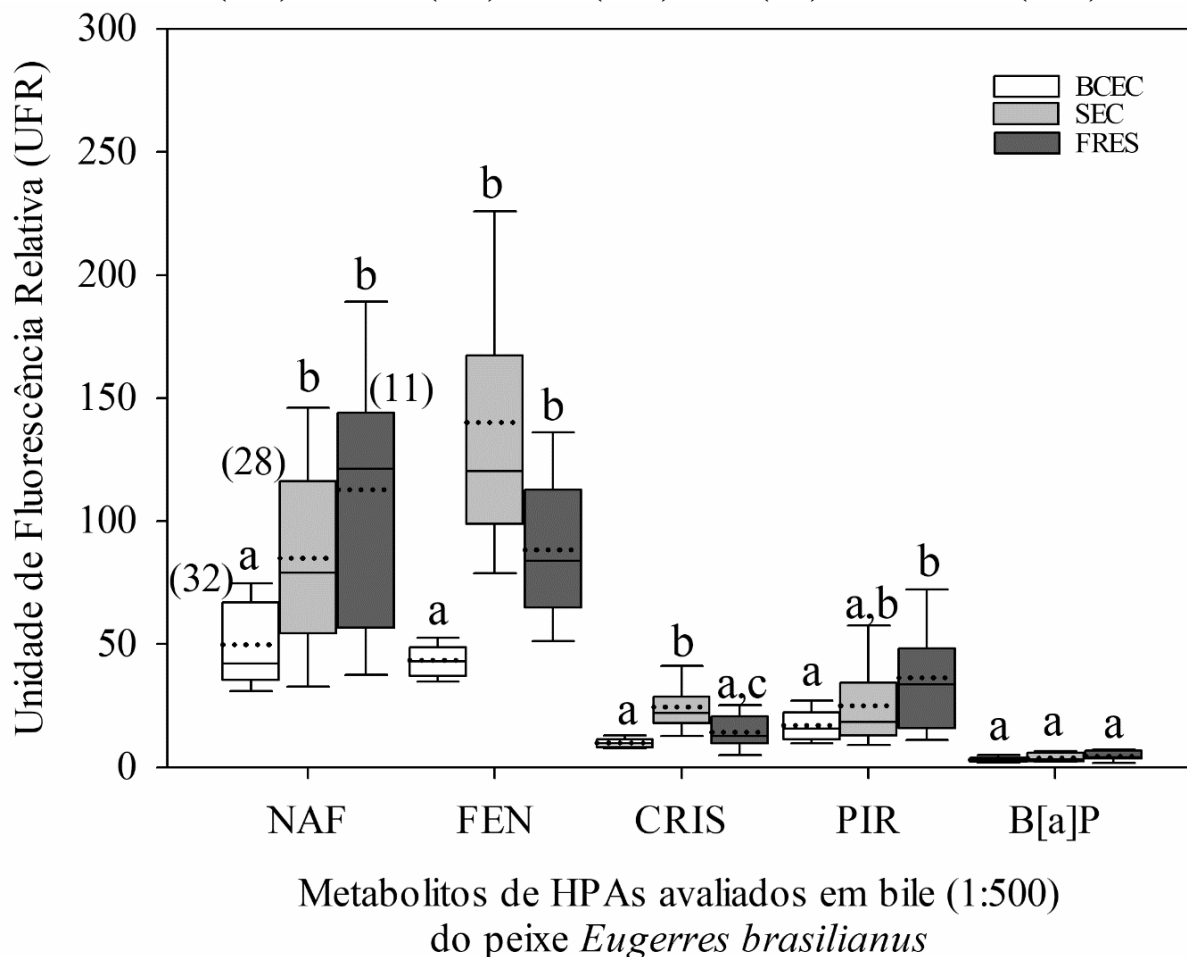


1.3 RESULTADOS

1.3.1 Avaliação de metabólitos biliares

Os metabólitos de NAF avaliados nas bileas do *E. brasiliuanus* apresentaram sinal maior de fluorescência em FRES, SEC e BCEC respectivamente sendo FRES e SEC estatisticamente mais concentrado que BCEC (figura 3). Os metabólitos de FEN apresentaram maior sinal em SEC e FRES e foram estatisticamente maiores que BCEC, mas não apresentaram diferença estatística entre eles. Os metabólitos de CRIS apresentaram maior sinal estatisticamente em SEC quando comparados com BCEC e FRES. Os metabólitos de PIR foram estatisticamente maiores em FRES quando comparados com os peixes de BCEC. Os metabólitos de B[a]P não apresentaram diferença estatística.

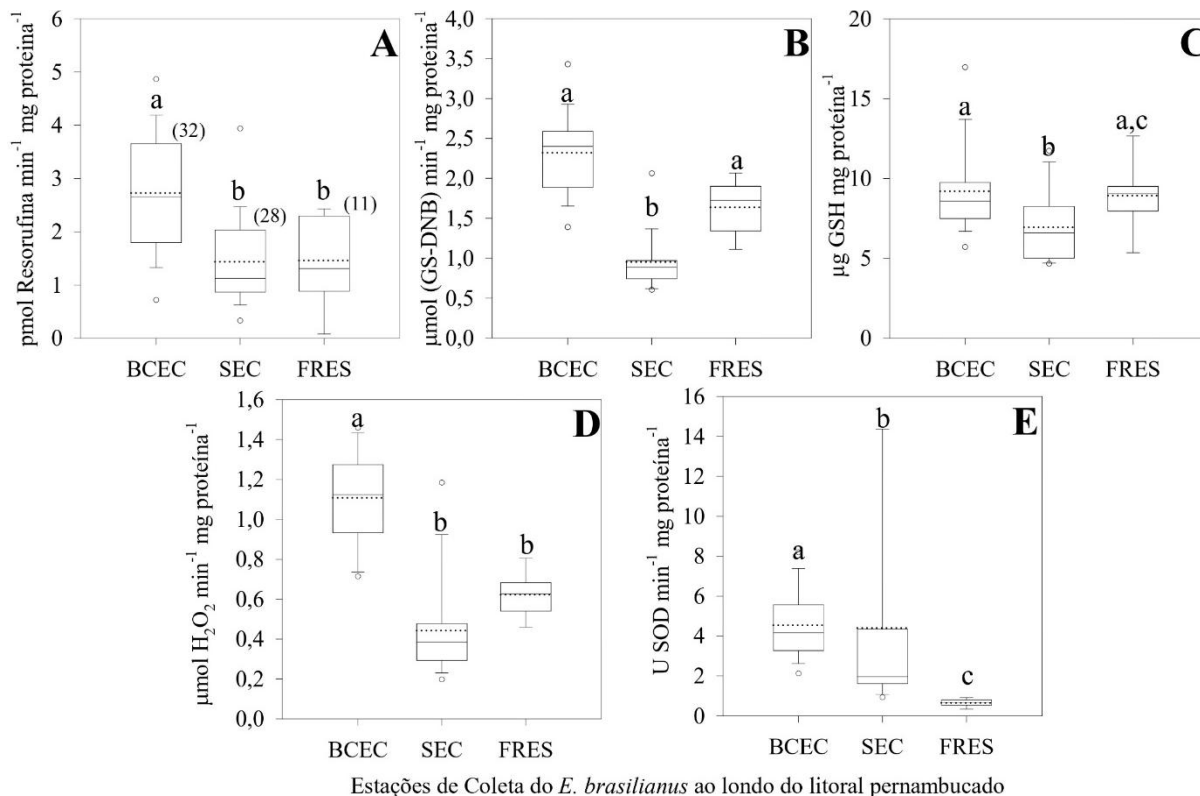
Figura 3 - Unidade de fluorescência relativa (UFR) dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de bile de *Eugerres brasiliensis* de três estuários na costa do nordeste do Brasil: Barra de Catuama Estuarine Complex; Formoso River Estuarine System (FRES) e Suape Estuarine Complex (SEC). Diferentes letras indicam diferença estatística entre regiões estuarinas; número de réplicas entre parêntese e linha pontilhada representando a média. Diferentes representam diferença estatística entre as estações de coleta. Naftaleno (NAF), Fenantreno (FEN), Criseni (CRIS), Pireno (PIR) e Benzo[a]Pireno (B[a]P).



1.3.2 Avaliação bioquímica

A atividade enzimática da EROD nos peixes de BCEC foi estatisticamente maior que SEC e FRES. As reduções foram de 47 e 46% respectivamente quando comparados a atividade da EROD nos peixes de BCEC (KW, $H=20,407$, $p \leq 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) (figura 4A). A atividade da GST foi estatisticamente inibida nos peixes de SEC quando comparados com os peixes de FRES e BCEC (KW, $H=48,754$, $p \leq 0,001$; Dunn, $p < 0,05$). Os peixes de BCEC comparado aos peixes de SEC apresentaram indução na atividade catalítica da enzima GST de 56% enquanto os peixes de FRES comparado aos de SEC apresentaram atividade catalítica 71% superior. FRES e BCEC não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si (Figura 4B).

Figura 4 - Biomarcadores enzimáticos em amostras de *E. brasiliensis* de quatro complexos estuarinos ao longo da costa pernambucana: Barra de Catuama Estuarine Complex (BCEC), Suape Estuarine Complex (SEC) e Formoso River Estuarine System (FRES) A: Etoxiresorufina – O – desetilase (EROD); B: Glutathione S-transferase (GST), C: Glutathione total (GSH), D: Catalase (CAT) e E Superóxido Dismutase (SOD). Diferentes letras indicam diferença estatística entre regiões estuarinas; número de réplicas entre parêntese e linha pontilhada representando a média. Diferentes representam diferença estatística entre as estações de coleta.



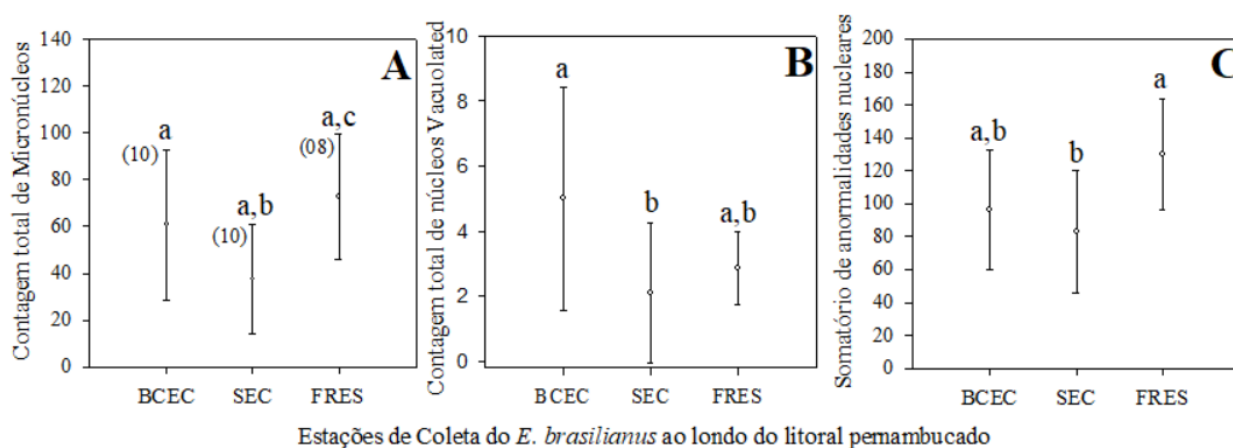
As concentrações de GSH foram estatisticamente 24 e 22% maiores nos peixes dos pontos BCEC e FRES, respectivamente, quando comparados aos peixes de SEC (KW, $H=13,88$, $p \leq 0,001$; Dunn, $p < 0,05$). Os peixes de FRES e BCEC não diferiram estatisticamente (figura 4C). A atividade catalítica de CAT foi estatisticamente inibida 60 e 43% nos peixes de SEC e FRES quando comparados aos peixes de BCEC (KW, $H=46,80$, $p \leq 0,001$; Dunn, $p < 0,05$). SEC e FRES não diferiram estatisticamente entre si (figura 4D). A atividade catalítica da SOD diferiu estatisticamente em todos os tratamentos quando comparados entre si. As medianas da atividade foram 4,16, 1,97 e 0,67 U SOD $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ para BCEC, SEC e FRES, respectivamente (KW, $H=34,50$, $p \leq 0,001$; Dunn, $p < 0,05$) (figura 4E). As concentrações de POL nos organismos testados não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados entre si (KW, $H=4,08$, $p=0,130$). A atividade da AChE não apresentou diferença estatística entre os peixes dos tratamentos avaliados (ANOVA, $F=0,342$, $p=712$).

1.3.3 Avaliação das anormalidades nucleares

Os peixes de FRES apresentaram estatisticamente 48% mais micronúcleos que SEC, enquanto as demais comparações não apresentaram diferenças estatísticas (figura 5A) (ANOVA, $F=3,92$, $p=0,036$, Tukey, $p<0,05$). Já os peixes de BCEC apresentaram 58% mais núcleos vacuolados quando comparados aos peixes de SEC (Figura 5B) (KW, $H=6,93$, $p=0,031$; Dunn, $p<0,05$). As demais comparações para núcleos vacuolados não apresentaram diferença estatística. As demais anomalias nucleares, blebbed, noched e binúcleo sozinhas não demonstraram alterações estatística significativas.

O somatório de todas as alterações nucleares encontradas nos peixes de cada estação de coleta demonstrou que os peixes de FRES possuem maior número de alterações nucleares quando comparado aos peixes de SEC (figura 5C) (ANOVA, $F=3,85$, $p=0,035$, Tukey, $p<0,05$), enquanto as demais comparações não foram estatisticamente diferentes.

Figura 5 - Biomarcadores nucleares em esfregaço de sangue de *E. brasiliensis* de três complexos estuarinos ao longo da costa pernambucana: Barra de Catuama Estuarine Complex (BCEC), Suape Estuarine Complex (SEC) e Formoso River Estuarine System (FRES) A Contagem total de micronúcleos, B: Contagem de núcleos Vacuolated e C: Somatório total de normalidades nucleares. Diferentes representam diferença estatística entre as estações de coleta.



1.4 DISCUSSÃO

A avaliação toxicológica de diferentes biomarcadores no *E. brasiliensis* demonstra que os três estuários avaliados neste trabalho são capazes de induzir algum nível de alteração biológica nos peixes residentes. Contudo foi demonstrado que os peixes coletados em FRES e SEC apresentaram uma maior similaridade de efeitos como demonstrado pela PC1-71,03% (anexo 1). Em contrapartida, os peixes coletados em BCEC representam um grupo oposto dentro da PCA. A PERMANOVA realizada a partir dos dados bioquímicos, de metabolitos biliares totais e alterações nucleares demonstra que existem três grupos distintos sendo avaliados ($p<0,05$) (anexo 3), apesar da similaridade nas respostas dos biomarcadores de

FRES e SEC. A EROD e GST, biomarcadores de biotransformação de fase 1 e 2, estiveram fortemente correlacionados a BCEC, apesar das baixas concentrações de HPAs biliares. Além disso, os marcadores CAT, LPO e GSH, de estresse oxidativo, apresentaram o mesmo padrão para BCEC. O aumento nas concentrações de HPAs biliares estiveram correlacionados com o ponto FRES e SEC. A SOD foi inversamente proporcional ao somatório de alterações nucleares (anexo 1), indicando que a presença destas alterações pode estar relacionada a inibição desta enzima que é responsável pela defesa inicial contra a espécie oxidativa superóxido.

Os peixes coletados em BCEC apresentaram alterações atípicas de marcadores de biotransformação, quando correlacionados com os HPAs biliares. BCEC tem influência direta do Canal de Santa Cruz que tem sua desembocadura tanto a norte quanto a sul da Ilha de Itamaracá. O aporte direto de esgoto e escoamento urbano no Canal de Santa Cruz ficou evidente no último relatório da Agência Pernambucana de Meio Ambiente (CPRH) que considerou esta região de moderadamente comprometida e poluída com valores fora do aceitável de coliformes, concentração de fósforo e oxigênio dissolvido (CPRH, 2020). Levando em consideração que os HPAs não contribuíram positivamente para as induções da EROD e GST nos peixes de BCEC, comparados à SEC e FRES, pode se afirmar que a região possui outros estressores, dada a complexidade da mistura a qual estão inseridos.

PASSOS *et al.* (2022) avaliou metais na região de BCEC e destacou a presença de Hg no sedimento dos manguezais da região da Ilha de Itapessoca. VIANA *et al.* (2023) detectou a presença do metil-Hg biomagnificando em peixes do Canal de Santa Cruz e BCEC, dentre elas exemplares da família Gerreidae, cujo *E. brasiliensis* faz parte. KUMAR *et al.* (2024) inferiu que o acúmulo de metais nos órgãos dos peixes causa lesões estruturais e distúrbios funcionais, induz estresse oxidativo, manifestações histopatológicas e alteração da regulação gênica transcricional nos peixes expostos. Desta forma é possível levantar a hipótese de que estes estressores, não avaliados neste trabalho, mas que sabidamente existem na região, podem estar contribuindo para as induções da SOD e CAT, quando comparados aos outros pontos avaliados.

A indução da EROD nos peixes coletados em BCEC, comparada a SEC e FRES, pode ser um indicativo de poluentes orgânicos persistentes (POPs) de alto peso molecular. O aumento na atividade da EROD foi observado em espécies de peixes após exposição a vestígios de poluentes orgânicos. Contudo, é notável que PCBs, PCDDs e PCDFs causam indução significativamente superior nos organismos quando comparado a HPAs (VAN DER

OOST *et al.*, 2003). A toxicidade das regiões de SEC e FRES foi avaliada por (SILVA *et al.*, 2021) utilizando *E. brasiliensis* e comparativamente ambas as regiões não apresentam diferença no intervalo de oito anos que existe entre os estudos. A UFR média do fenantreno encontradas para SEC e FRES nesse trabalho foram de $140,2 \pm 59,89$ e $88,8 \pm 28,36$, respectivamente, enquanto SILVA *et al.* (2021) encontra para as mesmas estações 180,3 e 110,8, respectivamente. Nossos dados ainda demonstram que a EROD foi significativamente menor nos animais coletados em SEC e FRES comparado aos animais coletados em BCEC. Contudo, nossos dados sugerem que, apesar da atividade da EROD ser baixa comparada a BCEC, comparado aos dados levantados oito anos antes para as mesmas regiões por SILVA *et al.* (2021), houve uma indução 86 e 77% na atividade da EROD nos organismos avaliados neste trabalho, 8 anos depois. Desta forma, é possível afirmar que tanto os organismos coletados em SEC quanto em FRES, avaliados temporalmente, apresentaram maior atividade da enzima EROD.

A região de SEC teve o início de suas atividades em refino de petróleo um ano antes que as coletas descritas por SILVA *et al.* (2021). Hoje, quase 9 anos depois é observado um aumento significativo dos indicadores de biotransformação EROD e GST e de estresse oxidativo CAT. Durante este período, acontecimentos podem ter acarretado o aumento na concentração de contaminantes indutores da EROD para peixes como os HPA de petróleo. Entre os anos de 2019 e 2020 o desastre com petróleo emulsificado em todo o litoral nordestino, incluindo as regiões de SEC, FRES e BCEC, pode ter contribuído para o aumento da concentração destes compostos na água. No ano de 2021 a área de SEC apresentou concentração de HPAs totais variando entre 0,0020 e 0,0041 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CHOUERI *et al.*, 2024), concentrações relativamente baixas, de forma que a região merece um estudo mais aprofundado das concentrações de outros POPs.

A presença de alterações nucleares nas células sanguíneas são um importante indicador de genotoxicidade e que podem ser induzidas por diferentes fatores. Neste trabalho foi encontrado um aumento significativo no SAN nos peixes coletados em FRES, comparados aos peixes de SEC e BCEC (Figura 5C). A avaliação da PC2 (Anexo 1) demonstra uma relação inversamente proporcional a atividade da enzima SOD, logo é possível inferir que o aumento na frequência destas alterações nucleares pode ter relação com a redução na atividade da enzima. Segundo FARAG *et al.* (2018), danos oxidativos às hemácias após exposição a xenobióticos induzem alterações na morfologia das células, conformação das proteínas da membrana, reticulação de proteínas, peroxidação lipídica e consequentemente

hemólise das hemácias. Os peixes coletados em FRES comparado com os peixes de SEC e BCEC apresentaram maiores inibições da SOD. A CAT foi inibida igualmente em SEC e FRES quando comparados a BCEC. A inibição das enzimas de defesa antioxidante deixa o organismo vulnerável aos efeitos das espécies reativas de oxigênio (ERO), que sabidamente é um indutor de genotoxicidade em peixes. As ERO podem interagir diretamente com o DNA ou indiretamente através do processo de peroxidação lipídica, induzindo quebras na fita dupla do DNA (CANEDO *et al.*, 2021).

Os organismos coletados na região de FRES ainda apresentaram concentrações de HPAs biliares maiores que as encontradas para os peixes de BCEC e foi similar aos organismos de SEC. A região de FRES é relativamente bem preservada e com pouca incidência de pressões antropogênicas. Contudo, nossos dados sugerem uma resposta diferente. Comparados ao *Mugil curema* avaliado por LIMA *et al.* (2019), o *Eugerres brasiliensis* se mostrou mais sensível às pressões que o ambiente exerce na ictiofauna na região de FRES. Em outro estudo foi avaliado a contaminação por petróleo e metais no estuário de Vasco, na Índia, utilizando o peixe *Arius arius*, onde foi demonstrado uma alta correlação entre presença de micronúcleos e contaminação por petróleo e metais (D’COSTA *et al.*, 2017). Segundo AAS, ENDRE *et al.* (2000), metabólitos de HPAs na bile podem indicar que o animal está passando por processos genotóxicos. Além disso, embora seja observada uma associação significativa entre os poluentes e a genotoxicidade, também pode ser observado que a presença de outros contaminantes em concentrações menores também pode influenciar a genotoxicidade nestes peixes (D’COSTA *et al.*, 2017). Neste contexto faz-se necessária uma melhor avaliação dos compostos presentes nas regiões discutidas neste trabalho, levando em consideração a complexidade da mistura na qual estão inseridos.

CONCLUSÃO

A partir da avaliação dos dados encontrados neste trabalho é possível concluir que todas as áreas avaliadas apresentaram algum grau de alteração ecotoxicológica nos peixes. Foi possível observar que a região de BCEC apesar de não apresentar as maiores concentrações de metabólitos de HPAs biliares foi o local onde os peixes apresentaram maior atividade de enzimas de biotransformação de fase 1 e 2. Os peixes coletados na região de SEC apresentam menores valores de atividade de defesa antioxidante, o que pode deixar estes animais vulneráveis a ERO. Os peixes coletados em FRES apresentaram maior somatório de anormalidades nucleares, bem como menor atividade da enzima antioxidante SOD, logo estes animais estão mais susceptíveis ao efeito das ERO e seu ataque nucleofílico ao material

genético e em consequência existe o aumento destas alterações nucleares observado pela presença maior de SAN. As três regiões avaliadas foram impactadas pelo acidente com óleo entre 2019 e 2020, contudo trabalhos recentes demonstram que as concentrações de HPAs na água é relativamente baixa ou ausente, de forma que as alterações encontradas neste trabalho provavelmente são decorrentes de atividades antropogênicas que afetam estes ambientes a anos. Neste contexto, é importante ressaltar que a região de SEC é um grande polo de transporte de petróleo e seus derivados, bem como outras indústrias, BCEC é polo industrial de metalúrgicas e turismo e FRES está dentro de uma área de preservação, porém foi uma das áreas que mais apresentaram alterações genotóxicas.

REFERÊNCIAS

AAS, E.; BAUSSANT, T.; BALK, L.; LIEWENBORG, B. *et al.* PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*, 51, n. 2, p. 241-258, 12// 2000.

AAS, E.; BEYER, J.; GOKSØYR, A. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: An evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers*, 5, n. 1, p. 9-23, 2000.

ADAM, M. L.; TORRES, R. A.; SPONCHIADO, G.; MOTTA, T. S. *et al.* Environmental degradation at a public park in Southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). *Water, Air, and Soil Pollution*, 211, n. 1-4, p. 61-68, 2010.

ANDERSON, M.; GORLEY, R. N.; CLARKE, K. **PERMANOVA+ for primer: Guide to software and statistical methods.** 2008.

BAYEN, S. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: A review. *Environment International*, 48, p. 84-101, 2012.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of biological chemistry*, 195, n. 1, p. 133-140, 1952/03// 1952.

BERTHET, B. Sentinel Species. *In: Ecological Biomarkers*: CRC Press, 2013. p. 155-186.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, p. 882-888, May 1963.

BEYER, J.; JONSSON, G.; PORTE, C.; KRAHN, M. M. *et al.* Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30, n. 3, p. 224-244, 2010.

CANEDO, A.; DE JESUS, L. W. O.; BAILÃO, E. F. L. C.; ROCHA, T. L. Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. *Environmental Pollution*, 290, p. 118019, 2021/12/01/ 2021.

CHOUERI, R. B.; DE SOUZA ABESSA, D. M.; DE CARVALHO, M. U.; PAZINI, B. *et al.* PAH residues and toxicity levels two years after an extensive oil spill on the northeast Brazilian coast. *Marine Pollution Bulletin*, 200, p. 116063, 2024/03/01/ 2024.

CPRH. Relatório de Monitoramento da Qualidade da Água de Bacias Hidrográficas do Estado de Pernambuco em 2019 Sustentabilidade, S. d. M. A. e. Rua Oliveira Góes, 395 – Poço da Panela, Recife – PE : CPRH: 200 p. 2020.

D'COSTA, A.; SHYAMA, S. K.; PRAVEEN KUMAR, M. K. Bioaccumulation of trace metals and total petroleum and genotoxicity responses in an edible fish population as indicators of marine pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, p. 22-28, 8// 2017.

DE OLIVEIRA, L. E. E.; DOS SANTOS, L. D.; MONTES, M. d. J. F.; BARCELLOS, R. L. J. E. G. INFLUÊNCIA DA MARÉ NA VARIABILIDADE SEDIMENTAR DA BARRA DE CATUAMA, ILHA DE ITAMARACÁ, PERNAMBUCO-BRASIL. 27, n. 2, 2017.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. J.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, p. 88-95, 1961 1961.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 279, p. 73-83, 2018/01/05/ 2018.

FIDEM. **Proteção das áreas estuarinas**. FIDEM. Recife 1987.

FIGUEIREDO, J. d. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil**. Universidad de São Paulo, Museu de Zoologia, 1980.

FRANCO, T. P.; NEVES, L. M.; TEIXEIRA, T. P.; ARAÚJO, F. G. Patterns of spatial distribution of five species of mojarras (Actinopterygii: Gerreidae) in a small tropical estuary in south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92, n. 5, p. 1217-1225, 2012.

FROEHNER, S.; MACHADO, K. S.; STEFEN, E.; NOLASCO, M. Occurrence of sexual hormones in sediments of mangrove in Brazil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 219, n. 1-4, p. 591-599, 2011.

GUSSO-CHOUERI, P. K.; CHOUERI, R. B.; SANTOS, G. S.; DE ARAÚJO, G. S. *et al.* Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. *Marine Pollution Bulletin*, 104, n. 1, p. 229-239, 2016/03/15/ 2016.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. *Journal of Biological Chemistry*, 249, n. 22, p. 7130-7139, November 25, 1974 1974.

HAHN, M. E.; LAMB, T. M.; SCHULTZ, M. E.; SMOLOWITZ, R. M. *et al.* Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquatic Toxicology*, 26, n. 3, p. 185-208, 1993/08/01/ 1993.

HAMMER, O.; HARPER, D.; RYAN, P. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, p. 1-9, 05/01 2001.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 196, n. 2, p. 191-205, Apr 15 2004a.

IOC. Manual for Monitoring Oil and Dissolved/Dispersed Petroleum Hydrocarbons in Marine Waters and on Beaches. Paris, France: UNESCO: 35 p. 1984.

KENNEDY, C. Multiple Effects of Oil and Its Components in Fish. *In: Impacts of Oil Spill Disasters on Marine Habitats and Fisheries in North America*: CRC Press, 2014. p. 3-34. (Marine Biology).

KRAHN, M. M.; YLITALO, G. M.; BUZITIS, J.; BOLTON, J. L. *et al.* Analyses for petroleum-related contaminants in marine fish and sediments following the Gulf oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 27, n. 0, p. 285-292, // 1993.

KUMAR, M.; SINGH, S.; JAIN, A.; YADAV, S. *et al.* A review on heavy metal-induced toxicity in fishes: Bioaccumulation, antioxidant defense system, histopathological manifestations, and transcriptional profiling of genes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 83, p. 127377, 2024/05/01/ 2024.

LEMOS, R. T.; DE CARVALHO, P. S.; ZANARDI-LAMARDO, E. Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. *Mar Pollut Bull*, 82, n. 1-2, p. 183-188, May 15 2014.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. Rapid kinetic microassay for catalase activity. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 18, n. 4, p. 185-187, 2007/09// 2007.

LIMA, A. R. B.; TORRES, R. A.; JACOBINA, U. P.; PINHEIRO, M. A. A. *et al.* Genomic damage in *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 138, p. 63-69, 2019/01/01/ 2019.

MAHARAJAN, K.; MUTHULAKSHMI, S.; NATARAJ, B.; RAMESH, M. *et al.* Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. *Aquat Toxicol*, 196, p. 132-145, Mar 2018.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MARTINS, C. C.; BÍCEGO, M. C.; MAHIQUES, M. M.; FIGUEIRA, R. C. L. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil): Sources and depositional history. *Marine Pollution Bulletin*, 63, n. 5, p. 452-458, 2011/01/01/ 2011.

MELO JÚNIOR, M. d. Padrões dinâmicos de transporte e migração do zooplâncton, com ênfase nos Decapoda planctônicos, da Barra de Catuama, Pernambuco - Brasil. 2005. (master) - PPGO, UFPE, Recife, PE.

MIRZA, R.; MOHAMMADI, M.; FAGHIRI, I.; ABEDI, E. *et al.* Source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediment samples from the northern part of the Persian Gulf, Iran. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186, n. 11, p. 7387-7398, 2014/11/01 2014.

PASSOS, T.; SANDERS, C. J.; BARCELLOS, R.; PENNY, D. Assessment of the temporal retention of mercury and nutrient records within the mangrove sediments of a highly impacted estuary. *Environmental Research*, 206, p. 112569, 2022/04/15/ 2022.

SATO, T.; QADIR, M.; YAMAMOTO, S.; ENDO, T. *et al.* Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use. 130, p. 1-13, 2013.

SILVA, J. S.; ALVES, R. N.; DE PAULO, D. V.; MARIZ JR, C. F. *et al.* Biliary polycyclic aromatic hydrocarbons and enzymatic biomarkers in *Eugerres brasiliensis* along four tropical estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 163, p. 111919, 2021/02/01/ 2021.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79, n. 2, p. 201-204, 2006.

UTLEY, H. G.; BERNHEIM, F.; HOCHSTEIN, P. Effect of sulfhydryl reagents on peroxidation in microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 118, n. 1, p. 29-32, 1967/01/01/ 1967.

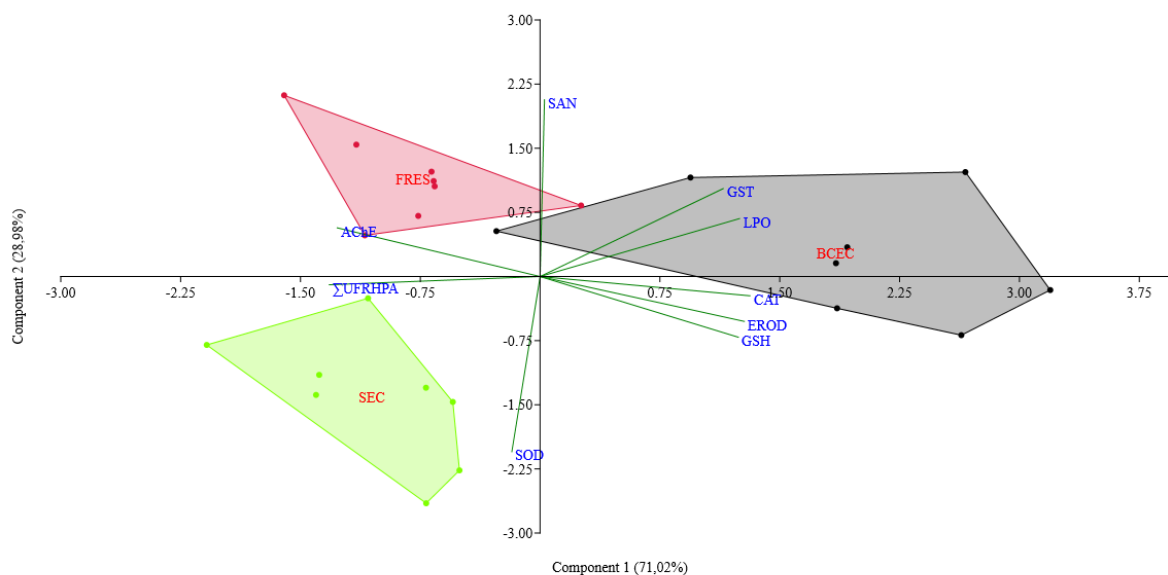
VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VERLICCHI, P.; ZAMBELLO, E. Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil — A critical review. *Science of The Total Environment*, 538, p. 750-767, 2015/12/15/ 2015.

VIANA, A. P.; LE LOC'H, F.; FRÉDOU, T.; LUCENA-FRÉDOU, F. *et al.* Mercury biomagnification and trophic structure patterns in neotropical coastal estuaries impacted by a Chlor-alkali plant in northeast Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, 66, p. 103105, 2023/12/15/ 2023.

ANEXO-1

Anexo 1- Análise dos componentes principais (PCA) utilizando dados glutathiona-s-transferase (GST), Peroxidação lipídica (LPO), Catalase (CAT), Etoxiresorufina-O-Desetilase (EROD), Glutathiona total (GSH), Superóxido Dismutase (SOD), somatório de fluorescência dos HPAs biliares (Σ UFRHPA) e Acetilcolinesterase (AChE). Em vermelho polígono formado pelos dados de FRES, em preto polígono formado pelas amostras de BCEC e em verde polígono formado pelas amostras de SEC.



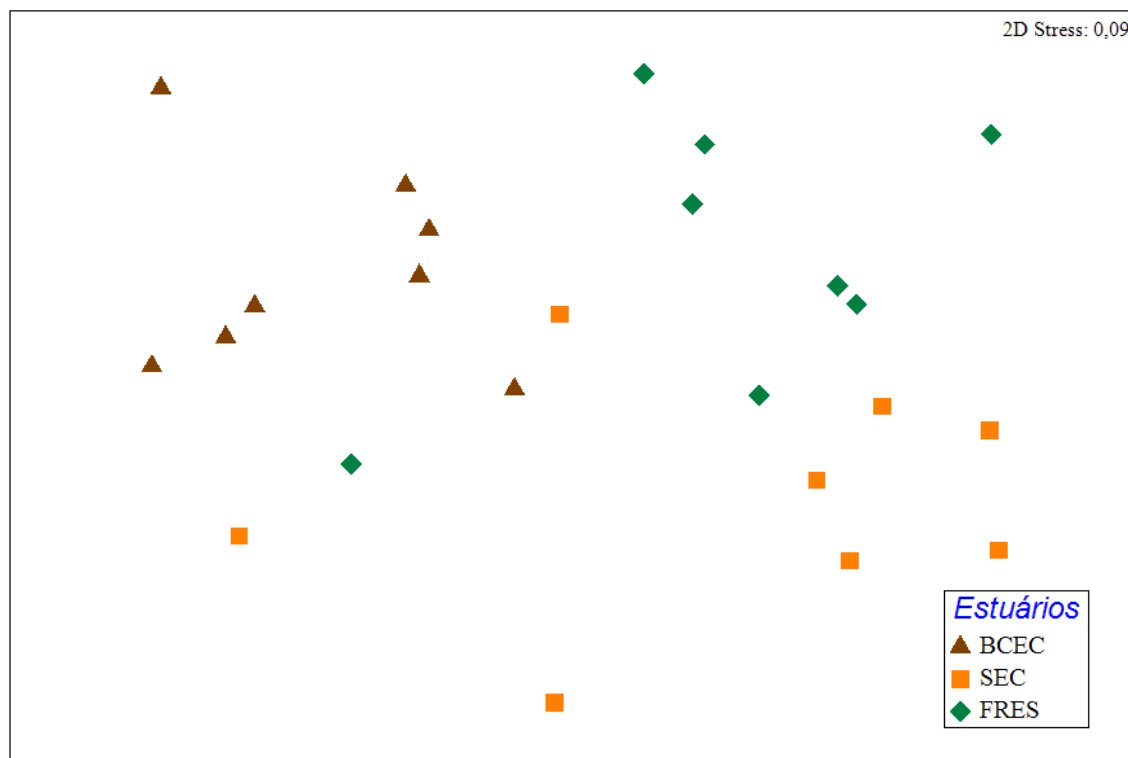
ANEXO-2

Anexo 2- Tabela com os dados de PC1 e PC2 gerados a partir de uma matriz de correlação entre os grupos BCEC, SEC e FRES.

	PC 1	PC 2
Σ UFRHPA	-0,39512	-0,028955
AChE	-0,38025	0,17053
EROD	0,3826	-0,15715
GST	0,34315	0,30797
GSH	0,3715	-0,21259
CAT	0,39319	-0,067501
SOD	-0,053026	-0,61356
LPO	0,37371	0,20288
SAN	0,0080975	0,61902

ANEXO-3

Anexo 3 –Non-metric multidimensional scaling (nMDS) baseado nos parâmetros bioquímicos, de alterações nucleares e HPAs biliares em *E. brasiliensis* coletados em três estuários. Os dados foram padronizados para raiz quarta e Bray-Curtis foi realizado. A tabela abaixo consta os valores da PERMANOVA também para as três áreas estuarinas avaliadas: Complexo Estuarino de Suape (SEC), Complexo Estuarino do Rio Formoso (FRES) e Complexo Estuarino de Barra de Catuama (BCEC).



PERMANOVA						PAIR-WISE		
Origem	f	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Grupos	t	P(perm)
Estuários		1343,7	671,86	88,27	0,0001	BCEC,SEC	3,31	0,001
Res.	1	1598,4	76,12			BCEC,FRES	3,76	0,001
Total	3	2942,2				SEC,FRES	1,88	0,018

ANEXO-4

Anexo 4- Valores detalhados de anormalidades nucleares nas células sanguíneas em peixes *Eugerres brasiliensis* (Média $\pm$ Desvio padrão) coletados no complexo estuarino de Barra de Catuama (BCEC), complexo estuarino de Suape (SEC) e complexo estuarino de Rio Formoso (FRES).

	Micronúcleo	Blebbled	Vacuolated	Notched	Binúcleo	Σ Anormalidades Nucleares (SAN)
BCEC	60,7 $\pm$ 32,1 ^a	16,8 $\pm$ 5,7	5,0 $\pm$ 3,4 ^a	13,7 $\pm$ 5,8	0,3 $\pm$ 0,5	96,5 $\pm$ 36,4 ^a
SEC	37,5 $\pm$ 23,1 ^{a, b}	24,5 $\pm$ 18,3	2,1 $\pm$ 2,1 ^b	18,5 $\pm$ 13,6	0,7 $\pm$ 0,5	83,3 $\pm$ 37,4 ^{a, b}
FRES	72,6 $\pm$ 26,8 ^{a, c}	28,5 $\pm$ 19,9	2,9 $\pm$ 1,1 ^{a, b}	25,8 $\pm$ 12,3	0,3 $\pm$ 0,5	130 $\pm$ 34,0 ^{a, c}

Letras demonstram a diferença estatística entre os tratamentos.

CONCLUSÃO GERAL

O desenvolvimento desta tese nos permite concluir que fases iniciais de vida do *Danio rerio* apresentaram diferentes padrões de toxicidade de acordo com a composição química da fração acomodada de petróleo em água. O petróleo emulsificado coletado após 51 dias de intemperização natural que se encontrava encrustado em rochas apresentou maior potencial tóxico para o desenvolvimento embrionário do *Danio rerio* que o petróleo emulsificado coletado fresco. Apesar disso, o petróleo emulsificado que apresentava em sua composição maior proporção de HPAs de baixo peso molecular, como naftalenos e fenantreno, induziu maior surgimento de patologias como edemas pericárdicos e ausência de bexiga natatória. A bexiga natatória pode ser alterada por múltiplos fatores como alterações moleculares e comportamentais como foi visto em embriões expostos a FAA-OM que alterou a expressão gênica de genes relacionados ao desenvolvimento dos tecidos do órgão, bem como o *sox2*, também de importância comportamental. Além disso, o potencial tóxico da FAA-OM pode ser potencializado quando combinado ao efeito da radiação ultravioleta. Nesta tese foi verificado que fatores como mortalidade, que não foram significativos na exposição crônica das fases iniciais de vida do *Danio rerio*, quando combinados com a luz solar foi significativamente maior com apenas cinco horas de exposição combinada. Além disso, a redução de 2 até 16 vezes nas concentrações de efeito observado demonstram que a exposição combinada pode ter gerado efeitos significativos aos peixes residentes nas áreas afetadas. Neste contexto, a avaliação das fases juvenis do *Eugerres brasiliensis* em áreas estuarinas afetadas, um ano após o impacto, demonstraram alterações bioquímicas em marcadores de estresse oxidativos e de biotransformação. Estas alterações não podem ser relacionadas a contaminação por HPAs diretamente do acidente, pois maiores alterações bioquímicas foram relacionadas a locais com baixa concentração de HPAs biliares. Desta forma, parte das alterações identificadas nos organismos coletados nos ambientes estuarinos devem ser decorrente a exposição a outros compostos. Apesar deste padrão inverso entre biomarcadores bioquímicos e HPAs biliares, alterações genotóxicas seguiram o mesmo padrão dos HPAs biliares, indicando possível relação entre estes biomarcadores.

