



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

MARIA KAROLAINÉ DE MELO ALVES

**BIOMONITORAMENTO DA POLUIÇÃO EM RECIFES DE CORAL UTILIZANDO
O PEIXE DONZELINHA *Stegastes fuscus* COMO ORGANISMO SENTINELA**

Recife

2020

MARIA KAROLAINA DE MELO ALVES

**BIOMONITORAMENTO DA POLUIÇÃO EM RECIFES DE CORAL UTILIZANDO
O PEIXE DONZELINHA *Stegastes fuscus* COMO ORGANISMO SENTINELA**

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

Área de concentração: Biologia Animal

Orientador: Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Coorientador: Dr. João Lucas Leão Feitosa

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Alves, Maria Karolaine de Melo

Biomonitoramento da poluição em recifes de coral utilizando o peixe donzelinha *Stegastes fuscus* como organismo sentinela / Maria Karolaine de Melo Alves - 2020.

87 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Coorientador: João Lucas Leão Feitosa

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. *Stegastes fuscus* 2. Petróleo 3. Biomarcadores
I. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (Orientador) II. Feitosa, João Lucas Leão (Coorientador) III. Título

597 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-134

MARIA KAROLAINA DE MELO ALVES

**BIOMONITORAMENTO DA POLUIÇÃO EM RECIFES DE CORAL UTILIZANDO
O PEIXE DONZELINHA *Stegastes fuscus* COMO ORGANISMO SENTINELA**

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

Aprovada em: 18/02/2020

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Eliete Zanardi Lamardo (1º Titular)

Departamento de Oceanografia – UFPE

Prof^o. Dr. Diego Astúa de Moraes (2º Titular)

Departamento de Zoologia – UFPE

Prof^o. Dr. Afonso Celso Dias Bainy (3º Titular)

Departamento de Bioquímica - UFSC

Prof^o. Dr. Giovanni Amadeu Paiva dos Santos (Suplente Interno)

Departamento de Zoologia - UFPE

Prof^o. Dr. Alcir Luiz Dafre (Suplente externo)

Departamento de Bioquímica – UFSC

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer ao meu orientador, Paulo Carvalho, por ser um orientador diferente de todos aqueles que já conheci, por “pensar fora da caixinha” e fazer com que seus orientandos observem as coisas com outra perspectiva. Por me orientar o caminho a ser seguido. Pelos ensinamentos sobre temas relacionados a ecotoxicologia, a como ser um bom cientista, por me mostrar como se virar com os recursos disponibilizados para fazer ciência de qualidade no Brasil. Obrigada pelas críticas, elogios e por se mostrar presente durante os dois anos do meu mestrado.

Agradeço também ao meu coorientador, João Lucas, por sempre se mostrar disposto a me ajudar, por mostrar caminhos que eu poderia seguir para alcançar o meu objetivo. A admiração que sinto por você é enorme, um ótimo cientista/professor, super ético, correto e sempre topando novos desafios.

Aos meus pais, que não tiveram as mesmas oportunidades de estudo que eu, mas que sempre me deram força, me ajudaram a trilhar os caminhos da minha carreira acadêmica e acreditaram no meu potencial, esse apoio e amor oferecido foi muito importante para mim. Obrigada também aos meu irmãos, a minha cunhada (e amiga) Emmily e minha amiga Juliana, pela presença, amor e força dada a mim.

Aos meus amigos do LABECOTOX. Em especial a Célio, uma das melhores pessoas que já conheci nesse mundo acadêmico, obrigada por sua amizade, por toda ajuda e apoio, pelos momentos de descontração, admiro muito o profissional que você se tornou. A Romulo, que me ensinou muita coisa desde a época que iniciei minha carreira acadêmica, pela ajuda para a realização do meu trabalho e por muitas vezes ser meu “psicólogo de plantão”. A Thalita, que me ajudou muito em diversas etapas da realização do meu trabalho, e se tornou uma pessoa muito querida para mim, é uma daquelas pessoas que eu sei que vai trilhar caminhos muito bonitos. Ao outros, não fiquem desapontados por eu não agradecer individualmente, cada um é especial e me ajudou da sua forma, mas não posso me alongar mais nesses agradecimentos. Obrigada Gabriella, Shaieny, João Victor, Bruna, Rafaella, Fábio, Caio e Rayssa, por me ajudarem sempre quando precisava.

A professora Eliete Zanardi e sua doutoranda Roxanny, por todos os ensinamentos e ajuda recebidos.

Aos meus amigos da época da graduação, Carol e Lucas, por toda força que me deram durante esse tempo.

A UFPE e a Pós Graduação em Biologia Animal (PPGBA), por todo suporte dado durante esses dois anos.

A FACEPE pela bolsa de mestrado disponibilizada.

Aos pescadores, que me ajudaram em coletas em áreas recifais mais distantes.

E a todos os meus amigos e familiares, que me deram apoio durante esse período.

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos de significativo potencial tóxico presentes na composição do petróleo e derivados que podem contaminar ecossistemas aquáticos costeiros através de diversas atividades antrópicas, incluindo acidentes ambientais. Recifes de coral são ecossistemas aquáticos com importância ecológica e econômica pelos diversos serviços ecossistêmicos que propiciam. *Stegastes fuscus* (Cuvier, 1830), conhecida como peixe-donzela, é uma espécie chave dos recifes de coral brasileiros, e este trabalho teve como objetivo a aplicação de metodologias de monitoramento ecotoxicológico com esta espécie sentinela para o monitoramento de ambientes recifais costeiros. Nesse estudo foram realizadas análises espaciais e temporais de HPAs biliares e biomarcadores bioquímicos em *Stegastes fuscus* em 5 áreas recifais ao longo da costa pernambucana e alagoana, entre setembro de 2018 e outubro de 2019, incluindo período imediatamente após a contaminação da costa pernambucana e nordestina por petróleo emulsificado, de setembro a outubro de 2019. A bile dos peixes foi analisada por fluorescência fixa para estimar a dose interna biliar para os HPAs naftaleno (Naf_{bile}), fenantreno (Fen_{bile}), criseno (Cri_{bile}) e pireno (Pir_{bile}). Os biomarcadores bioquímicos analisados foram as enzimas de biotransformação de fase I (etoxiresorufina ortodeetilase, EROD) e fase II (glutaciona S-transferase, GST), de defesa antioxidante (catalase, CAT), lipoperoxidação (TBARS) e acetilcolinesterase (AChE). A análise espacial da dose biliar interna dos HPAs em *Stegastes fuscus* indicou que peixes da área recifal da praia de Serrambi apresentaram menores medianas para naftaleno e fenantreno, enquanto que peixes da área recifal de Japaratinga, apresentaram menores medianas para criseno e pireno, em comparação com as áreas recifais de Boa Viagem, Paiva e Suape. Além disso, amostras de Japaratinga apresentaram níveis basais relativamente estáveis dos biomarcadores bioquímicos analisados, e foi caracterizada como área referência regional aceitável para comparações entre os locais. A quantificação dos HPAs biliares foi diagnóstica de um aumento significativo da bioconcentração de HPAs pelos peixes do Paiva e de Suape decorrentes da contaminação pelo petróleo que atingiu estas praias. Após o evento de contaminação por petróleo no litoral, foi verificado aumento significativo na área recifal impactada da Praia do Paiva de Fen_{bile} , Cri_{bile} e Pir_{bile} de 378%, 342% e 358%, respectivamente, relativos aos valores observados na área de Japaratinga. Na área recifal impactada de Suape, foi verificado aumento significativo de Fen_{bile} , Cri_{bile} e Pir_{bile} de 104%, 89% e 170%, respectivamente, relativos aos valores observados na área de Japaratinga. Além disso, o aumento dos HPAs biliares criseno e pireno, que são conhecidos como potenciais indutores da enzima de biotransformação de fase I (EROD), esteve associado a um aumento da atividade da

EROD pelos peixes do Paiva e de Suape após a contaminação pelo petróleo de 599% e 484%, respectivamente, quando comparados com a atividade da EROD nas amostras de Japaratinga. A atividade da enzima de defesa antioxidante catalase também aumentou em 254% e 261% nas áreas do Paiva e Suape, respectivamente, quando comparadas a atividade da catalase nas amostras de Japaratinga. A análise das atividades da GST, AChE e da peroxidação lipídica (TBARS) não apresentaram uma associação significativa com os HPAs biliares. O uso da espécie *Stegastes fuscus* como organismo sentinela para o monitoramento de áreas recifais costeiras através da análise dos biomarcadores ecotoxicológicos fluorescência de HPAs na bile, EROD e CAT se mostrou sensível e eficiente na identificação de padrões espaciais de contaminação e alterações biológicas causadas por HPAs nas áreas recifais analisadas, antes e após o evento de contaminação por petróleo na costa pernambucana.

Palavras-chave: Petróleo. HPAs. Biomarcadores. EROD.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compounds with significant toxic potential present in the composition of petroleum and derivatives that can contaminate coastal aquatic ecosystems through various human activities, including environmental accidents. Coral reefs are aquatic ecosystems with ecological and economic importance due to the diverse ecosystem services they provide. *Stegastes fuscus* (Cuvier, 1830), known as damselfish, is a key species of Brazilian coral reefs, and this study aimed to apply ecotoxicological monitoring methodologies with this sentinel species to monitor coastal reef environments. In this study, spatial and temporal analyzes of bile PAHs and biochemical biomarkers were performed in *Stegastes fuscus* in 5 reef areas along the Pernambuco and Alagoas coast, between September 2018 and October 2019, including the period immediately after the contamination of the Pernambuco and Northeast coast by emulsified oil, from September to October 2019. Fish bile was analyzed by fixed fluorescence to estimate the internal bile dose for PAHs naphthalene (Naf_{bile}), phenanthrene (Fen_{bile}), chrysene (Cri_{bile}) and pyrene (Pir_{bile}). The biochemical biomarkers analyzed were phase I biotransformation enzymes (ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD) and phase II (glutathione S-transferase, GST), antioxidant defense (catalase, CAT), lipoperoxidation (TBARS), and acetylcholinesterase (AChE). Spatial analysis of the internal biliary dose of PAHs in *Stegastes fuscus* indicated that fish from the reef area of Serrambi beach had lower medians for naphthalene and phenanthrene, while fish from the reef area of Japaratinga showed lower medians for chrysene and pyrene, compared to the reef areas of Boa Viagem, Paiva and Suape. In addition, samples from Japaratinga showed relatively stable baseline levels of the biochemical biomarkers analyzed, and it was characterized as an acceptable regional reference area for comparisons between sites. The quantification of biliary PAHs was a diagnosis of a significant increase in the bioconcentration of PAHs by the fish of Paiva and Suape due to contamination by oil that reached these beaches. After the oil contamination event on the coast, there was a significant increase in the impacted reef area of Praia do Paiva de Fen_{bile}, Cri_{bile} and Pir_{bile} of 378%, 342% and 358%, respectively, relative to the values observed in the Japaratinga area. In the impacted reef area of Suape, there was a significant increase in Fen_{bile}, Cri_{bile} and Pir_{bile} of 104%, 89% and 170%, respectively, relative to the values observed in the Japaratinga area. In addition, the increase in bile PAHs chrysene and pyrene, which are known as potential inductors of the phase 1 biotransformation enzyme (EROD), was associated with an increase in EROD activity by Paiva and Suape fish after contamination by oil 599% and 484%, respectively, when compared with the EROD activity in the Japaratinga samples. The activity of the antioxidant defense enzyme catalase also increased

by 254% and 261% in the Paiva and Suape areas, respectively, when compared to the catalase activity in the Japaratinga samples. The analysis of the activities of GST, AChE and lipid peroxidation (TBARS) did not show a significant association with bile PAHs. The use of the species *Stegastes fuscus* as a sentinel organism for monitoring coastal reef areas through the analysis of ecotoxicological biomarkers of PAH fluorescence in bile, EROD and CAT proved to be sensitive and efficient in the identification of spatial patterns of contamination and biological changes caused by PAHs in reef areas analyzed, before and after the event of oil contamination on the coast of Pernambuco.

Keywords: Oil. PAHs. Biomarkers. EROD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Diagrama conceitual das principais características do “Adverse Outcome Pathway” ou rota de resultados adversos, adaptado de Ankley <i>et al.</i> (2010).	20
Figura 2 — Estrutura molecular dos HPAs que foram identificados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).	23
Figura 3 — Mecanismo de indução do CYP1A pela exposição a dioxina, a transdução de sinal é mediada pelo AhR, adaptado de Bucheli e Fent (1995).	30
Figura 4 — Fórmulas estruturais de 7-etoxirresorufina e resorufina, adaptado de Whyte, J. <i>et al.</i> (2000).	31
Figura 5 — A indução do citocromo P450 a exposição ao benzo [a] pireno e a atuação das enzimas de biotransformação de fase I e II, para a excreção do xenobiótico da célula (Sheehan <i>et al.</i> , 2001).	31
Figura 6 — As espécies reativas de oxigênio provocando o estresse oxidativo, ocasionando danos celulares e as enzimas antioxidantes atuando no processo de neutralização e reparação dessas moléculas.	33
Figura 7— Indivíduo de <i>Stegastes fuscus</i> , na fase adulta, nos recifes de coral (Autor: João Lucas Feitosa).	35
Figura 9 — Área recifal 1 (AR1), na Praia de Boa Viagem onde foram coletados os exemplares de <i>Stegastes fuscus</i> . As coletas aconteceram em 13 de agosto de 2018 (BV1), 24 de janeiro de 2019 (BV2), e 02 de outubro de 2019 (BV3). (Coordenadas do ponto onde foram feitas as coletas BV1, BV2 e BV3: 8° 5'37.92"S, 34°52'51.51"O).	46
Figura 10 — Área recifal 2 (AR2), na Praia do Paiva, onde foram coletados os exemplares de <i>Stegastes fuscus</i> . As coletas aconteceram em 23 de novembro de 2018 (PV1), 03 de outubro de 2019 (PV2) e 23 de outubro de 2019 (PV3). (Coordenadas do ponto onde foram feitas as coletas PV1, PV2: 8°16'29.46"S, 34°56'41.50"O; e a coleta PV3: 8°16'56.76"S, 34°56'48.63"O)... ..	47
Figura 11 — Área recifal 3 (AR3), representada por cordão arenítico recifal na parte externa da Baía de Suape, onde fica localizado o Complexo Industrial Portuário de Suape (CIPS), e onde foram coletados os exemplares de <i>Stegastes fuscus</i> . As setas verdes indicam as duas aberturas do cordão arenítico por onde a água circula nos movimentos de maré. Inseto A com detalhe das coletas em 25 de setembro de 2018 (SP1), em 18 de março de 2019 (SP2), mostrando a posição de coleta na área interna da Baía de Suape (8°21'47.41"S, 34°56'48.19"O), ambas datas anteriores ao evento de contaminação por petróleo. Inseto B com detalhe das coletas no dia 21	

de outubro de 2019, um dia após a retirada de grande quantidade de petróleo na praia da Ilha do Cocaia (setas pretas em 4^a). Neste dia os peixes foram coletados em 3 grupos, um grupo no ponto SP3 (8°22'51.48"S, 34°57'14.30"O), que localiza-se numa poça de maré profunda em conexão direta com a área costeira externa a Baía de Suape e visivelmente sem indício de óleo. Outros peixes foram coletados em poças de maré mais rasas e isoladas durante a maré baixa, visivelmente contaminadas por petróleo, que se conectam com a área costeira externa a cada movimento de maré, divididos em dois grupos SP4 e SP5 (8°22'51.48"S, 34°57'14.66"O)... 48

Figura 12 — Área recifal 4 (AR4), na Praia de Serrambi, onde foram coletados os exemplares de *Stegastes fuscus*. As coletas aconteceram em 18 de junho de 2018 (SE1) e em 19 de fevereiro de 2019 (SE2). (Coordenadas do ponto onde foram feitas as coletas SE1 e SE2: 8°33'47.01"S, 35° 0'25.08"O). 50

Figura 13 — Área recifal 5 (AR5), na Praia de Japaratinga, onde foram coletados os exemplares de *Stegastes fuscus*, em JP1 (9° 4'30.60"S, 35°14'26.34"O) e JP2 (9° 5'29.32"S, 35°14'44.94"O). As coletas aconteceram no dia 26 de novembro de 2018 em JP1 e em 17 de outubro de 2019 em JP2. As setas pretas indicam área da praia onde existiam extensas manchas de petróleo emulsificado na praia no dia da coleta indicada no ponto JP2. Obs: no recife onde foram encontrados e coletados peixes em JP2 não foi visualizado nenhum indício de petróleo. 51

Figura 14 — Unidades de fluorescência relativa (URF) para naftaleno das amostras de bile da espécie *Stegastes fuscus*, coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 37,7$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A, B**: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 25,6$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). 63

Figura 15 — Unidades de fluorescência relativa (URF) para fenantreno das amostras de bile da espécie *Stegastes fuscus*, coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do (Kruskal Wallis $H_4 = 36,6$; $p = < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A, B**: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 59,3$; $p = < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). 64

Figura 16 — Unidades de fluorescência relativa (URF) para criseno das amostras de bile da espécie *Stegastes fuscus*, coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 34,2$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A, B**: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 57,6$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).65

Figura 17 — Unidades de fluorescência relativa (URF) para pireno das amostras de bile da espécie *Stegastes fuscus*, coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 39,9$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A, B**: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 43,0$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).66

Figura 18 — Atividade da etoxiresorufina orto-deetilase (EROD) em amostras coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 6,3$; $p = 0,178$). **A, B**: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 18,4$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).67

Figura 19 — Atividade da glutathione S-transferase (GST) em amostras coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Serrambi, Suape e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 23,1$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A, B**: diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 25,5$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).68

Figura 20 — Atividade da catalase (CAT) em amostras coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Serrambi, Suape e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da

chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 32,9$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A, B**: diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 27,1$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). 69

Figura 21 — Lipoperoxidação com base nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em amostras coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Serrambi, Suape e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 15,3$; $p = 0,004$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 11,6$; $p = <0,021$; teste de Dunn, $p < 0,05$)...... 70

Figura 22 — Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em amostras coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Serrambi, Suape e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 26,1$; $p = <0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A, B**: diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 13,7$; $p = 0,008$; teste de Dunn, $p < 0,05$)...... 71

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
AHH	Aril hidrocarboneto hidroxilase
AhR	Aril hidrocarboneto
APACC	Área de Preservação Ambiental Costa dos Corais
ARA	Avaliação dos riscos ambientais
ARNT	Aril hidrocarboneto transferase nuclear
BV1	Coleta realizada em Boa Viagem no dia 13 de agosto de 2018
BV2	Coleta realizada em Boa Viagem no dia 24 de janeiro de 2019
BV3	Coleta realizada em Boa Viagem no dia 02 de outubro de 2019
CAT	Catalase
Cartas SAO	Cartas de Sensibilidade Ambiental ao Óleo
CES	Complexo Estuarino de Suape
CIPS	Complexo industrial portuário de Suape
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
EAS	Estaleiro Atlântico Sul
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EROD	Etoxiresorufina orto-deetilase
FF	Fluorescência fixa de comprimento de onda
GSH	Glutathiona reduzida
HSP 90	Proteína de choque térmico 90
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
JP1	Coleta realizada em Japaratinga no dia 26 de novembro de 2018
JP2	Coleta realizada em Japaratinga no dia 17 de outubro de 2019
LPO	Peroxidação lipídica
MMA	Ministério do Meio Ambiente
OCPs	Pesticidas organoclorados
PCBs	Bifenilos policlorados
PV1	Coleta realizada no Paiva no dia 23 de novembro de 2018
PV2	Coleta realizada no Paiva no dia 03 de outubro de 2019
PV3	Coleta realizada no Paiva no dia 23 de outubro de 2019

SFS	Espectrometria de fluorescência síncrona
SE1	Coleta realizada em Serrambi no dia 18 de junho de 2018
SE2	Coleta realizada em Serrambi no dia 19 de fevereiro de 2019
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
SP1	Coleta realizada em Suape no dia 25 de setembro de 2018
SP2	Coleta realizada em Suape no dia 18 de março de 2019
SP3	Coleta realizada em Suape no dia 21 de outubro de 2019
SP4	Coleta realizada em Suape no dia 21 de outubro de 2019
SP5	Coleta realizada em Suape no dia 21 de outubro de 2019
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCDDs	Dibenzo-p-dioxinas tetracloradas
UFR	Unidades de Fluorescência Relativa
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
7-ER	7-etoxirresorufina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo geral.....	19
1.1.2 Objetivos Específicos.....	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 DEFINIÇÃO DA ECOTOXICOLOGIA	20
2.2 UTILIZAÇÃO DOS PEIXES COMO MODELO PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS.....	21
2.2.1 Espécie sentinela	22
2.3 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	22
2.4 DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO	25
2.4.1 Derramamento de petróleo no litoral brasileiro	26
2.5 BIOMARCADORES ECOTOXICOLÓGICOS	27
2.5.1 Metabólitos de HPAs na bile de peixes	28
2.5.2 Biomarcadores enzimáticos	29
2.5.2.1 Sistema do citocromo P450 e a etoxiresorufina orto-deetilase (EROD).....	30
2.5.2.2 Glutathione S-transferase	31
2.5.2.3 Enzimas de defesa antioxidante.....	32
2.5.2.3.1 CAT.....	34
2.5.2.4 Peroxidação lipídica	34
2.5.2.5 Acetilcolinesterase (AChE)	34
3 ESPÉCIE MODELO	35
4 ÁREAS DE ESTUDO.....	36
5 RESPOSTAS DE BIOMARCADORES ECOTOXICOLÓGICOS NO PEIXE DE RECIFE DE CORAL <i>Stegastes fuscus</i> ANTES E APÓS A CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO BRUTO NO LITORAL DO NORDESTE BRASILEIRO	38

6 MATERIAIS E MÉTODOS	41
6.1 LOCAIS DE COLETA.....	42
6.2 CAPTURA, TRANSPORTE E PROCESSAMENTO DOS PEIXES	52
6.3 METABÓLITOS DE HPAS NA BILE DOS PEIXES	52
6.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	52
6.4.1 Biotransformação de fase I etoxiresorufina orto-deetilase (EROD).....	53
6.4.2 Biotransformação de fase II Glutathiona S-Transferase (GST)	53
6.4.3 Atividade de defesa antioxidante catalase (CAT).....	53
6.4.4 Lipoperoxidação com base nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	54
6.4.5 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	54
6.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
7 RESULTADOS	55
7.1 METABÓLITOS DE HPAS NA BILE DOS PEIXES	55
7.1.1 Naftaleno	55
7.1.2 Fenantreno	56
7.1.3 Criseno.....	57
7.1.4 Pireno.....	58
7.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	59
7.2.1 EROD.....	59
7.2.2 GST	60
7.2.3 CAT.....	60
7.2.4 TBARs	61
7.2.5 AChE	62
8 DISCUSSÃO	72
9 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Os recifes de corais constituem um dos ecossistemas mais diversificados e produtivos do ambiente aquático. São ambientes importantes para a biota aquática que o habitam, servindo como abrigo contra predadores, como substrato para colonização de outros organismos e fonte de nutrientes para várias espécies (Turner e Renegar, 2017). Além disso, são importantes do ponto de vista socioeconômico, onde desempenham diversos serviços ecossistêmicos. As últimas estimativas indicam que estes serviços desempenhados pelos recifes de coral são globalmente valorados em mais de US\$ 30 bilhões de dólares anuais (Costanza *et al.*, 1997; Johansen *et al.*, 2017), em especial por seu valor para pesca, turismo e proteção costeira.

Porém, os recifes de coral vêm sofrendo impactos causados pela urbanização, relacionados a exploração exacerbada dos seus recursos e pela poluição aquática (Heery *et al.*, 2018). Diversas fontes são responsáveis pela contaminação e poluição desses locais, como por exemplo, o descarte irregular de efluentes domésticos e acidentes com derramamento de petróleo.

Os derramamentos acidentais de petróleo não são considerados a principal fonte de introdução do óleo no ambiente. Porém, são os que tem maior notoriedade e que podem causar impactos severos ao ambiente marinho. Quando ocorrem esses acidentes, há o influxo de petróleo para a costa, acúmulo em sedimentos e subsequentes distúrbios ecológicos a longo prazo (Patin, 2013).

Os compostos tóxicos como os HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), são considerados como contaminantes ambientais generalizados, devido a sua presença em petróleo, carvão, fuligem, poluentes do ar, esgoto doméstico, entre outros (Reynaud e Deschaux, 2006). Esses compostos são considerados de alta prioridade para o monitoramento da poluição ambiental (Pampanin *et al.*, 2016). Estudos como o impacto do incidente do derramamento de petróleo do *Deepwater Horizon (DWH)*, nos Estados Unidos (2010), demonstram que estes compostos estão associados a eventos de derramamento. Seus efeitos adversos são variados e afetam uma ampla gama de organismos, incluindo o plâncton, invertebrados, peixes, aves e mamíferos marinhos (Pasparakis *et al.*, 2019).

Informações sobre a sensibilidade de marcadores biológicos em organismos aquáticos são necessários, para a avaliação dos efeitos causados pelos HPAs (Pampanin *et al.*, 2016). O grupo dos peixes é bastante utilizado em estudos que avaliam respostas biológicas e bioquímicas a contaminantes ambientais (Van Der Oost *et al.*, 2003), uma vez que pequenas

modificações no ambiente relacionadas com exposição a HPAs já podem induzir danos hepáticos e distúrbios bioquímicos-fisiológicos (Recabarren-Villalón *et al.*, 2019).

Os HPAs se acumulam no tecido adiposo, como por exemplo em órgãos como o fígado de peixes, e são metabolizados, para maior solubilidade; e esses metabólitos hidrofílicos são predominantemente excretados por via biliar (Pampanin *et al.*, 2016). Esta via metabólica nos permite identificar e mensurar impactos em níveis ecotoxicológicos. Também igualmente importante, a identificação de organismos que possam servir como modelos para mensuração de impactos através destas vias, o que torna possível obter informações sobre efeitos da presença dos contaminantes no ambiente; como por exemplo sua biodisponibilidade para os organismos e as mudanças que podem ocorrer em diversos parâmetros biológicos e níveis de organização biológica (Berthet, 2015).

Pesquisas relacionadas a impactos gerados por compostos derivados de petróleo em peixes de recifes de coral ainda são bastante escassos. A posição chave desses peixes em muitas redes alimentares marinhas e sua importância econômica, tornam estes organismos prioritários para o estudo de impactos ambientais oriundos da sua exposição aos HPAs (Baum *et al.*, 2016).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi a avaliação da contaminação e toxicidade dos HPAs, com base em biomarcadores ecotoxicológicos, utilizando a espécie de peixe recifal *Stegastes fuscus* (peixe donzela) como organismo sentinela, para a obtenção de um diagnóstico das condições ambientais de quatro ambientes recifais do estado de Pernambuco e um do estado de Alagoas, com diferentes graus de influência antrópica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Obter um diagnóstico da contaminação por HPAs e do potencial tóxico destes contaminantes para o peixe marinho recifal *Stegastes fuscus* em quatro ambientes recifais costeiros do estado de Pernambuco e um ambiente recifal do estado de Alagoas, com diferentes graus de influência antrópica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Coletar indivíduos do peixe recifal marinho *Stegastes fuscus* em ambientes recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga;

- Avaliar os níveis de concentração de HPAs na bile, e quantificar alterações em biomarcadores bioquímicos relacionados ao mecanismo de ação tóxica destes compostos em indivíduos residentes nas áreas de coleta ao longo dos anos de 2018 e 2019;
- Estabelecer ferramentas metodológicas com esta espécie sentinela para o monitoramento de ambientes marinhos recifais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

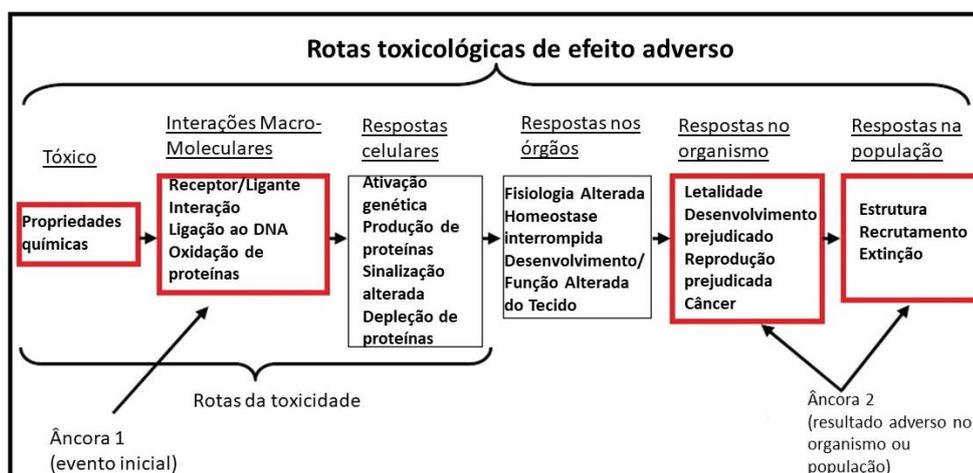
2.1 DEFINIÇÃO DA ECOTOXICOLOGIA

O termo ecotoxicologia foi criado em 1969, por um toxicologista francês chamado René Truhaut (Hoffman *et al.*, 2003), e tinha como premissa a associação entre a ecologia e a toxicologia. Ao longo do tempo, a definição do termo ecotoxicologia foi passando por modificações, com o intuito de abranger os diversos níveis de organizações biológicas. A ecotoxicologia é uma ciência que pode ser definida como dedicada ao estudo e prevenção dos efeitos adversos das emissões antrópicas de substâncias químicas na estrutura, funções e biodiversidade dos ecossistemas (Tarazona e Ramos-Peralonso, 2014).

A ecotoxicologia surgiu da necessidade da compreensão e tomadas de decisões sobre os contaminantes ambientais, principalmente após eventos desastrosos de poluição ambiental, como o uso inconsequente do DDT (diclorodifeniltricloroetano), durante a Segunda Guerra Mundial e a contaminação por metilmercúrio na baía de Minamata (Zhou *et al.*, 2019).

Um conceito muito utilizado pela ecotoxicologia é o conceito “adverse outcome pathway” ou rotas toxicológicas de efeito adverso, que conecta eventos iniciais, como uma interação molecular entre um xenobiótico e uma biomolécula específica, a um resultado adverso que ocorre em outros níveis de organização biológica (Figura 1) (Ankley *et al.*, 2010). Esse conceito se tornou muito importante, pois conseguiu estabelecer uma relação entre a estrutura dos poluentes químicos, efeitos tóxicos e os resultados nocivos da toxicidade biológica (Zhou *et al.*, 2019).

Figura 1 — Diagrama conceitual das principais características do “Adverse Outcome Pathway” ou rota de resultados adversos, adaptado de Ankley *et al.* (2010).



Os estudos científicos focados na área da ecotoxicologia são importantes para a proteção da biodiversidade, pois é possível a partir de estudos dos efeitos adversos dos xenobióticos aos organismos, auxiliar o processo de avaliação dos impactos ao ambiente, chamadas de avaliação de risco ecológico, e a partir disso, se ter uma regulação do uso de produtos químicos.

A avaliação de risco ecológico é considerada como a parte prática da ecotoxicologia, são divididas em retroativas (estima o risco de uma situação existente), preditivas (prevê o risco de uma situação futura) ou comparativas (quando os riscos de duas ou mais ações forem contrastadas durante a tomada de decisão ambiental) (Newman, 2008). Quanto mais cedo a detecção dos distúrbios, melhores são as possibilidades de remediação e a oportunidade de definir a fonte de contaminantes (Berthet, 2015).

2.2 UTILIZAÇÃO DOS PEIXES COMO MODELO PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

Os grupos dos peixes são os mais diversos dos vertebrados de ambientes aquáticos, são descritas no mundo cerca de aproximadamente 32,000 espécies vivas de peixes, distribuídas em 85 ordens e 536 famílias (S. Nelson *et al.*, 2016). Os peixes são amplamente utilizados em estudos relacionados as áreas da saúde humana e ecológica, e são animais com diferentes formas corporais, estilos de vida e fisiologias (Hinton e Di Giulio, 2008). Esses animais habitam uma grande diversidade de ecossistemas aquáticos e isso os tornam modelos viáveis para pesquisas científicas relacionadas as influências de variáveis ambientais (Hinton e Di Giulio, 2008).

Os ambientes aquáticos estão suscetíveis a introdução de xenobióticos por diversas vias, por exemplo, a partir de descargas diretas na água, contaminação proveniente dos ambientes terrestres ou por processos atmosféricos (Van Der Oost *et al.*, 2003). Apenas a presença de um contaminante em um ecossistema aquático não indica quais efeitos prejudiciais podem ocorrer, por isso, é necessário estabelecer conexões entre níveis externos de exposição, níveis internos de contaminação e efeitos adversos (Van Der Oost *et al.*, 2003).

Diversas vantagens são encontradas para o uso dos peixes em estudos científicos. A pesquisa com peixes fornece um ponto de referência evolutivo para outros estudos com vertebrados, muitas espécies de peixes são passíveis de experiências de campo e de laboratório, além da importância econômica de alguns peixes, que possibilitaram estudos aprofundados relacionados a embriologia e a genética de muitas espécies (Powers, 1989).

As pesquisas ecotoxicológicas podem envolver o uso de modelos de peixes trazidos de campo, tentando entender sobre efeitos de contaminantes nos locais que foram coletados e modelos experimentais, onde os animais são expostos a compostos químicos isolados ou em associação com outros contaminantes, buscando entender os efeitos causados por contaminantes específicos. E para isso, diversos biomarcadores de exposição de peixes a poluentes são utilizados como parâmetros na ecotoxicologia, como a níveis moleculares, bioquímicos, histológicos e comportamentais (Ballesteros *et al.*, 2017).

2.2.1 Espécie sentinela

Espécies sentinelas são bioindicadoras específicas, usadas para revelar precocemente a presença e a toxicidade de um ou vários poluentes no ambiente (Berthet, 2015). Características específicas são necessárias para uma espécie ser considerada sentinela, como fornecer informações sobre disfunções ou desequilíbrios que possam está ocorrendo no meio ambiente, ser capaz de acumular contaminantes em níveis muito superiores aos do ambiente, ser uma espécie residente do local e ter facilidade de coleta no campo e subsequente manipulação no laboratório (Berthet, 2015).

2.3 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

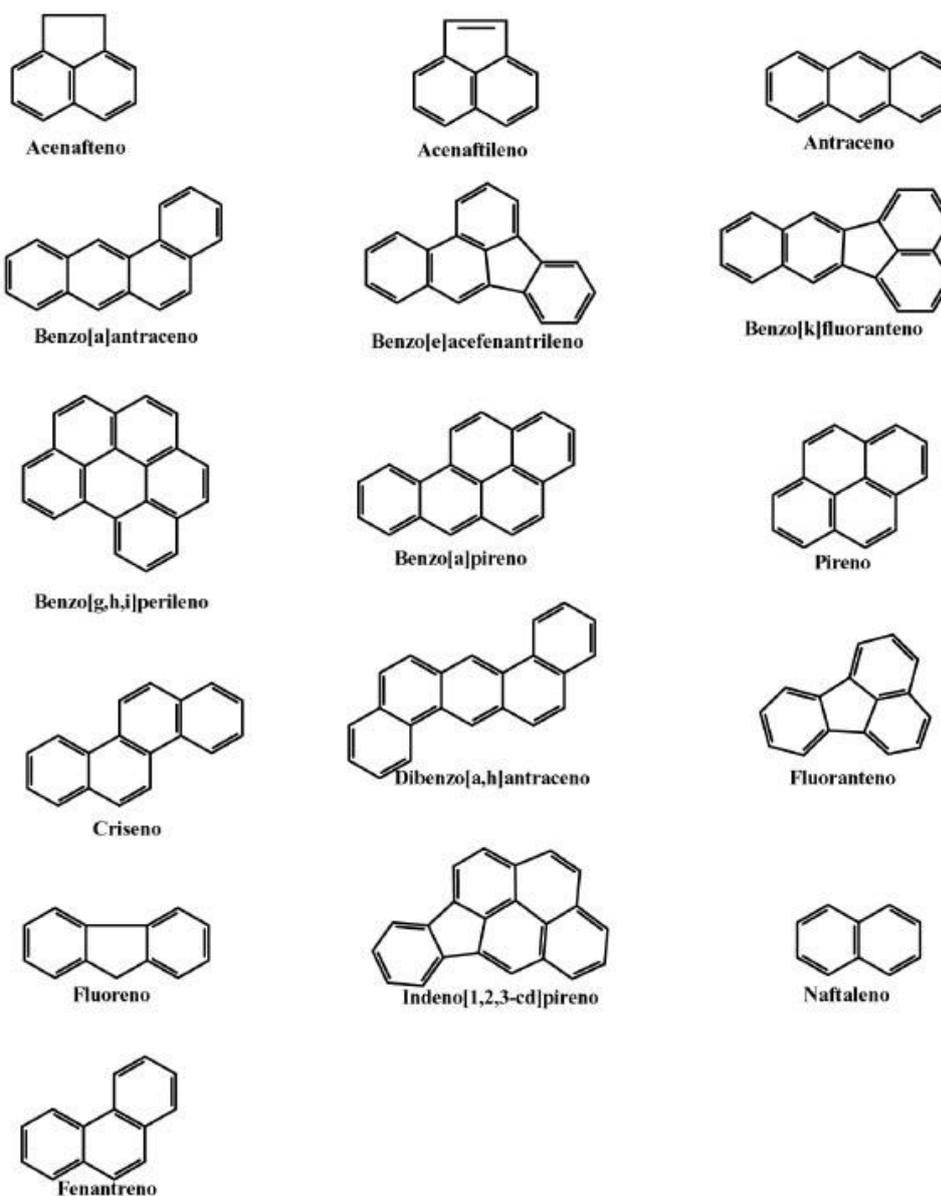
Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são contaminantes ambientais persistentes e onipresentes, que possuem dois ou mais anéis aromáticos fundidos e que possuem

variações nas características físicas (pressão de vapor, solubilidade, K_{ow}) e químicas (resistência à oxidação e redução) (Logan, 2007).

Os HPAs podem ser originados por fontes naturais, como incêndios florestais ou fontes naturais de petróleo, e principalmente a partir de fontes antropogênicas, como a partir da combustão incompleta de combustíveis fósseis, derramamentos de petróleo, descargas de navios, efluentes industriais, entre outros (Whyte, J. *et al.*, 2000).

Essas moléculas que são oriundas de fontes antropogênicas, ainda podem ser classificadas de duas formas: de fontes petrogênicas, compostas por HPAs associados a derramamentos de petróleo bruto, sendo caracterizadas por ter 4 a 6 anéis aromáticos; e as de origem pirogênica, que são formadas pela combustão de combustíveis fósseis, incineração de resíduos, produção de asfalto, consistindo principalmente de moléculas com 2 e 3 anéis aromáticos (Hong *et al.*, 2016). Devido às suas características tóxicas, 16 HPAs foram identificados como poluentes prioritários (Figura 2) pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (Ramdine *et al.*, 2012).

Figura 2 — Estrutura molecular dos HPAs que foram identificados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).



Uma das rotas de dispersão dos HPAs acontece a partir da biodisponibilidade dos compostos na coluna d'água, que podem primeiramente se acumular em sedimentos de grãos finos e em partículas em suspensão, e quando são remobilizados pela água, se tornam biodisponíveis para os organismos, e finalmente se acumulam na biota aquática (Soltani *et al.*, 2019).

Vários efeitos adversos podem ser ocasionados pelos HPAs nos organismos, como alterações genéticas, fisiológicas; como problemas cardíacos, alterações morfológicas, causando efeitos no crescimento e no desenvolvimento, problemas na função imune e mudanças comportamentais (Incardona *et al.*, 2013; Johansen *et al.*, 2017; Soltani *et al.*, 2019).

Em relação a contaminação por HPAs em peixes, mesmo esses compostos sendo lipofílicos, e a bioconcentração de HPAs da água para o tecido sofrer dependência das taxas de captação e eliminação, a maioria dos HPAs absorvidos são biotransformados por enzimas que aumentam sua solubilidade em água, permitindo a excreção e acumulando apenas uma parcela dos HPAs no tecido (Logan, 2007; Trisciani *et al.*, 2011). Mas geralmente, quando esses HPAs sofrem biotransformações enzimáticas, levam à produção de metabólitos, o que pode causar resultados biológicos adversos (Franco e Lavado, 2019).

2.4 DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO

Os ecossistemas marinhos vem, ao longo dos anos, sofrendo impactos gerados por acidentes com derramamento de petróleo, mesmo com o melhoramento das técnicas de segurança na extração e transporte do petróleo bruto, os ecossistemas são afetados continuamente por derramamentos de pequenas e grandes proporções (Brussaard *et al.*, 2016).

Grandes derramamentos de petróleo aconteceram ao redor do mundo, como o acidente com o petroleiro Exxon Valdez em 1989, no Alasca (EUA), liberando cerca de 41 milhões de litros de petróleo bruto e a explosão da plataforma Deepwater Horizon em 2010, no Golfo do México, que causou um derramamento estimado em aproximadamente 507 milhões de litros de petróleo (Colvin *et al.*, 2020).

Eventos com derramamento de petróleo, provocam diversos efeitos deletérios para os organismos marinhos, principalmente em estágios iniciais de vida, por exemplo, efeitos adversos encontrados em estudos com peixes evidenciaram danos celulares (danos ao DNA, neoplasia hepática), fisiológicos (insuficiência cardíaca embrionária, bradicardia, arritmias), reprodutivos (redução da produção do estradiol, crescimento ovariano reduzido e fecundidade reduzida em peixes fêmeas) e comportamentais (redução da natação, dificuldade de assentamento nos recifes por larvas de peixes e conseqüentemente problemas no recrutamento dos juvenis) (Collier *et al.*, 2013; Brette *et al.*, 2014; Johansen *et al.*, 2017).

Quando o óleo entra em contato com o mar, processos químicos geram modificações na composição e nas propriedades do óleo (Gros *et al.*, 2014). Além disso, alguns fatores físicos influenciam nas respostas geradas pelos derramamentos, como o tipo e o volume do óleo, a localização do derramamento e o clima (Colvin *et al.*, 2020).

As propriedades do petróleo são divididas em dois grupos de compostos, os hidrocarbonetos (que contém apenas carbono e hidrogênio) e os heterocompostos (contém

enxofre, nitrogênio, oxigênio, vanádio, níquel ou ferro), e pode ainda ser classificado como materiais leves, médios e pesados, de acordo com a sua densidade (Beens e Brinkman, 2000).

O óleo bruto quando entra em contato com o ambiente marinho, sofre o processo de intemperismo, onde ocorre as transformações e dispersões dos compostos. Um dos processos de dispersão é a evaporação, onde os componentes do petróleo bruto com um ponto de ebulição abaixo de 200° C se volatilizam, levando à remoção de cerca de 35% dos compostos que constituem o óleo (Dutta e Harayama, 2000).

Na emulsificação ocorre a formação de uma emulsão de óleo-água, também conhecido como "mousse de chocolate", esse processo altera significativamente as propriedades e as características do óleo derramado, fazendo com que contenha nessas emulsões cerca de 60 a 85% de água, expandindo o volume original do material (National Research Council Committee on Oil in the Sea: Inputs e Effects, 2003).

A oxidação é o processo que altera a estrutura molecular de compostos como os HPAs, criando novos compostos, a partir de um processo oxidativo, os HPAs são oxidados em álcoois, cetonas e ácidos orgânicos, sendo esses oxidados mais solúveis em água; a oxidação do petróleo ocorre a partir da fotooxidação e da oxidação microbiana (National Research Council Committee on Oil in the Sea: Inputs e Effects, 2003).

2.4.1 Derramamento de petróleo no litoral brasileiro

O litoral brasileiro, com ênfase nos nove estados da região nordeste, foi acometido pelo aparecimento de petróleo bruto desconhecido nas suas praias, entre o período de setembro e novembro de 2019. Cerca de 4000 toneladas de petróleo bruto surgiu na costa nordestina, contaminando diversos ambientes ecologicamente importantes, como estuários e recifes (Escobar, 2019).

Diversas teorias foram criadas sobre a origem do óleo que estava chegando nas praias e a partir de análises químicas feitas pela Petrobrás, se descobriu que ele tinha origem venezuelana (Bbc, 2019). Por questões econômicas, ligadas aos Estados Unidos e a Venezuela, se cogitou que navios “fantasmas” (quando os navios não autorizados desligam seus GPS e navegam em alto mar para evitar taxas) poderiam ter relação com esse acontecimento (Bbc, 2019).

A Polícia Federal brasileira em suas investigações concluiu que o principal suspeito era um navio grego, o Bouboulina, que passou pela costa brasileira no final de julho (Escobar,

2019). Porém, as investigações são inconclusivas e ainda não foi confirmado o real culpado pelo ocorrido.

O Governo Federal brasileiro foi duramente criticado pela omissão e demora a acionar o Plano Nacional de Contingência para Incidentes de Poluição por Óleo em Águas sob Jurisdição Nacional (Cerioni, 2019). O que provocou sérios problemas para a contenção, coleta e destinação do óleo que chegou nas praias. Esse incidente ficou conhecido como um dos maiores desastres ambientais no Brasil, visto que atingiu grandes proporções e afetou áreas de grande importância ecológica e econômica.

Quando ocorrem acidentes com petróleo, devem ser acionadas as Cartas de Sensibilidade Ambiental ao Óleo (Cartas SAO), que são utilizadas em ações de planejamento para situações imprevistas e execução de respostas a incidentes causados pela poluição por óleo, de acordo com o Ministério do Meio Ambiente (Mma), o que poderia ter auxiliado em tomadas de decisões mais eficazes para soluções de problemas.

O petróleo bruto que chegou nas praias foi na forma emulsificada, que é quando ocorre a mistura da água no óleo, fazendo com que ocorra a expansão do volume do material (Speight, 2018), isso fez com que grandes placas de óleo fossem retiradas rapidamente; pois o óleo não estava em estado líquido, o que dificultaria bastante a remoção física do óleo. Porém, partículas menores desse óleo podem ter se acumulado em sedimentos ou organismos, e os efeitos tóxicos que estão sendo causados para biota aquática ainda precisam ser estudados

2.5 BIOMARCADORES ECOTOXICOLÓGICOS

Os biomarcadores são conceituados como medidas de fluidos, células, tecidos ou organismos inteiros, que representam em níveis bioquímicos, celulares, fisiológicos ou comportamentais, a exposição a contaminantes ou a magnitude da resposta desses xenobióticos (Sarkar *et al.*, 2006).

Os biomarcadores podem ser classificados como de exposição, efeito e suscetibilidade aos efeitos de exposição, além disso, para indicar efeitos em biomarcadores específicos dos contaminantes, foram classificados também como biomarcadores de danos e defesa (Bartell, 2014).

Os biomarcadores de defesa possuem como característica a utilização dos mecanismos de defesa contra os contaminantes, como por exemplo, a atividade das enzimas de desintoxicação etoxirresorufina orto-deetilase (EROD) e da glutatona S-transferase (Narbonne *et al.*), fluorescências de compostos aromáticos na bile dos peixes, onde estão os metabólitos

solúveis que serão excretados, e enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), que são responsáveis por proteger as células das espécies reativas de oxigênio (Ballesteros *et al.*), fazendo com que ocorra a redução do estresse oxidativo (Duarte *et al.*, 2019).

Os biomarcadores de danos são relacionados as medidas que indicam danos celulares, bioquímicos etc, como danos ao DNA, alterações nos níveis de peroxidação lipídica (LPO) e inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), que causa efeitos neurotóxicos (Duarte *et al.*, 2019).

A utilização desses biomarcadores pode ser realizada simultaneamente em estudos ecotoxicológicos e podem ser analisados em diferentes tecidos nos organismos sentinelas, para verificar qual se mostra mais adequado em um programa de biomonitoramento (Fabrini *et al.*, 2018). Os biomarcadores são ferramentas úteis em várias etapas do processo de avaliação de riscos, sobre o efeito, a exposição e avaliação de perigos, caracterização ou classificação de riscos (Van Der Oost *et al.*, 2003).

2.5.1 Metabólitos de HPAs na bile de peixes

O processo de metabolização e biotransformação dos HPAs em peixes ocorre principalmente no fígado, através do processo de biotransformação de fase I e II, após isso, os produtos metabolizados são armazenados na vesícula biliar e posteriormente excretados juntos com a bile, durante o processo de digestão dos alimentos (Beyer *et al.*, 2010).

Devido a eficiência da metabolização e excreção dos HPAs pelos peixes, a detecção desses compostos é menor por análises químicas no fígado ou no músculo (Aas, Endre *et al.*, 2000). Porém, como os HPAs e seus metabólitos são armazenados junto com a bile, e possui propriedades fluorescentes e bem características para cada molécula, as medidas de metabólitos de HPAs podem ser obtidas por análises da fluorescência da bile (Aas, Endre *et al.*, 2000).

Várias técnicas analíticas podem ser utilizadas para estimar as fluorescências dos compostos aromáticos na bile dos peixes, como por exemplo, o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o de espectrometria de fluorescência síncrona (SFS) e a fluorescência fixa de comprimento de onda (FF), sendo o último o mais utilizado por ser uma análise mais barata e rápida (Vuorinen *et al.*, 2006).

O método FF é considerado semiquantitativo, pois mesmo em um par de comprimento de onda específico para cada molécula de HPA, vários compostos podem contribuir para a fluorescência, mesmo que com valores de fluorescência muito pequenos (Vuorinen *et al.*,

2006). Comparações foram realizadas entre os métodos CLAE, que é considerado um método quantitativo, com alta resolução e sensibilidade, e o de fluorescência fixa, e os resultados mostraram que as concentrações relativas de HPAs obtidas pelos dois métodos foram semelhantes, confirmando a confiabilidade do uso da FF (Lin *et al.*, 1996).

O método de FF é baseado na análise de biles diluídas usando pares específicos de comprimentos de onda de excitação/emissão para cada molécula de HPAs, em geral moléculas menores, que possuem menor número de anéis aromáticos, por exemplo, naftaleno (com 2 anéis), requerem maior energia de excitação (luz de excitação em comprimentos de onda mais curtos), utilizando os comprimentos de 290/335 nm, comparados com HPAs com maior número de anéis aromáticos, por exemplo, benzo[a]pireno (BaP) com 5 anéis, com comprimentos de onda de 380/430 nm (Lin *et al.*, 1996; Beyer *et al.*, 2010).

A diluição da bile é necessária, pois o líquido biliar é formado por uma mistura complexa e outros compostos podem absorver a luz que entra na cubeta ou na placa, onde são realizados os testes. Provocando o que é chamado de efeito de filtro interno, que depende da densidade da bile, que tem relação com o status de alimentação dos animais, e do fator de diluição utilizado, sendo as proporções de diluição das amostras de 1000 a 2000 vezes as que se comportam mais lineares nas curvas de concentração-resposta (Aas, Endre *et al.*, 2000).

2.5.2 Biomarcadores enzimáticos

Os biomarcadores enzimáticos são indicadores sub-letais específicos da exposição de peixes a contaminantes e são considerados os biomarcadores mais sensíveis a serem usados como um alerta precoce sobre problemas com exposição aos xenobióticos (Van Der Oost *et al.*, 2020). De acordo com Van Der Oost *et al.* (2020) é importante a investigação das expressões dos biomarcadores e suas ligações com deficiências fisiológicas, bem como o impacto nas populações de peixes, para se ter um aumento da valoração das análises bioquímicas e auxiliar a avaliação dos riscos ambientais (ERA).

As enzimas mais estudadas como biomarcadores de exposição aos HPAs são enzimas do sistema P450, que são chamadas de enzimas de biotransformação hepática de fase I, como a aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH) e a etoxiresorufina orto-deetilase (EROD), além das enzimas de biotransformação de fase II, como a glutathione S-transferase (Anderson e Lee, 2006).

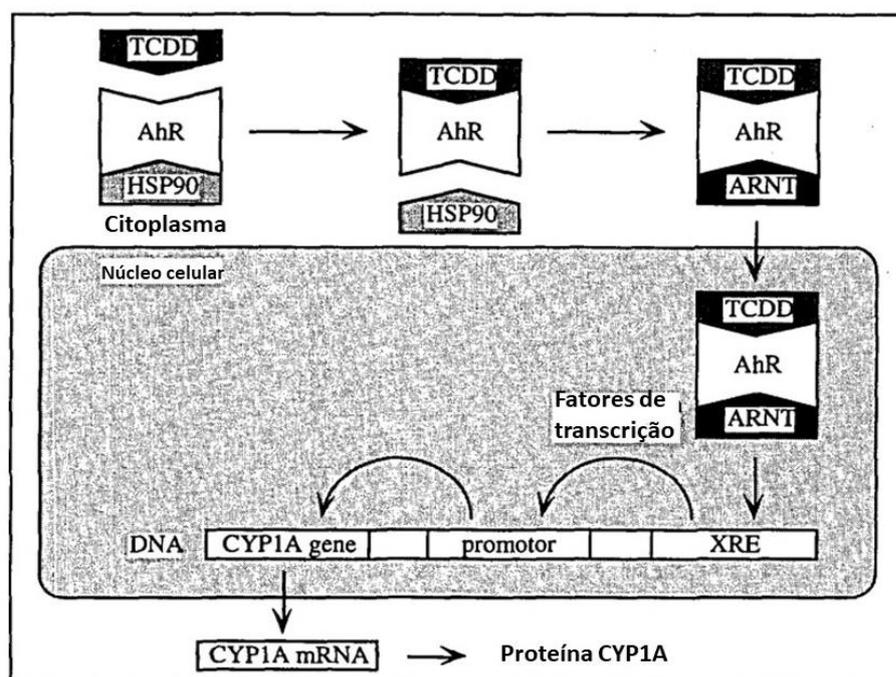
2.5.2.1 Sistema do citocromo P450 e a etoxiresorufina orto-deetilase (EROD)

Um biomarcador frequentemente utilizado como de exposição a xenobióticos é o sistema do citocromo P450, que é responsável pelo transporte de elétrons acoplados ao retículo endoplasmático, onde o citocromo P450 insere espécies reativas de oxigênio nas moléculas dos contaminantes, gerando uma oxidação das moléculas e facilitando sua excreção (Anderson e Lee, 2006).

A indução especificamente da subfamília CYP1A pode acontecer a partir da exposição a dibenzo-p-dioxinas tetracloradas (TCDDs), bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e pesticidas organoclorados (OCPs) (Gagnon e Rawson, 2017).

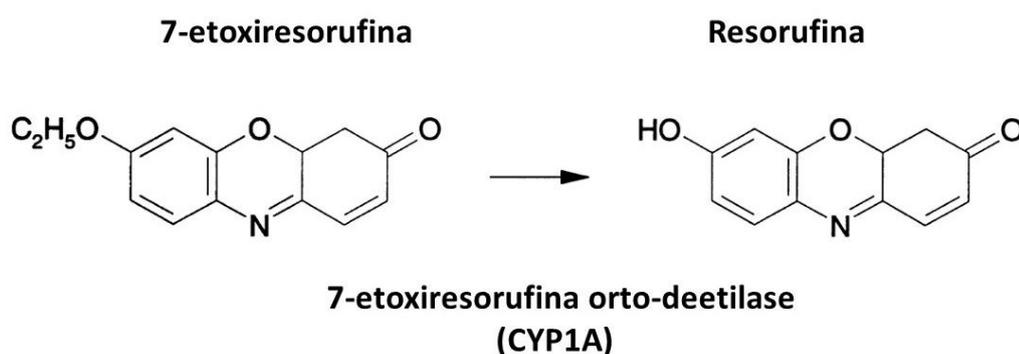
Essa exposição leva a um estímulo onde ocorre a ligação do xenobiótico a um complexo proteico, que é formado pelo receptor aril-hidrocarboneto (AhR) e a proteína de choque térmico 90 (hsp 90), após isso, o receptor se liga a enzima aril-hidrocarboneto transferase nuclear (ARNT), que por sua vez se liga a uma parte específica do DNA, e com isso ocorre a ativação e transcrição do gene CYP1A, a tradução do RNA mensageiro do CYP1A para produzir a proteína CYP1A e depois a modificação pós-traducional para produzir a enzima ativa (Jales *et al.*) (Bucheli e Fent, 1995; Goksøyr, 1995).

Figura 3 — Mecanismo de indução do CYP1A pela exposição a dioxina, a transdução de sinal é mediada pelo AhR, adaptado de Bucheli e Fent (1995).



A proteína CYP1A e sua atividade catalítica, poder ser medida a partir da análise da etoxiresorufina orto-deetilase (EROD), especificamente a partir da capacidade dessa proteína de converter um substrato (7-etoxirresorufina) em um produto fluorescente (resorufina) (Whyte, J. *et al.*, 2000). A atividade EROD é descrita pela taxa de deetilação da CYP1A mediada por um substrato, 7-etoxirresorufina (7-ER), levando à formação de resorufina hidroxilada (Figura 4), a atividade catalítica é um indicador da quantidade de CYP1A presente em uma amostra de tecido, sendo possível a medição da atividade da EROD a partir da concentração de resorufina (Whyte, J. *et al.*, 2000).

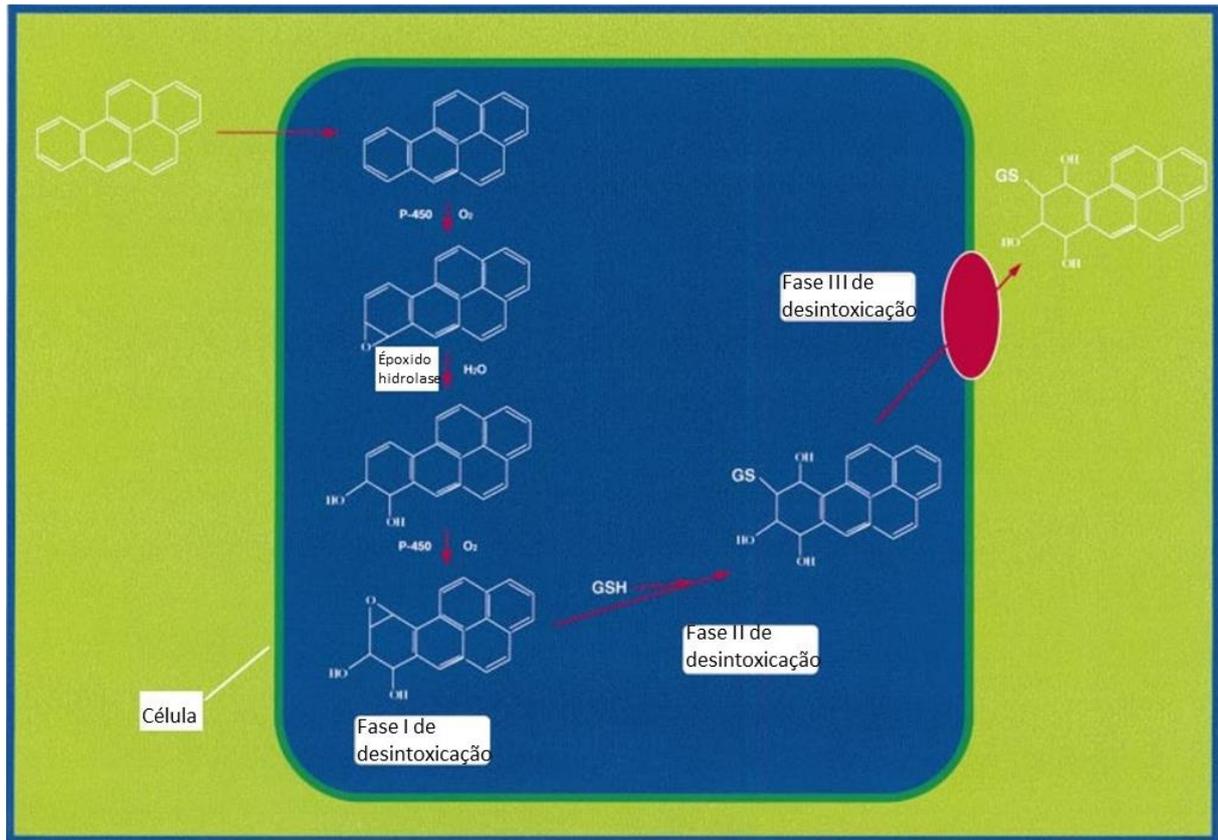
Figura 4 — Fórmulas estruturais de 7-etoxirresorufina e resorufina, adaptado de Whyte, J. *et al.* (2000).



2.5.2.2 Glutathione S-transferase

A glutathione S-transferase é uma enzima de biotransformação de fase II, que tem o papel de desintoxicação, ela é responsável por conjugar a glutathione reduzida (GSH) com compostos eletrofílicos (Figura 5), a partir da formação de uma ponte de tioéter e é utilizada como transportadora de moléculas responsáveis pela disponibilidade de compostos lipofílicos para as enzimas da fase I, dificultando a ligação dos contaminantes com outras moléculas (Bartell, 2014).

Figura 5 — A indução do citocromo P450 a exposição ao benzo [a] pireno e a atuação das enzimas de biotransformação de fase I e II, para a excreção do xenobiótico da célula (Sheehan *et al.*, 2001).



A GST fornece proteção celular contra efeitos tóxicos de uma grande quantidade de compostos químicos endógenos e ambientais, tendo uma especificidade do substrato bastante ampla, sendo exemplos de compostos que são conjugados: os HPAs, PCBs e pesticidas (por exemplo, alacloro, atrazina, DDT, lindano) (Hinton e Di Giulio, 2008).

2.5.2.3 Enzimas de defesa antioxidante

A maior parte do oxigênio molecular consumido pelos animais passa por um processo de redução tetravalente do O_2 à H_2O , sendo um processo redutor de quatro elétrons que prossegue sequencialmente para produtos de um, dois e três elétrons, esses são processos naturais relacionados a oxidação dos alimentos e à produção de energia, e essa redução faz com que sejam formadas as espécies reativas de oxigênio (Livingstone, 2001; Hinton e Di Giulio, 2008). As EROs são moléculas altamente reativas e entre elas estão o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-) (Santana *et al.*, 2018).

A produção regulada dos radicais livres é importante para o funcionamento fisiológico normal dos organismos, mas uma proporção de cerca de 2 a 3% desses radicais livres podem não ser reparados pelas defesas antioxidantes, causando danos oxidativos as células e quando

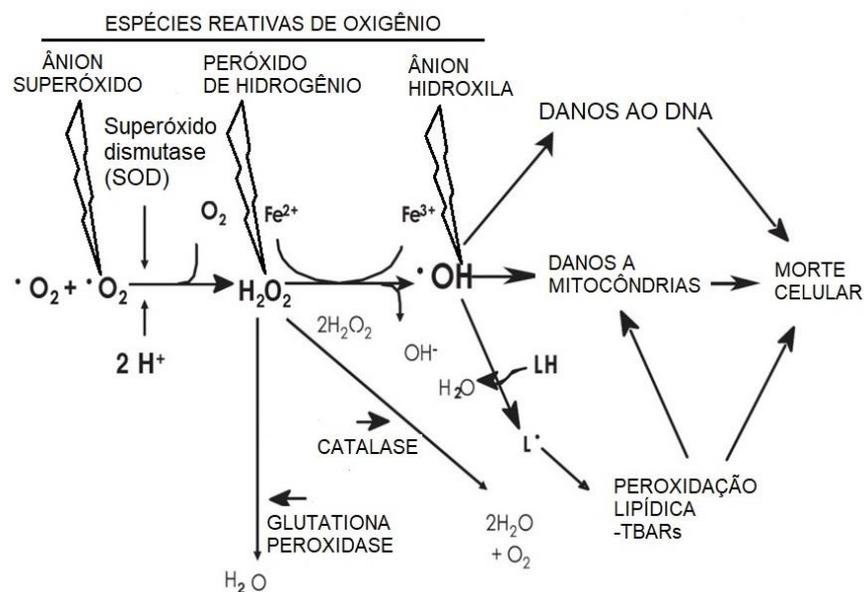
há o desequilíbrio entre a geração e a neutralização das EROS, se desencadeia efeitos adversos denominados de estresse oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2006).

A quantidade de EROs no sistema biológico pode ser aumentada a partir da presença de uma variedade de xenobióticos, como a partir de contaminantes orgânicos, como: HPAs, hidrocarbonetos alogenados (bromobenzeno, dibromometano, PCBs), dioxinas, contaminantes metálicos (por exemplo, o alumínio, arsênico, Cd, Cr, Hg, níquel, vanádio), contaminantes do ar (NO₂, O₃, SO₂), entre outros (Livingstone, 2001).

O aumento da produção das EROs pode ser estimulado, por exemplo, a partir das peroxidases e algumas enzimas do CYP450, que estão relacionadas a catálise da oxidação de um elétron dos HPAs e de outras moléculas, produzindo radicais tóxicos capazes de provocar o estresse oxidativo (Figura 6) (Franco e Lavado, 2019).

O sistema de defesa antioxidante é utilizado para neutralizar e reparar o aumento da taxa de EROs no organismo, esses antioxidantes são divididos em baixo e alto peso molecular, entre os de baixo peso molecular estão os compostos: glutathiona reduzida, ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides (incluindo β-caroteno), retinol (vitamina A), α-tocoferol (vitamina E) e os de alto peso molecular estão: a superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase (Lushchak, 2011).

Figura 6 — As espécies reativas de oxigênio provocando o estresse oxidativo, ocasionando danos celulares e as enzimas antioxidantes atuando no processo de neutralização e reparação dessas moléculas.



As enzimas antioxidantes são responsáveis por equilibrar os processos pró-oxidantes e oxidantes, para manter o funcionamento fisiológico saudável do organismo, porém, esse equilíbrio não é perfeito, de modo que podem ocorrer impactos celulares prejudiciais como a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA (Hinton e Di Giulio, 2008).

2.5.2.3.1 CAT

A catalase é uma enzima encontrada em diversos organismos aeróbicos e anaeróbicos e tem como função principal a quebra das moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (Kaushal *et al.*, 2018). A localização principal da catalase nas células dos vertebrados é nas organelas peroxissomos, essas organelas estão relacionadas a oxidação dos ácidos graxos e o H_2O_2 é produzido como subproduto desse processo, dessa forma, a catalase evita danos aos peroxissomos e também impede que o H_2O_2 se desloque para outros locais da célula (Hinton e Di Giulio, 2008).

2.5.2.4 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica consiste em um conjunto de reações em cadeia ocasionadas por radicais como hidroxila, especialmente para os ácidos graxos poliinsaturados, que possuem duas ou mais ligações duplas de carbono, o que os tornam sensíveis às reações oxidativas, onde esse processo pode levar à perda da integridade da membrana (Valavanidis *et al.*, 2006; Santana *et al.*, 2018).

Nos peixes, a peroxidação lipídica é medida pela formação de um produto secundário, o malondialdeído (MDA), e este, é medido a partir do ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (Almroth *et al.*, 2005). O ensaio é realizado a partir da reação do MDA, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sob condições de alta temperatura e acidez, e é gerado um produto colorido que pode ser medido espectrofluorometricamente (Almroth *et al.*, 2005).

2.5.2.5 Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase é uma enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor que é liberado quando um impulso nervoso é transmitido de uma célula nervosa para outra (Stenersen, 2004).

A AChE é considerada um biomarcador das alterações nas junções sinápticas colinérgicas e simpáticas neuromusculares do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo considerado um biomarcador sensível para a exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos (Bernal-Rey *et al.*, 2020). A exposição aos pesticidas inibe a atividade da AChE, fazendo com que a inativação da acetilcolina seja impedida, o que pode causar o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica (Bernal-Rey *et al.*, 2020).

Estudos indicam que além dos organofosforados e carbamatos, a AChE também pode sofrer alterações causadas pela exposição a metais pesados, herbicidas à base de glifosato e HPAs (Kang e Fang, 1997; Bernal-Rey *et al.*, 2020).

3 ESPÉCIE MODELO

Stegastes fuscus (Cuvier,1830), conhecida popularmente como peixe donzela ou castanheta (Figura 7), é uma espécie da família Pomacentridae, endêmica da costa brasileira e considerada uma das mais abundantes dos recifes costeiros rasos do Atlântico Sudoeste (Feitosa *et al.*, 2012). Nos recifes do litoral Pernambucano, esta espécie é particularmente abundante, chegando a perfazer 15% do total numérico da ictiofauna (Ferreira *et al.*, 2004). *Stegastes fuscus* domina principalmente os topos recifais, onde defende territórios ricos em algas de outros competidores herbívoros. Por realizar tal comportamento, se torna uma grande modificadora de habitat, tornando mais produtiva e diversa a comunidade bentônica associada aos seus territórios (Ferreira *et al.*, 1998). Esta espécie, apesar de apresentar um tamanho relativamente pequeno, possui uma alta longevidade, podendo chegar aos 15 anos de idade (Schwamborn e Ferreira, 2002).

Devido a sua grande abundância e distribuição, longevidade razoável, baixa mobilidade e papel-chave em ambientes recifais, esta espécie é uma forte candidata ao biomonitoramento como sentinela em ambientes recifais.

Figura 7— Indivíduo de *Stegastes fuscus*, na fase adulta, nos recifes de coral (Autor: João Lucas Feitosa).



4 ÁREAS DE ESTUDO

As praias amostradas nesse estudo são localizadas no estado de Pernambuco e de Alagoas (Nordeste do Brasil). Em Pernambuco, as áreas recifais analisadas foram as praias de Boa Viagem, Paiva, Suape e Serrambi; e apenas a praia de Japaratinga está localizada no estado de Alagoas.

O estado de Pernambuco possui uma zona costeira de 187 km de extensão, abrangendo 21 municípios, onde concentra cerca de 44% da sua população, sendo divididos os municípios em três zonas: norte (Goiana, Itamaracá, Igarassu, Abreu e Lima, Paulista, Itapissuma e Itaquitinga), metropolitana (Olinda, Recife, Jaboatão dos Guararapes, São Lourenço da Mata, Camaragibe e Moreno) e sul (Cabo de Santo Agostinho, Ipojuca, Sirinhaém, Rio Formoso, Tamandaré, Barreiros e São José da Coroa Grande) (Araújo *et al.*, 2007).

O clima dos pontos de coleta é do tipo tropical úmido, sendo os meses de maio, junho e julho os meses considerados mais chuvosos, enquanto que os meses de outubro, novembro e dezembro são denominados como os meses mais secos (Madruga Filho, 2004).

A praia de Boa Viagem está localizada na região metropolitana do Recife e é a única praia oceânica da cidade, possuindo cerca de 8km de extensão e faz fronteira com rios e canais que formam uma enorme planície alagada, o território da cidade é caracterizado pela grande ocupação e desenvolvimento urbano (Silva *et al.*, 2008).

A praia da Boa Viagem possui grande importância ecológica e paisagística, com paisagens naturais como o Parque dos Manguezais e os recifes de arenito (beachrocks), porém vem sofrendo com problemas da urbanização, como o acúmulo de lixo na praia, intervenções

contra o avanço do mar, retirada da vegetação, verticalização intensa e poluição (Ferreira Da Costa *et al.*, 2008).

A praia do Paiva está localizada na região Sul do estado, na cidade do Cabo de Santo Agostinho, possui cerca de 8,6 km de extensão, e é um local com grande diversidade ecológica, em sua extensão estão localizados os estuários dos rios Pirapama e Jaboatão, além disso, existe uma restinga, que se localiza entre a faixa de praia e possui recifes de corais que formam piscinas naturais na maré baixa (Pontes e Castilho, 2016). O local vem sofrendo influências do complexo industrial portuário de Suape (CIPS) e do empreendimento da Reserva do Paiva.

A praia de Suape está situada no Cabo de Santo Agostinho e é um local que sofre intensas influências do CIPS, que é um complexo industrial que começou a funcionar a partir de 1986 e é composto por empreendimentos, como: Refinaria Abreu e Lima e Petroquímica (Petrobrás); Estaleiro Atlântico Sul (EAS); Energética Suape; Impsa Wind Power, Bunge e Tecon Suape (Oliveira, 2013).

Antes da implantação do CIPS, a praia de Suape possuía ligações com os rios Massangana, Tatuoca, Ipojuca e Merepe, mas após a implantação do porto, o local passou por transformações, onde apenas os rios Massangana e Tatuoca continuaram tendo ligações com a baía, devido ao aterro das áreas que interligavam a baía aos rios Ipojuca e Merepe (Junior *et al.*, 2011).

Estudos relataram alterações ambientais após a implantação do CIPS, como: desmatamento e inundação de áreas de mangue, mudanças nos padrões hidrodinâmicos, mudanças estruturais nas comunidades zooplancônicas, diminuição da biodiversidade do ictioplâncton e introdução de poluentes nos ambientes recifais e estuarinos (Lemos, R. T. D. O. *et al.*, 2014).

A Praia de Serrambi está situada no município de Ipojuca, localizada na região sul do estado e possui aproximadamente 4 km de extensão, é uma praia protegida por recifes de arenito, onde em épocas de alta estação, recebe influências de atividades turísticas, o que aumenta a geração de resíduos sólidos e detritos (Jales *et al.*, 2013).

A praia de Japaratinga está localizada no estado de Alagoas, a cerca de 145 km de distância da cidade do Recife, e faz parte da Área de Preservação Ambiental Costa dos Corais (APACC). Dentre os ambientes recifais amostrados, Japaratinga pode ser considerado o local menos impactado com os efeitos relacionados a urbanização, possuindo uma densidade populacional em cerca de 8 mil habitantes, de acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística); sendo os maiores impactos sofridos relacionados ao turismo.

5 RESPOSTAS DE BIOMARCADORES ECOTOXICOLÓGICOS NO PEIXE DE RECIFE DE CORAL *Stegastes fuscus* ANTES E APÓS A CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO BRUTO NO LITORAL DO NORDESTE BRASILEIRO

Resumo

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos de significativo potencial tóxico presentes na composição do petróleo e derivados que podem contaminar ecossistemas aquáticos costeiros através de diversas atividades antrópicas, incluindo acidentes ambientais. Recifes de coral são ecossistemas aquáticos com importância ecológica e econômica pelos diversos serviços ecossistêmicos que propiciam. *Stegastes fuscus* (Cuvier, 1830), conhecida como peixe-donzela, é uma espécie chave dos recifes de coral brasileiros, e este trabalho teve como objetivo a aplicação de metodologias de monitoramento ecotoxicológico com esta espécie sentinela para o monitoramento de ambientes recifais costeiros. Nesse estudo foram realizadas análises espaciais e temporais de HPAs biliares e biomarcadores bioquímicos em *Stegastes fuscus* em 5 áreas recifais ao longo da costa pernambucana e alagoana, entre setembro de 2018 e outubro de 2019, incluindo período imediatamente após a contaminação da costa pernambucana e nordestina por petróleo emulsificado, de setembro a outubro de 2019. A bile dos peixes foi analisada por fluorescência fixa para estimar a dose interna biliar para os HPAs naftaleno (Naf_{bile}), fenantreno (Fen_{bile}), criseno (Cri_{bile}) e pireno (Pir_{bile}). Os biomarcadores bioquímicos analisados foram as enzimas de biotransformação de fase I (etoxiresorufina ortodeetilase, EROD) e fase II (glutathione S-transferase, GST), de defesa antioxidante (catalase, CAT), lipoperoxidação (TBARS) e acetilcolinesterase (AChE). A análise espacial da dose biliar interna dos HPAs em *Stegastes fuscus* indicou que peixes da área recifal da praia de Serrambi apresentaram menores medianas para naftaleno e fenantreno, enquanto que peixes da área recifal de Japaratinga, apresentaram menores medianas para criseno e pireno, em comparação com as áreas recifais de Boa Viagem, Paiva e Suape. Além disso, amostras de Japaratinga apresentaram níveis basais relativamente estáveis dos biomarcadores bioquímicos analisados, e foi caracterizada como área referência regional aceitável para comparações entre os locais. A quantificação dos HPAs biliares foi diagnóstica de um aumento significativo da bioconcentração de HPAs pelos peixes do Paiva e de Suape decorrentes da contaminação pelo petróleo que atingiu estas praias. Após o evento de contaminação por petróleo no litoral, foi verificado aumento significativo na área recifal impactada da Praia do Paiva de Fen_{bile} , Cri_{bile} e Pir_{bile} de 378%, 342% e 358%, respectivamente, relativos aos valores observados na área de Japaratinga. Na área recifal impactada de Suape, foi

verificado aumento significativo de Fen_{bile}, Cri_{bile} e Pir_{bile} de 104%, 89% e 170%, respectivamente, relativos aos valores observados na área de Japaratinga. Além disso, o aumento dos HPAs biliares criseno e pireno, que são conhecidos como potenciais indutores da enzima de biotransformação de fase I (EROD), esteve associado a um aumento da atividade da EROD pelos peixes do Paiva e de Suape após a contaminação pelo petróleo de 599% e 484%, respectivamente, quando comparados com a atividade da EROD nas amostras de Japaratinga. A atividade da enzima de defesa antioxidante catalase também aumentou em 254% e 261% nas áreas do Paiva e Suape, respectivamente, quando comparadas a atividade da catalase nas amostras de Japaratinga. A análise das atividades da GST, AChE e da peroxidação lipídica (TBARS) não apresentaram uma associação significativa com os HPAs biliares. O uso da espécie *Stegastes fuscus* como organismo sentinela para o monitoramento de áreas recifais costeiras através da análise dos biomarcadores ecotoxicológicos fluorescência de HPAs na bile, EROD e CAT se mostrou sensível e eficiente na identificação de padrões espaciais de contaminação e alterações biológicas causadas por HPAs nas áreas recifais analisadas, antes e após o evento de contaminação por petróleo na costa pernambucana.

Palavras-chave: Petróleo. HPAs. Biomarcadores. EROD.

5.1 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos hidrofóbicos persistentes, que podem ser originados a partir de processos naturais, como incêndios florestais, e através de ações antrópicas, como a combustão de combustíveis fósseis ou derramamentos de petróleo bruto (Hong *et al.*, 2016).

Grandes acidentes com derramamento de petróleo já ocorreram pelo mundo e apesar de terem se tornado menos frequentes ao longo do tempo, ainda continuam sendo alvo de grande preocupação, pelo potencial de causar impactos ambientais, econômicos e sociais (Colvin *et al.*, 2020). Além disso, fontes pontuais de poluição, como a extração e o transporte do petróleo bruto, são responsáveis por inserções desses compostos em diversos ambientes (Brussaard *et al.*, 2016).

O petróleo bruto pode conter em sua constituição cerca de 0,1% a 10% de HPAs e dentre os compostos que constituem o petróleo, os HPAs são considerados os mais tóxicos e os que podem causar maiores danos para a biota aquática (Khursigara *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2019).

O litoral brasileiro, principalmente a região nordeste, foi acometido pela chegada de toneladas de petróleo bruto emulsificado, de origem desconhecida, entre os meses de setembro a novembro de 2019, caracterizando um desastre ambiental de grande escala, segundo os critérios das Cartas de sensibilidade ambiental. Quantidades desconhecidas dessa emulsão de petróleo provavelmente ainda estão submersas ao longo da costa e possivelmente penetradas nos interstícios de rochas em ambientes recifais ou soterradas sob o sedimento, o que torna difícil a remoção desse óleo.

Áreas como os recifes de corais são identificadas como prioritárias para preservação e avaliação de danos após casos de derramamento de petróleo, de acordo com as Cartas de Sensibilidade Ambiental. Esses ecossistemas são ambientes que possuem uma grande diversidade biológica e fornece, em média, cerca de US\$ 30 bilhões por ano em serviços ecossistêmicos prestados (Johansen *et al.*, 2017), sendo ambientes de grande relevância, do ponto de vista ambiental e econômico.

O uso de biomarcadores ecotoxicológicos tem sido proposto para a avaliação dos efeitos causados pelos contaminantes químicos no monitoramento de ambientes aquáticos, sendo que biomarcadores podem ser entendidos como parâmetros biológicos quantitativos que abrangem respostas moleculares, bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais, e que sejam sensíveis a exposição a estes contaminantes (Van Der Oost *et al.*, 2020).

O grupo dos peixes é utilizado em estudos que avaliam respostas biológicas decorrentes de sua exposição a contaminantes ambientais como os HPAs (Van Der Oost *et al.*, 2003), sendo que alterações deletérias em diversos níveis de organização biológica em peixes podem ser observadas, incluindo alterações bioquímicas, histopatológicas, no sistema imune, genéticas, reprodutivas e comportamentais (F. Payne *et al.*, 2003). Em estudos realizados com peixes, após exposição a HPAs, foram relatados efeitos deletérios, como: neoplasias hepáticas (Myers *et al.*, 2003), insuficiência cardíaca embrionária (Brette *et al.*, 2014), diminuição na velocidade média da natação (Lucas *et al.*, 2016) e dificuldade de assentamento das larvas de peixes em mesocosmos que simulavam os recifes de coral (Johansen *et al.*, 2017).

Os HPAs podem entrar no sistema biológico dos peixes através da absorção pela superfície do corpo e brânquias ou pela ingestão de alimentos contaminados (Ruddock *et al.*, 2002). Após esses compostos terem sido absorvidos, eles são distribuídos por todo o organismo e passam por uma biotransformação no fígado, para se tornarem mais hidrofílicos e conseqüentemente serem excretados pelos animais via vesícula biliar e os processos de digestão. Essa biotransformação é catalisada por enzimas da fase I, como citocromo P450, responsáveis por oxidar, reduzir ou hidrolisar os compostos, e por enzimas da fase II, como a glutathione S-

transferase (GST) que catalisam a conjugação da glutationa (GSH) a xenobióticos (Santana *et al.*, 2018).

A biotransformação de fase 1 de fase 2 dos HPAs tem o potencial de gerar espécies reativas de oxigênio (Ballesteros *et al.*) (Ballesteros *et al.*), que podem danificar lipídeos, proteínas e DNA (Lushchak, 2011), e as enzimas de defesa antioxidante tem como função neutralizar ou degradar as EROs, como a catalase (CAT), responsável pela conversão de H₂O₂ em água e oxigênio, que tem sendo utilizada como um biomarcador de exposição a HPAs (Santana *et al.*, 2018). Quando ocorre a alteração do equilíbrio entre a formação das EROs e a neutralização e reparação feita pelas enzimas de defesa antioxidante, pode ocorrer danos oxidativos as moléculas, como a peroxidação lipídica (LPO), podendo levar à perda da integridade da membrana (Santana *et al.*, 2018).

O uso de uma abordagem baseada em biomarcadores ecotoxicológicos pode ajudar a entender sobre os efeitos provocados por esses contaminantes na biota aquática e auxiliar na avaliação dos riscos ambientais (ARA). Apesar de existir um significativo conhecimento estabelecido sobre a toxicidade de HPAs para peixes, estudos são escassos em relação a efeitos tóxicos de HPAs em espécies de peixes característicos de ambientes marinhos recifais (Johansen *et al.*, 2017).

A espécie *Stegastes fuscus* (Cuvier, 1830), é uma espécie endêmica da costa brasileira e é considerada uma espécie chave nos ambientes de recifes de coral, são animais que defendem o seu território e por isso se tornam grandes modificadoras do habitat, tornando mais produtiva e diversa a comunidade bentônica associada aos seus territórios (Ferreira *et al.*, 1998).

Stegastes fuscus é uma espécie nativa com potencial para ser utilizada como organismo-sentinela, por atender características necessárias para o uso de uma espécie em estudos ecotoxicológicos, como: ser uma espécie de grande relevância ecológica, ser residente dos recifes de coral, abundante e com fácil identificação no campo, a espécie não está sob nenhuma proteção legal e é possível a manutenção dos indivíduos em laboratório (Gold-Bouchot *et al.*, 2017).

O objetivo desse trabalho foi obter um diagnóstico da contaminação por HPAs e do potencial tóxico destes contaminantes para a espécie *Stegastes fuscus*, em cinco ambientes recifais costeiros do nordeste brasileiro e estabelecer ferramentas metodológicas com a espécie para o monitoramento de ambientes marinhos recifais.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 LOCAIS DE COLETA

No sentido Norte-Sul as coletas foram realizadas em cinco áreas recifais, sendo quatro no estado de Pernambuco e uma no estado de Alagoas, codificadas área recifal 1 (AR1) na Praia de Boa Viagem, AR2 na Praia do Paiva, AR3 no Complexo Estuarino de Suape (CES), AR4 na Praia de Serrambi, e AR5 na Praia de Japaratinga, AL (Figura 8). Estas áreas recifais apresentam diferentes graus de influência antrópica. AR1 na praia de Boa Viagem possui maior influência urbana, estando localizada na orla da região metropolitana de Recife e relativamente próxima da saída do canal do Porto de Recife, sujeito a movimentos de maré que transportam água de todo o Complexo Estuarino da Bacia do Pina (Figura 9). A área recifal na praia do Paiva (Figura 10) está localizada numa área turística em condomínio de baixa densidade populacional, a uma distância de aproximadamente 5 km da foz do Rio Jaboatão, que drena águas da região metropolitana de Recife. A área recifal no Complexo Estuarino de Suape (CES) se caracteriza por um cordão arenítico recifal na parte externa da Baía de Suape (Figura 11), onde fica localizado o Complexo Industrial Portuário de Suape (CIPS), caracterizado por conter mais de 100 indústrias, incluindo petroquímica, uma refinaria de petróleo, estaleiros, logística, dentre outras (Suape, 2019). A área recifal na Praia de Serrambi (Figura 12) é pouco urbanizada, se caracterizando por ser destino turístico, numa área com condomínio de casas de baixa densidade populacional. A área recifal na praia de Japaratinga, no estado de Alagoas (Figura 13), faz parte da Área de Proteção Ambiental (APA) Costa dos Corais, em área com baixa densidade populacional, e tem uso fundamentalmente turístico.

O clima dos pontos de coleta é do tipo tropical úmido, sendo os meses de maio, junho e julho os meses considerados mais chuvosos, enquanto que os meses de outubro, novembro e dezembro são denominados como os meses mais secos (Madruga Filho, 2004).

Foram realizadas coletas nessas cinco áreas recifais ao longo dos anos de 2018 e 2019, sendo que em algumas destas áreas estas coletas ocorreram logo após a chegada de quantidades significativas de petróleo emulsificado ao longo da costa pernambucana, entre setembro e outubro de 2019. Na praia de Boa Viagem foram realizadas coletas em 13 de agosto de 2018 (BV1), caracterizada como coleta da estação chuvosa, por ser um mês que coincide com o final do período chuvoso; 24 de janeiro de 2019 (BV2) e 02 de outubro de 2019 (BV3), caracterizadas como coletas da estação seca, sendo que nesta última data já haviam sido registrados indícios de manchas de óleo na areia desta praia, mas durante a coleta BV3 não havia visivelmente nenhum indício de óleo no local.

Na praia do Paiva, as coletas aconteceram em 23 de novembro de 2018 (PV1), anterior ao evento de contaminação por petróleo. Também foram realizadas coletas em 03 de outubro de 2019 (PV2), quando já haviam relatos de chegada de óleo nesta região da Praia, mas nada foi verificado visivelmente durante a coleta. A última coleta foi feita em 23 de outubro de 2019 (PV3), sendo que nessa última coleta foram visualizadas placas de óleo emulsificado na areia no fundo das áreas recifais onde os peixes foram coletados. Todas as coletas do Paiva foram caracterizadas como sendo da estação seca, por terem sido realizadas em meses que são denominados como períodos mais secos (Madruga Filho, 2004).

As coletas realizadas no cordão arenítico recifal que forma uma barreira a circulação de água no Complexo Estuarino de Suape (Figura 11 e 11A) foram realizadas em 25 de setembro de 2018 (SP1), caracterizada como a coleta da estação chuvosa, e em 18 de março de 2019 (SP2), caracterizada como coleta da estação seca. As coletas em SP1 e SP2 foram realizadas no ponto indicado na Figura 11, localizado próximo a abertura ao norte do cordão arenítico, na parte interna ao CES, em datas anteriores ao evento de contaminação do litoral por petróleo. As setas verdes na Figura 11 indicam as duas aberturas do cordão arenítico por onde a água circula nos movimentos de maré. Em 21 de outubro de 2019 foi realizada coleta na mesma região, também caracterizada como da estação seca, porém em região distinta do cordão arenítico recifal, localizada mais ao sul, em que o cordão recifal é mais largo e se formam extensas poças de maré em que os peixes ficam aprisionados na maré baixa (Figura 11 e 11B). No dia anterior a esta coleta havia sido retirada grande quantidade de petróleo no interior do Complexo Estuarino de Suape, em especial na praia interna da Ilha da Cocaia (Figura 11B). Nesta data os peixes foram coletados em dois pontos, o primeiro em uma poça profunda conectada com a área costeira externa, sem indícios de óleo, codificada como SP3 (Figura 11B). Um segundo grupo de peixes foi coletado na mesma área, mas em poças de maré rasas na maré baixa, em que os peixes ficam isolados da área costeira externa, e em que era visível a contaminação por pequenos fragmentos de óleo, inclusive se dissolvendo e se espalhando ao longo da superfície da água. Peixes destas poças contaminadas por óleo foram divididos em dois grupos, SP4 e SP5. O grupo SP4 incluiu indivíduos que foram levados para o laboratório e imediatamente eutanasiados e processados, enquanto os indivíduos do grupo SP5 permaneceram por mais 24 horas no laboratório em aquário com água do local de coleta, sendo eutanasiados e processados após este período adicional de exposição.

Na Praia de Serrambi, as coletas aconteceram em 18 de junho de 2018, sendo caracterizada como coleta da estação chuvosa e em 19 de fevereiro de 2019, como sendo da estação seca, e foram classificadas como SE1 e SE2, ambas anteriores ao evento de contaminação por petróleo do litoral. Além disso, não foram registrados indícios de óleo nesta região.

Na praia de Japaratinga, foram realizadas coletas na estação seca (Figura 13) em 26 de novembro de 2018 em JP1, data anterior a contaminação por petróleo. Em 17 de outubro de 2019, um dia após a chegada de extensas manchas de petróleo na região a Praia de Japaratinga, e que ainda estavam sendo retiradas quantidades significativas de petróleo da areia da praia de Japaratinga, foi realizada coleta de indivíduos de *Stegastes fuscus* em JP2. A área recifal JP2 (Figura 13) foi a área mais próxima da praia em que foi possível capturar indivíduos de *Stegastes fuscus* (cerca de 800 m da praia onde havia óleo depositado), uma vez que mais próximo a praia na maré baixa não haviam áreas recifais propícias a captura de *Stegastes fuscus*.

Figura 8 — Mapa do litoral pernambucano, identificando os ambientes recifais costeiros analisados e onde foram coletados indivíduos do peixe “espécie-chave” de ambientes recifais donzelinha *Stegastes fuscus* (territorialista e com baixa mobilidade). No lado direito da figura estão informações compiladas pelo governo do estado de Pernambuco relativas a massa total de óleo e material associado que foi retirado das áreas litorâneas do estado entre 19 de outubro e 28 de outubro de 2019.



Figura 9 — Área recifal 1 (AR1), na Praia de Boa Viagem onde foram coletados os exemplares de *Stegastes fuscus*. As coletas aconteceram em 13 de agosto de 2018 (BV1), 24 de janeiro de 2019 (BV2), e 02 de outubro de 2019 (BV3). (Coordenadas do ponto onde foram feitas as coletas BV1, BV2 e BV3: 8° 5'37.92"S, 34°52'51.51"O).



Figura 10 — Área recifal 2 (AR2), na Praia do Paiva, onde foram coletados os exemplares de *Stegastes fuscus*. As coletas aconteceram em 23 de novembro de 2018 (PV1), 03 de outubro de 2019 (PV2) e 23 de outubro de 2019 (PV3). (Coordenadas do ponto onde foram feitas as coletas PV1, PV2: $8^{\circ}16'29.46''S$, $34^{\circ}56'41.50''O$; e a coleta PV3: $8^{\circ}16'56.76''S$, $34^{\circ}56'48.63''O$).



Figura 11 — Área recifal 3 (AR3), representada por cordão arenítico recifal na parte externa da Baía de Suape, onde fica localizado o Complexo Industrial Portuário de Suape (CIPS), e onde foram coletados os exemplares de *Stegastes fuscus*. As setas verdes indicam as duas aberturas do cordão arenítico por onde a água circula nos movimentos de maré. Inseto A com detalhe das coletas em 25 de setembro de 2018 (SP1), em 18 de março de 2019 (SP2), mostrando a posição de coleta na área interna da Baía de Suape (8°21'47.41"S, 34°56'48.19"O), ambas datas anteriores ao evento de contaminação por petróleo. Inseto B com detalhe das coletas no dia 21 de outubro de 2019, um dia após a retirada de grande quantidade de petróleo na praia da Ilha do Cocaia (setas pretas em 4^a). Neste dia os peixes foram coletados em 3 grupos, um grupo no ponto SP3 (8°22'51.48"S, 34°57'14.30"O), que localiza-se numa poça de maré profunda em conexão direta com a área costeira externa a Baía de Suape e visivelmente sem indício de óleo. Outros peixes foram coletados em poças de maré mais rasas e isoladas durante a maré baixa, visivelmente contaminadas por petróleo, que se conectam com a área costeira externa a cada movimento de maré, divididos em dois grupos SP4 e SP5 (8°22'51.48"S, 34°57'14.66"O).

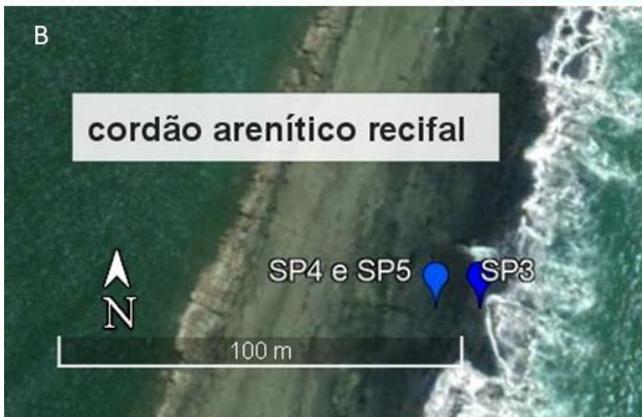


Figura 12 — Área recifal 4 (AR4), na Praia de Serrambi, onde foram coletados os exemplares de *Stegastes fuscus*. As coletas aconteceram em 18 de junho de 2018 (SE1) e em 19 de fevereiro de 2019 (SE2). (Coordenadas do ponto onde foram feitas as coletas SE1 e SE2: 8°33'47.01"S, 35° 0'25.08"O).



Figura 13 — Área recifal 5 (AR5), na Praia de Japaratinga, onde foram coletados os exemplares de *Stegastes fuscus*, em JP1 ($9^{\circ} 4'30.60''S$, $35^{\circ}14'26.34''O$) e JP2 ($9^{\circ} 5'29.32''S$, $35^{\circ}14'44.94''O$). As coletas aconteceram no dia 26 de novembro de 2018 em JP1 e em 17 de outubro de 2019 em JP2. As setas pretas indicam área da praia onde existiam extensas manchas de petróleo emulsificado na praia no dia da coleta indicada no ponto JP2. Obs: no recife onde foram encontrados e coletados peixes em JP2 não foi visualizado nenhum indício de petróleo.



6.2 CAPTURA, TRANSPORTE E PROCESSAMENTO DOS PEIXES

Os peixes foram capturados através do uso de varas e linhas de pesca com anzóis e isca de camarão, mantidos em samburás na água até o final da coleta, quando então foram transportados para o laboratório em recipientes com aeração. No laboratório, foram colocados em aquários com água do local de coleta, onde permaneceram por um período de um ou dois dias sem alimentação. Esse tempo é necessário para que ocorra o acúmulo do líquido biliar e assim ter uma quantidade maior de amostra. Após esse período, os mesmos foram anestesiados e eutanasiados com o uso de triclaína metanosulfonada (MS 222). O peso total, comprimento total e padrão foram registrados, e após isso, foram retirados a vesícula biliar, o fígado e o cérebro, armazenados em ependorffs e levados ao freezer (-80°C), até a execução das análises bioquímicas e enzimáticas.

6.3 METABÓLITOS DE HPAS NA BILE DOS PEIXES

Para a quantificação da concentração dos metabólitos de HPAs na bile dos indivíduos coletados, foi utilizado o método de fluorescência fixa. As análises de bile foram realizadas numa diluição da mesma em uma solução de metanol e água ultra pura (50% V/V) na proporção de 1:1000, diluição em que não foi constatado efeito de filtro interno conforme procedimentos propostos por Aas, Endre *et al.* (2000). A análise da fluorescência da bile foi feita em um espectrofluorímetro Spectramax M3 (Molecular Devices), sendo utilizados os pares de excitação/emissão de 290/335 para naftaleno (Aas, E. *et al.*, 2000), 260/380 para fenantreno (Pathiratne *et al.*, 2010), 310/360 para criseno (Lemos, R. T. D. O. *et al.*, 2014) e 340/382 nm para pireno (Aas, E. *et al.*, 2000). Todas as leituras de fluorescência das amostras foram feitas em cubetas de quartzo, em duplicata.

6.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

As amostras de tecido do fígado ou do cérebro dos peixes foram homogeneizadas em solução tampão fosfato de sódio e de potássio, com pH 7,4, em uma proporção de 1:5 (massa:volume), e centrifugadas por 20 minutos a 9.000g a 4°C em centrífuga refrigerada. Após a centrifugação o sobrenadante de cada amostra foi armazenado no ultrafreezer a -80°C, até serem feitas as análises da cinética enzimática. Foram feitas análises de biomarcadores relacionados a biotransformação de fase I: etoxiresorufina orto-deetilase (EROD), a

biotransformação de fase II: Glutathione S-Transferase (GST), defesa antioxidante: catalase (CAT) e transmissão sináptica: acetilcolinesterase (AChE). Além disso, foi feita a análise de um marcador de peroxidação lipídica, potencial dano causado num estado de estresse oxidativo estabelecido, pelo método TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Para a quantificação de proteínas totais, foi utilizado o método proposto por Bradford (1976).

6.4.1 Biotransformação de fase I etoxiresorufina orto-deetilase (EROD)

Para a análise foi utilizado o método proposto por D Burke e Mayer (1973), onde é feita uma mistura do sobrenadante do tecido homogeneizado do fígado (S9), junto com KPI 100mM; 133,6 μ M de NADPH e 2,0 μ M de Etoxiresorufina, em um pH de 7,4. O método é baseado na detecção fluorimétrica da resorufina, produzida a partir da etoxiresorufina pela enzima P450 CYP1A presente nas amostras de fígado. Esta reação foi monitorada fluorimetricamente por 5 min, utilizando-se o par de comprimentos de onda de excitação/emissão de 530/590nm, e a quantidade de resorufina formada foi estimada a partir de uma curva analítica relacionando fluorescência e concentração de resorufina em pmol nos poços de microplacas pretas modelo Fluotrac 200 (Greiner, EUA) utilizada nos ensaios. A atividade enzimática é proporcional a velocidade de produção de resorufina. Os resultados foram expressos em pmol de resorufina $\text{min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

6.4.2 Biotransformação de fase II Glutathione S-Transferase (GST)

O ensaio foi realizado a partir do método adaptado de H. Habig *et al.* (1974). O tecido homogeneizado do fígado (S9), foi diluído em uma solução tampão de fosfato de potássio (KPI 0,25 M, pH 7,4), na proporção de 1:4. Nesse ensaio foi feita uma mistura do tecido homogeneizado do fígado, com KPI 100 mM, pH 7,4; contendo GSH 1 mM, utilizando como substrato iniciador o CDNB 1 mM. A conjugação de GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) produz um composto que pode ser detectado a 340nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de CNDB min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

6.4.3 Atividade de defesa antioxidante catalase (CAT)

O método utilizado para esse bioensaio foi o de Beers e Sizer (1952) adaptado para microplaca por Li e Schellhorn (2007). O tecido homogeneizado do fígado (S9), foi diluído em

uma solução tampão de fosfato de potássio (KPi 0,25 M, pH 7,4), na proporção de 1:100. Realizou-se a mistura do sobrenadante do tecido homogeneizado do fígado, junto com KPi 0,05 mM, pH 7,4, contendo 5 mM de H₂O₂. A atividade enzimática é proporcional a velocidade de decomposição do H₂O₂ pela ação da catalase, podendo ser detectada a 240nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

6.4.4 Lipoperoxidação com base nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método utilizado para o ensaio foi o proposto por Utley *et al.* (1967), com algumas adaptações. Os marcadores de danos oxidativos são medidos mediante conjugação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), criando um conjugado que quando aquecido se torna fluorescente e passível de leitura por espectrofotometria. A leitura do MDA foi realizada em placas de 96 poços pretas para fluorescência Fluotrac 200 (Greiner, USA). Em cada poço foi inserido PBS, hidroxitolueno butilado 95% dissolvido em etanol 95% (BHT), a amostra em duplicata, ácido tricloroacético 50%, e foi realizada uma leitura basal de fluorescência com excitação de 535 nm e emissão de 590 nm no espectrofluorímetro, SpectraMax® M3. Após a leitura basal foi adicionado em cada poço o ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,3% dissolvido em NaOH 0,3%, e levado a estufa a 60°C por 1h. A leitura é refeita no espectrofluorímetro. Os valores de fluorescência obtidos descontados do valor basal foram aplicados à curva de concentração do MDA ($R_2 > 0,99$), e a unidade utilizada foi $\mu\text{M MDA mg de proteína}^{-1}$.

6.4.5 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da Acetilcolinesterase foi determinada em amostras do cérebro pelo método adaptado para microplaca de Ellman *et al.* (1961), a partir da hidrólise do iodeto de acetilcolina em acetato e tiocolina. O grupo tiol reage com o DTNB, formando o ⁻TNB que é detectado à 412nm ($\epsilon = 14.150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O ensaio enzimático de 2 minutos foi realizado à 25 °C em KPi 100 mM, 0,5 mM de DTNB, pH 7,4 e 1,5 mM de AChI. Os resultados foram expressos em $\text{nmol de TNB min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

6.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Como os dados de todos parâmetros avaliados apresentaram ausência de normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov) ou heteroscedasticidade (teste de medianas de Levene), todas as análises comparativas foram realizadas através do método de Kruskall-Wallis (equivalente não paramétrico da análise de variância de 1 fator), seguidas do teste de comparações múltiplas de Dunn quando foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos considerados ($p < 0,05$).

A variação da concentração dos HPAs biliares e dos parâmetros bioquímicos para cada área recifal amostrada ao longo de todas as coletas foi realizada pelo método Kruskall-Wallis para 1 fator (temporal). Havendo diferenças estatisticamente significativas, comparações foram realizadas pelo método de Dunn para verificar diferenças entre os tratamentos representados pelas diferentes datas em que as amostras foram obtidas em cada área recifal, incluindo todas as datas amostradas. Para a comparação entre as diferentes áreas recifais, as amostras de cada área recifal foram separadas em dois grupos, antes e após o início do evento de contaminação. Foi aplicada análise de Kruskall Wallis para cada um dos grupos de amostras, antes e após o início da contaminação por petróleo, separadamente. Havendo diferenças estatisticamente significativas, comparações foram realizadas pelo método de Dunn para identificar diferenças entre os tratamentos representados pelas diferentes áreas recifais em que as amostras foram obtidas. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software SigmaPlot versão 12.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany).

7 RESULTADOS

7.1 METABÓLITOS DE HPAS NA BILE DOS PEIXES

A análise da bile por fluorescência fixa para os HPAs naftaleno, fenantreno, criseno e pireno indicou padrões de variação no grau de contaminação interna dos peixes em termos espaciais nas áreas recifais de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga, amostradas ao longo de 2018 e 2019, e também foi diagnóstica de um aumento significativo da contaminação interna dos peixes após o início do evento de contaminação da costa pernambucana por petróleo.

7.1.1 Naftaleno

A comparação temporal da dose interna biliar de naftaleno (Naf_{bile}) (Figura 14) em cada área recifal separadamente indica que as amostras das áreas recifais da Praia do Paiva apresentaram uma diminuição entre PV1 (novembro de 2018) e PV2 (outubro de 2019) na estação seca (menores valores), sendo que após a chegada do óleo nesta região em PV3 (outubro de 2019), os valores aumentam significativamente. Nas amostras da Praia de Serrambi foram encontrados os menores valores para naftaleno em SE1 (junho de 2018, estação chuvosa), tendo sido verificado um aumento significativo neste ponto para a estação seca em SE2 (fevereiro de 2019). Nos indivíduos das áreas recifais de Boa Viagem, Paiva e Japaratinga não foram detectadas alterações significativas para Naf_{bile} ao longo de todas as coletas, mesmo após a chegada do óleo.

A comparação entre áreas para Naf_{bile} antes da chegada do óleo indica as amostras de Serrambi com menor dose interna biliar (mediana = 39 URF), sendo esta a menor mediana ao longo de todas as coletas, apesar de não diferirem das amostras de Japaratinga em JP1 (mediana = 50,7 URF).

A comparação entre áreas para Naf_{bile} após a chegada do óleo indica valores significativamente maiores em indivíduos da área do Paiva (PV3) (mediana = 71 URF) e Suape (SP4) (mediana = 78 URF), com aumentos de 136% e 160% relativos a Naf_{bile} em Serrambi. Os menores valores após a chegada do óleo foram encontrados em Boa Viagem (mediana = 51 URF) e Japaratinga (mediana = 50 URF).

7.1.2 Fenantreno

A comparação temporal da dose interna biliar de fenantreno (Fen_{bile}) (Figura 15) em cada área recifal separadamente indica que as amostras das áreas recifais da Praia do Paiva apresentaram um aumento entre PV1 e PV2 na estação seca (menores valores) comparados com PV3, após a chegada do óleo nesta região em outubro de 2019, quando os valores aumentam significativamente. Na área recifal representada por um cordão arenítico em Suape existe uma peculiaridade importante entre os locais amostrados já detalhados na Figura 4, sendo que SP1 e SP2 representam peixes coletados ao lado deste cordão, do lado interno do Complexo Estuarino de Suape. SP3, SP4 e SP5 representam peixes coletados numa outra região deste mesmo cordão arenítico, em poças de maré isoladas na maré baixa, conectadas com a área costeira externa ao CES. Fen_{bile} é maior em SP1 e SP2, e diminui em SP3 (mediana = 17), que representa peixes coletados numa poça de maré profunda conectada com a área costeira externa, sem indícios de óleo, e é a menor mediana encontrada entre todas as coletas. Os peixes coletados

em SP4 provieram de uma poça de maré rasa na maré baixa, confinados e sem comunicação com a área costeira externa, e onde era visível a contaminação por pequenos fragmentos de óleo, inclusive se dissolvendo e se espalhando ao longo da superfície da água. A mediana em SP4 é igual a 29, mas não difere estatisticamente de SP3, e aumenta significativamente para 100 em SP5, que se refere a um grupo de peixes destas mesmas poças em que fragmentos de óleo eram visíveis, e que permaneceram na mesma água destas poças por mais 24 horas em laboratório. Nas áreas recifais de Boa Viagem, Serrambi e Japaratinga não foram detectadas alterações significativas para $Fen_{b\text{ile}}$ ao longo de todas as coletas, mesmo após a chegada do óleo.

A comparação entre áreas para $Fen_{b\text{ile}}$ antes da chegada do óleo indica que as amostras de Serrambi são as que possuem menores doses internas biliares (mediana = 43 URF), sendo significativamente menores que os valores encontrados no Paiva (PV1 e PV2, mediana = 66 URF) e em Suape (SP1 e SP2, mediana = 73 URF), mas não diferindo de Japaratinga em JP1 (mediana = 49).

A comparação entre áreas para $Fen_{b\text{ile}}$ após a chegada do óleo indica valores significativamente maiores em indivíduos da área do Paiva (PV3, mediana = 234 URF) e Suape (SP5, mediana = 100), e estes aumentos em PV3 e SP5 foram de 457% e 138% relativos a $Fen_{b\text{ile}}$ em Serrambi.

7.1.3 Criseno

A comparação temporal da dose interna biliar de criseno ($Cri_{b\text{ile}}$) (Figura 16) em cada área recifal separadamente indica que as amostras das áreas recifais da Praia do Paiva apresentaram um aumento entre PV1 e PV2 na estação seca (menores valores) comparados com PV3, após a chegada do óleo nesta região em outubro de 2019, quando os valores aumentam significativamente. Na área recifal representada por um cordão arenítico em Suape, $Cri_{b\text{ile}}$ é maior em SP1 e SP2, e diminui para valores menores em SP3 (mediana = 2), que representa peixes coletados numa poça de maré profunda conectada com a área costeira externa, sem indícios de óleo, e é a menor mediana encontrada entre todas as coletas. A mediana em SP4 é igual a 4, e aumenta significativamente para 21 em SP5, que se refere a um grupo de peixes de poças em que fragmentos de óleo eram visíveis, e que permaneceram na mesma água destas poças por mais 24 horas em laboratório. Na área recifal de Boa Viagem não foram detectadas alterações significativas para $Cri_{b\text{ile}}$ ao longo de todas as coletas, mesmo após a chegada do óleo. Nas áreas recifais de Serrambi e Japaratinga foram detectadas alterações significativas

para Cri_{bile} entre as duas coletas realizadas, sendo que em Serrambi a mediana aumentou de 9,8 para 11,8 de SE1 para SE2, e em Japaratinga a mediana aumentou de 10,9 para 16,4 após a chegada do óleo.

A comparação entre áreas para Cri_{bile} antes da chegada do óleo indica que as amostras de Japaratinga possuíam as menores doses internas biliares (mediana = 10,9 URF), sendo significativamente menor que os valores encontrados no Paiva (PV1 e PV2, mediana = 16,1 URF) e em Suape (SP1 e SP2, mediana = 15,7 URF). A mediana de Cri_{bile} antes da chegada do óleo em Serrambi foi igual a 11,2, não diferindo de Japaratinga.

A comparação entre áreas para Cri_{bile} após a chegada do óleo indica valores significativamente maiores em indivíduos da área do Paiva (PV3, mediana = 48 URF) e Suape (SP5, mediana = 20,7), e estes aumentos em PV3 e SP5 foram de 340% e 89% relativos a Cri_{bile} em Japaratinga.

7.1.4 Pireno

A comparação temporal da dose interna biliar de pireno (Pir_{bile}) (Figura 17) em cada área recifal separadamente indica que as amostras das áreas recifais da Praia do Paiva apresentaram um aumento entre PV1 e PV2 na estação seca (menores valores) comparados com PV3, após a chegada do óleo nesta região em outubro de 2019, quando os valores aumentam significativamente. Na área recifal representada por um cordão arenítico em Suape, Pir_{bile} apresenta medianas iguais a 18,5, 17,6 e 20,5 em SP1, SP2 (área interna do CES) e SP3 (poça de maré conectada com a área costeira externa), respectivamente. A mediana aumenta significativamente para 27 e 32 em SP4 e SP5, respectivamente, que se referem a um grupo de peixes de poças em que fragmentos de óleo eram visíveis. Nas áreas recifais de Serrambi e Japaratinga foram detectadas alterações significativas para Pir_{bile} entre as duas coletas realizadas, sendo que em Serrambi a mediana aumentou de 14,2 para 17,2 de SE1 (estação chuvosa) para SE2 (estação seca), e em Japaratinga a mediana aumentou de 12,1 (JP1-estação seca) para 18,9 (JP2-estação seca) após a chegada do óleo. Na área recifal de Boa Viagem não foram detectadas alterações significativas para Pir_{bile} ao longo de todas as coletas, mesmo após a chegada do óleo.

A comparação entre áreas para Pir_{bile} antes da chegada do óleo indica que as amostras de Japaratinga possuíam menores doses internas biliares (mediana = 12,1 URF), sendo significativamente menor que os valores encontrados em Boa Viagem (BV1 e BV2, mediana = 29,8 URF), no Paiva (PV1 e PV2, mediana = 16,7 URF) e em Suape (SP1 e SP2, mediana =

18,1 URF). A mediana de Pir_{bile} antes da chegada do óleo em Serrambi foi igual a 15,5, não diferindo de Japaratinga.

A comparação entre áreas para Pir_{bile} após a chegada do óleo indica valores significativamente maiores em indivíduos da área do Paiva (PV3, mediana = 55,3 URF) e Suape (SP4, mediana = 27,9 e SP5, mediana = 32,7), e estes aumentos em PV3, SP4 e SP5 foram de 357%, 130% e 170% relativos a Pir_{bile} em Japaratinga, respectivamente.

7.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

A análise dos biomarcadores bioquímicos indicou padrões de variação na biotransformação de fase 1 (EROD), fase 2 (GST) e defesa antioxidante em termos espaciais dos peixes nas áreas recifais amostradas ao longo das estações do ano, e também foi diagnóstica de alterações biológicas decorrentes de um aumento significativo da contaminação interna dos peixes após o início do evento de contaminação da costa pernambucana por petróleo.

7.2.1 EROD

A comparação temporal da indução da atividade enzimática da EROD (Figura 18) em cada área recifal separadamente indica que as amostras das áreas recifais da Praia do Paiva tiveram um aumento significativo da atividade em PV3 (mediana = 5978 pmol de resorufina min⁻¹ mg de proteína⁻¹), logo após a chegada do óleo nesta região em outubro de 2019, quando comparado com PV1 na estação seca. Na área recifal representada por um cordão arenítico em Suape, a atividade da EROD é menor em SP2 (mediana = 1028), que representa peixes coletados ao lado deste cordão, e aumenta significativamente em SP4 (mediana = 4999), que representa peixes coletados em uma poça de maré rasa na maré baixa, e onde era visível a contaminação por pequenos fragmentos de óleo. Nas áreas recifais de Boa Viagem (mediana = 1149), Serrambi (mediana = 1179) e Japaratinga (mediana = 855) não foram detectadas alterações significativas para a atividade da EROD ao longo de todas as coletas, mesmo após a chegada do óleo.

A comparação entre áreas para a atividade da EROD antes da chegada do óleo, não detectou alterações significativas em nenhuma área ao longo de todas as coletas. Apesar de não haver diferenças estatísticas entre as diferentes áreas recifais, a menor mediana foi verificada em Japaratinga, igual a 855 pmol de resorufina min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

A comparação entre áreas para a atividade da EROD após a chegada do óleo indica valores significativamente maiores nas amostras da área do Paiva (PV3, mediana = 5978) e Suape (SP4, mediana = 4999), e estes aumentos em PV3 e SP4 foram de 599% e 484% relativos a EROD em Japaratinga.

7.2.2 GST

A comparação temporal da atividade enzimática da GST (Figura 19) em cada área recifal separadamente indica que amostras da área representada por um cordão arenítico em Suape apresentaram maior atividade da GST em SP2 (mediana = 502 $\mu\text{mol de CDNB min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), que representa peixes coletados ao lado deste cordão, do lado interno do Complexo Estuarino de Suape, e diminui em SP3 (mediana = 264), que representa peixes coletados numa poça de maré profunda conectada com a área costeira externa, sem indícios de óleo. A mediana em SP4 é igual a 293 e SP5 é igual a 300, mas não diferem estatisticamente de SP3. Nas amostras da área recifal de Boa Viagem, foram encontrados os menores valores para a atividade da GST em BV1 (estação chuvosa), em comparação a BV2 (estação seca), tendo sido verificado um aumento significativo entre as coletas. Nos indivíduos das áreas recifais do Paiva, Serrambi e Japaratinga não foram detectadas alterações significativas para a atividade da GST ao longo de todas as coletas, mesmo após a chegada do óleo.

A comparação entre áreas para atividade enzimática da GST antes da chegada do óleo indica que indivíduos coletados na área recifal de Boa Viagem possuíam menores induções da atividade enzimática (mediana = 194), sendo significativamente menor que os valores encontrados em Suape (SP1 e SP2, mediana = 413), Paiva (PV1, mediana = 373) e em Serrambi (SE1, mediana = 339). A mediana da GST antes da chegada do óleo em amostras de Japaratinga foi igual a 291, não diferindo de Boa Viagem.

A comparação entre áreas para GST após a chegada do óleo indica valores significativamente maiores em amostras da área do Paiva (PV3, mediana = 538 $\mu\text{mol de CDNB min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$) e este aumento em PV3 foi de 76% relativos a atividade da GST em Japaratinga.

7.2.3 CAT

A comparação temporal da atividade da CAT (Figura 20) em cada área recifal separadamente indica que houve um aumento significativo nas amostras das áreas recifais da

Praia do Paiva de PV1 na estação seca (mediana = 319) para PV3 (mediana = 443), logo após a chegada do óleo nesta região em outubro de 2019. Na área recifal de Suape, CAT é menor em SP1 e SP2 (mediana = 176 e 232, respectivamente), e aumenta significativamente após a chegada do óleo em SP3 (mediana = 380), SP4 (mediana = 452) e SP5 (mediana = 357). Na área recifal de Boa Viagem, foi verificado um aumento significativo entre as coletas em BV1, estação chuvosa (mediana = 130), quando comparado com BV2, estação seca (mediana = 201). Um resultado semelhante foi verificado na praia de Serrambi, com menores valores para a atividade da CAT nas amostras de SE1, estação chuvosa (mediana = 159), em comparação a SE2, estação seca (mediana = 264). Na área recifal de Japaratinga, foram encontrados menores valores para a atividade da CAT nas amostras de JP1, estação seca (mediana = 125), que não difere de JP2, também na estação seca.

A comparação entre áreas para atividade da CAT antes da chegada do óleo indica que as amostras de Japaratinga possuíam as menores induções da atividade da CAT (mediana = 125), sendo significativamente menor que os valores encontrados no Paiva (PV1, mediana = 319), Suape (SP1 e SP2, mediana = 222) e Serrambi (SE1 e SE2, mediana = 210).

A comparação entre áreas para CAT após a chegada do óleo indica valores significativamente maiores em amostras da área de Suape em SP3 (mediana = 380), SP4 (mediana = 452) e SP5 (mediana = 357) e no Paiva (PV3, mediana = 443), e estes aumentos foram de 204%, 261%, 185% e 254% relativos a atividade da CAT em Japaratinga, respectivamente.

7.2.4 TBARS

A comparação temporal para lipoperoxidação (TBARS) (Figura 21) em cada área recifal separadamente indica que as amostras das áreas recifais da Praia do Paiva apresentaram uma diminuição significativa da lipoperoxidação de PV1 na estação seca (mediana = 42) para PV3 (mediana = 15), logo após a chegada do óleo nesta região em outubro de 2019. Nas áreas recifais de Boa Viagem, Suape, Serrambi e Japaratinga não foram detectadas alterações significativas para TBARS ao longo de todas as coletas, mesmo após a chegada do óleo.

A comparação entre áreas para TBARS antes da chegada do óleo indica as amostras de Boa Viagem (mediana = 9,9) e Japaratinga (mediana = 15,4) como sendo as que apresentaram menor lipoperoxidação, sendo significativamente menor que os valores encontrados no Paiva (PV1, mediana = 42) e Serrambi (PV1, mediana = 41).

A comparação entre áreas para o ensaio TBARs após a chegada do óleo indica valores significativamente maiores em amostras da área de Suape (SP3, mediana = 27) em comparação com Japaratinga (JP2, mediana = 9,6), um aumento de 181%.

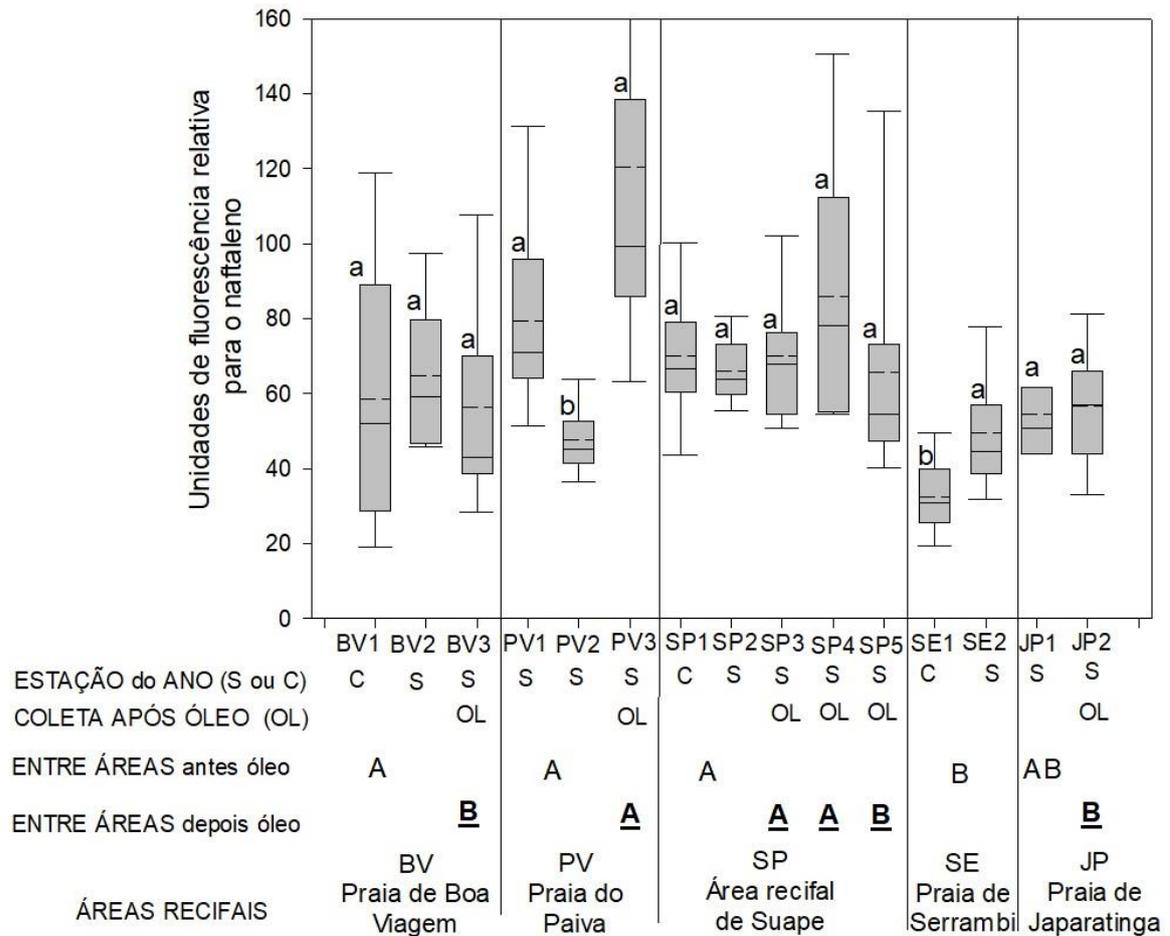
7.2.5 AChE

A comparação temporal da atividade da AChE (Figura 22) em cada área recifal separadamente indica que ocorreu uma diminuição significativa da AChE em relação as amostras de PV1 na estação seca (mediana = 191 nmol TNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹) para PV3 (mediana = 146), logo após a chegada do óleo nesta região em outubro de 2019. Na área recifal representada por um cordão arenítico em Suape a atividade é maior em SP2 (mediana = 211), e significativamente menor em SP3 (mediana = 118). Na área recifal de Boa Viagem, foi verificada uma diminuição da atividade da AChE em BV2, quando comparado com BV1. Na área recifal de Japaratinga, não foram detectadas alterações significativas para AChE ao longo de todas as coletas, mesmo após a chegada do óleo.

A comparação entre áreas para a AChE antes da chegada do óleo indica que as amostras de Boa Viagem apresentaram maiores atividades da AChE (mediana = 200), sendo significativamente maior que os valores encontrados em amostras de Serrambi (mediana = 124). Entretanto, a AChE em indivíduos coletados em Japaratinga antes do óleo não difere de Boa Viagem, com mediana = 175.

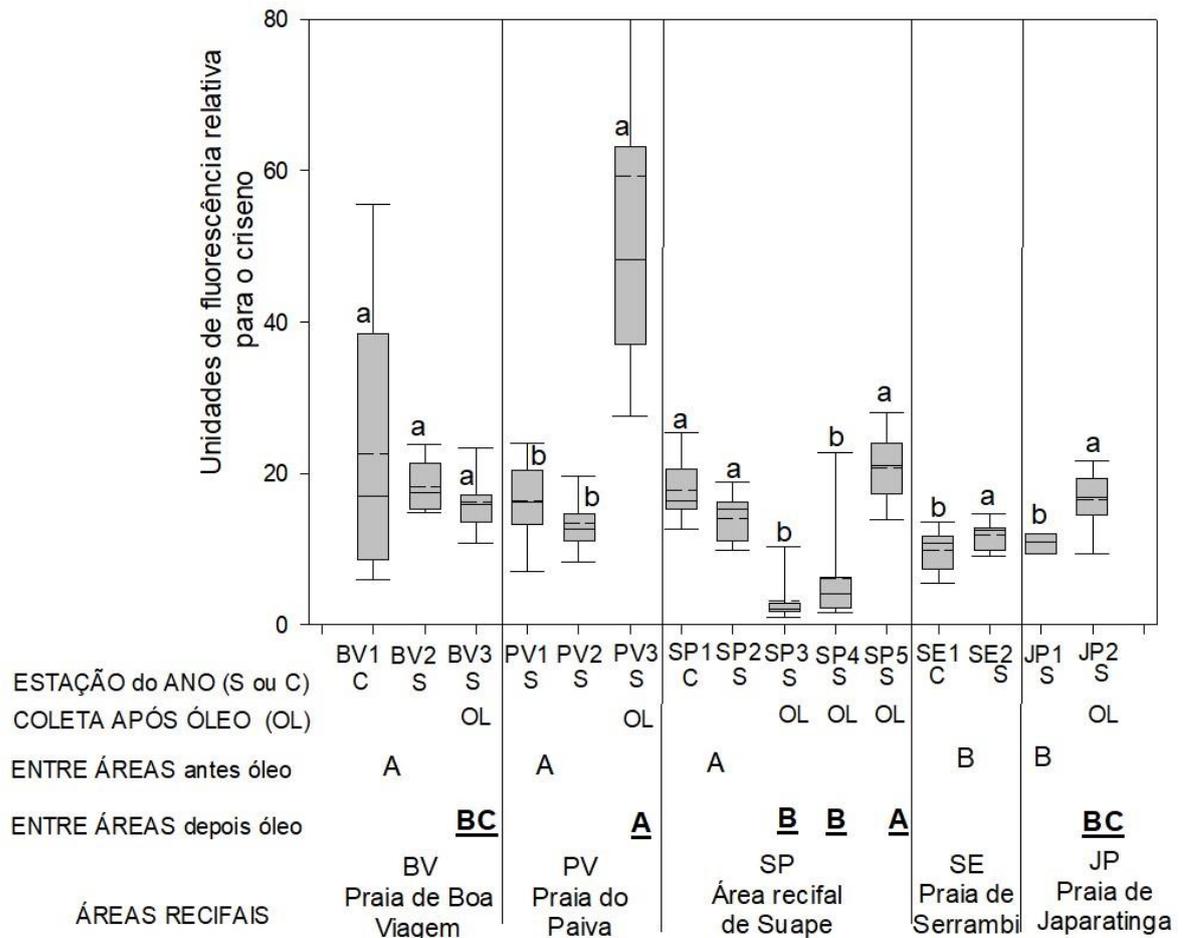
A comparação entre áreas para AChE após a chegada do óleo indica valores significativamente maiores em amostras da área de Japaratinga (JP2 mediana = 206), e menores valores em Suape (SP3 mediana = 118).

Figura 14 — Unidades de fluorescência relativa (URF) para naftaleno das amostras de bile da espécie *Stegastes fuscus*, coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 37,7$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A**, **B**: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 25,6$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).



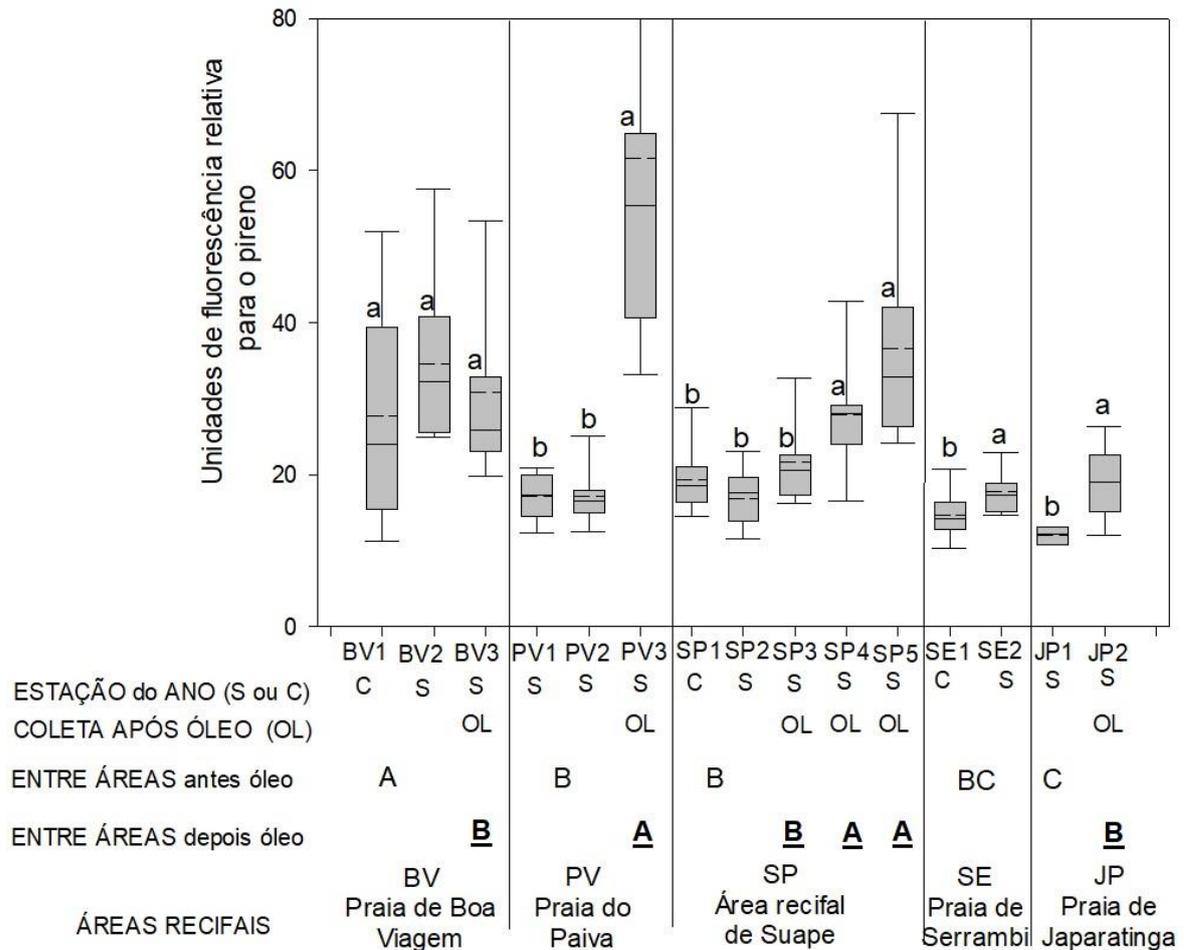
Áreas recifais amostradas em diferentes datas de coleta e resultados das comparações estatísticas

Figura 16 — Unidades de fluorescência relativa (URF) para criseno das amostras de bile da espécie *Stegastes fuscus*, coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 34,2$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A**, **B**: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 57,6$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).



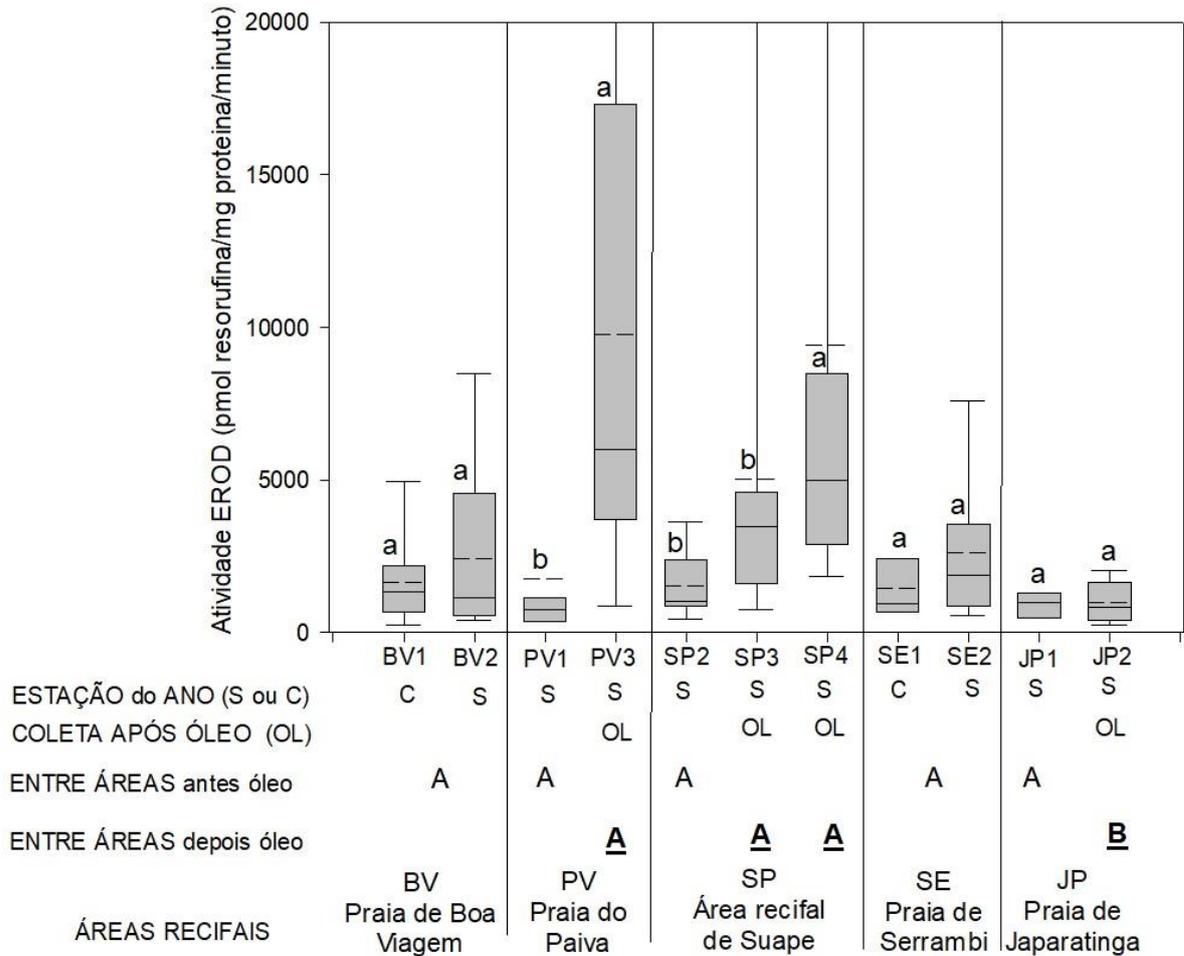
Áreas recifais amostradas em diferentes datas de coleta e resultados das comparações estatísticas

Figura 17 — Unidades de fluorescência relativa (URF) para pireno das amostras de bile da espécie *Stegastes fuscus*, coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4=39,9$; $p = <0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A**, **B**: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5= 43,0$; $p = <0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).



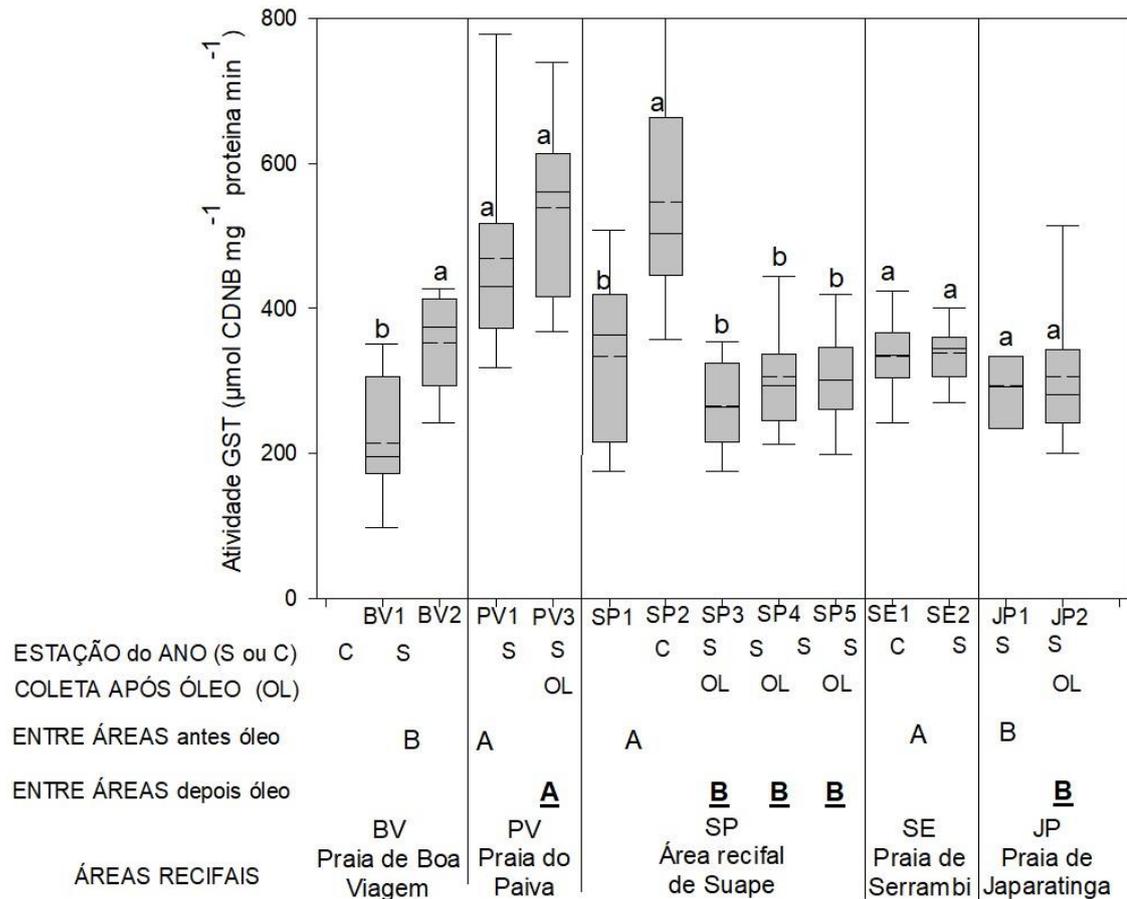
Áreas recifais amostradas em diferentes datas de coleta e resultados das comparações estatísticas

Figura 18 — Atividade da etoxiresorufina orto-deetilase (EROD) em amostras coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Suape, Serrambi e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 6,3$; $p = 0,178$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 18,4$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).



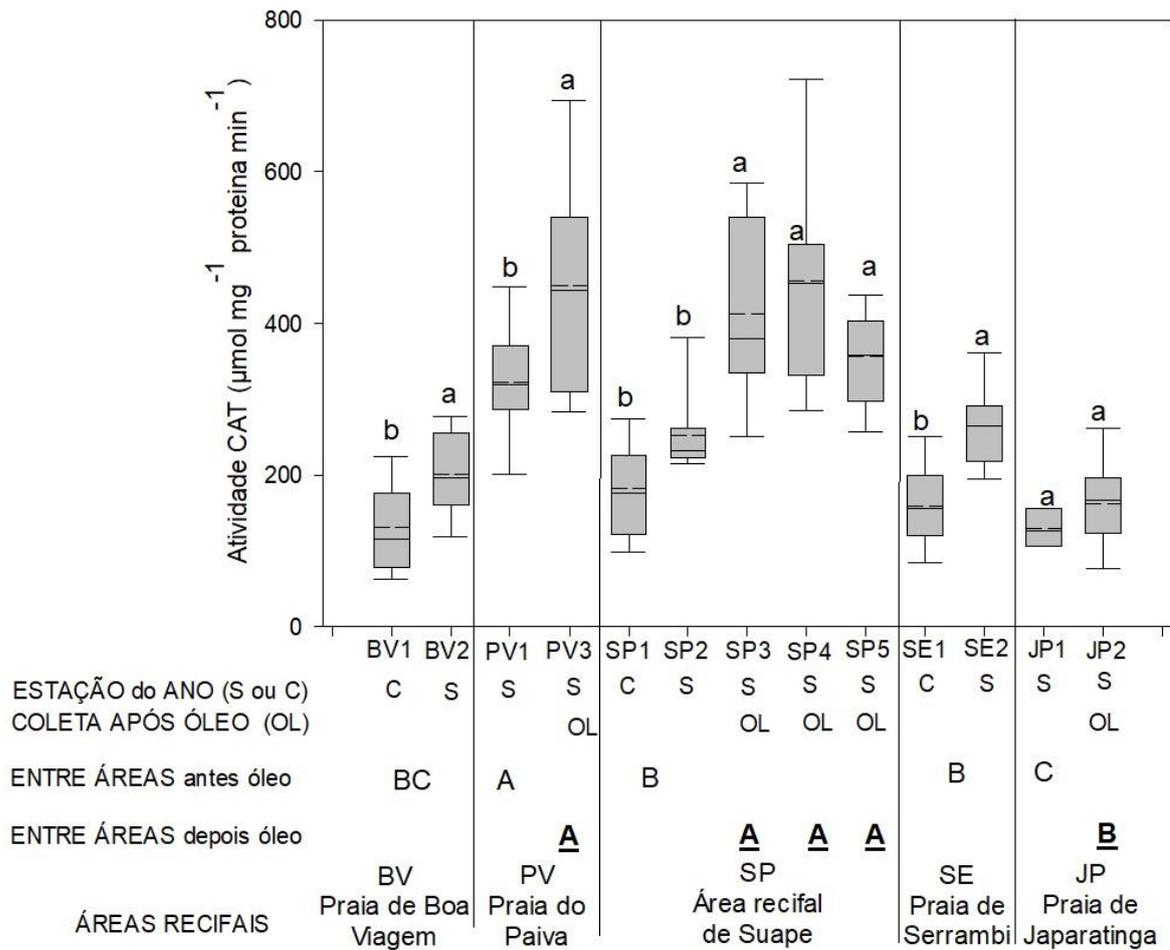
Áreas recifais amostradas em diferentes datas de coleta e resultados das comparações estatísticas

Figura 19 — Atividade da glutatona S-transferase (GST) em amostras coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Serrambi, Suape e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4=23,1$; $p = <0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A**, **B**: diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4= 25,5$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).



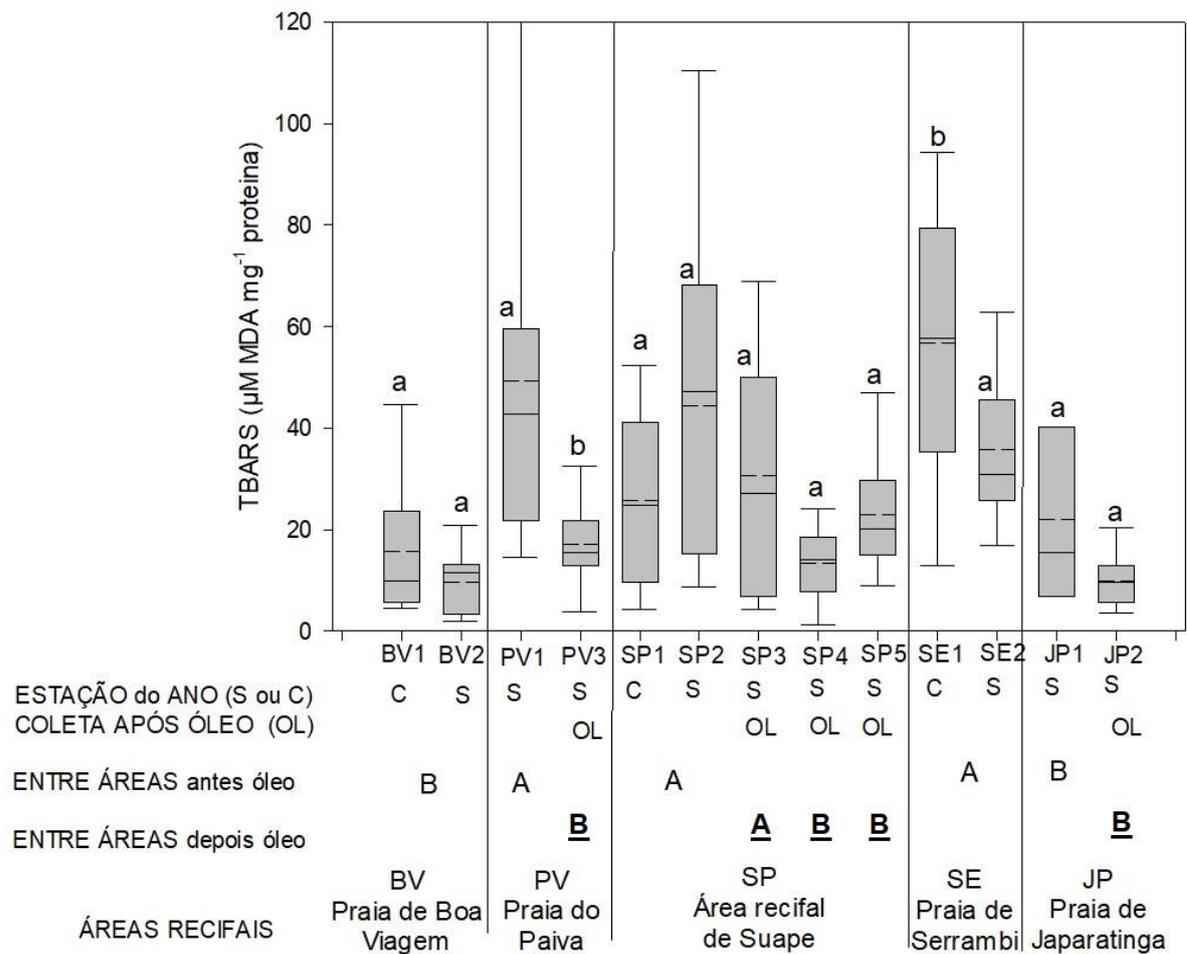
Áreas recifais amostradas em diferentes datas de coleta e resultados das comparações estatísticas

Figura 20 — Atividade da catalase (CAT) em amostras coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Serrambi, Suape e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 32,9$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 27,1$; $p < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$).



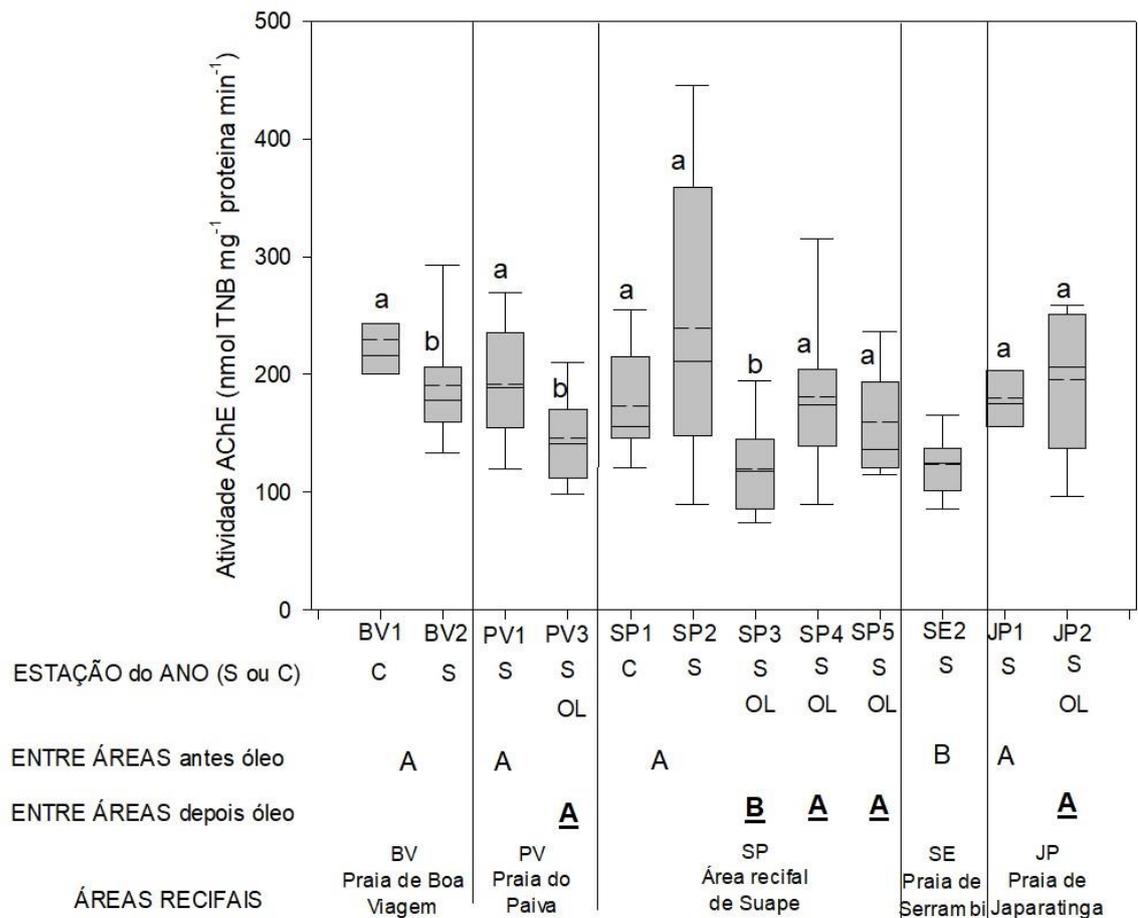
Áreas recifais amostradas em diferentes datas de coleta e resultados das comparações estatísticas

Figura 21 — Lipoperoxidação com base nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em amostras coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Serrambi, Suape e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 15,3$; $p = 0,004$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_5 = 11,6$; $p = < 0,021$; teste de Dunn, $p < 0,05$).



Áreas recifais amostradas em diferentes datas de coleta e resultados das comparações estatísticas

Figura 22 — Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em amostras coletadas nas áreas recifais das praias de Boa Viagem, Paiva, Serrambi, Suape e Japaratinga. a,b: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as coletas em cada área (Kruskal Wallis, $p < 0,05$; teste de Dunn, $p < 0,05$). A, B: letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas para coletas antes da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 26,1$; $p = < 0,001$; teste de Dunn, $p < 0,05$). **A**, **B**: diferenças significativas entre as áreas para coletas depois da chegada do óleo (Kruskal Wallis $H_4 = 13,7$; $p = 0,008$; teste de Dunn, $p < 0,05$).



Áreas recifais amostradas em diferentes datas de coleta e resultados das comparações estatísticas

8 DISCUSSÃO

A quantificação dos HPAs biliares fornece uma medida do grau de exposição interna, enquanto os biomarcadores bioquímicos proporcionam medidas relacionadas a alterações biológicas possivelmente decorrentes da exposição a estes e/ou outros contaminantes presentes nos ambientes aquáticos recifais em questão. Ambos tipos de medidas têm sido usadas para avaliar e quantificar o grau de alteração/dano em ecossistemas aquáticos (Sanni *et al.*, 2017), e tipicamente requerem uma comparação com ambientes de referência. Esta região de referência pode ser definida segundo diversos critérios nas estratégias de biomonitoramento ecotoxicológico, que inclui áreas denominadas auto-referenciais, em que se tenha informação antes e após determinado evento ou impacto ambiental, áreas referência regionais naturais (não perturbadas e sem contaminação), e áreas referência regionais aceitáveis, em que a contaminação mesmo que presente, seja pelo menos reduzida (Suter, 2007). Esta última situação é a mais frequente na maioria dos ambientes costeiros, e as áreas recifais abordadas neste estudo se enquadram neste caso. Nesse estudo foram realizadas análises espaciais e temporais de HPAs biliares e biomarcadores bioquímicos em 5 áreas recifais ao longo da costa pernambucana e alagoana, entre setembro de 2018 e outubro de 2019, sendo que no início de setembro de 2019 ocorreu uma extensa contaminação da costa pernambucana e nordestina por petróleo emulsificado que atingiu algumas destas áreas monitoradas.

A análise espacial de HPAs biliares antes do evento de contaminação por petróleo indicou que as amostras da área recifal da praia de Serrambi apresentaram as menores medianas de fluorescências para os HPAs naftaleno (Figura 14) e fenantreno (Figura 15), e amostras da área recifal da praia de Japaratinga apresentaram as menores medianas para os HPAs criseno (Figura 16) e pireno (Figura 17). A análise dos biomarcadores bioquímicos antes do evento de contaminação por petróleo indicou que a atividade das enzimas EROD (Figura 18), GST (Figura 19), CAT (Figura 20), e do biomarcador TBARs (Figura 21), apresentaram as menores medianas em amostras de Japaratinga. Além disso, a atividade da AChE cerebral (Figura 22) em peixes da área recifal de Japaratinga está entre as mais elevadas, e nenhum dos parâmetros bioquímicos sofreu alterações após o evento de contaminação por petróleo nesta região. Desta forma, estas evidências corroboram a área recifal de Japaratinga em Alagoas como sendo uma área referência regional aceitável, juntamente com Serrambi em Pernambuco com relação aos parâmetros biliares e as atividades das enzimas EROD e GST, que não apresentaram diferenças em comparação com Japaratinga.

Alterações durante o período chuvoso e seco

As amostras das áreas recifais de Boa Viagem, Suape e Serrambi, onde foram feitas coletas nas estações chuvosa e seca sem influência do evento de contaminação do litoral por petróleo, mostraram uma maior atividade da GST no período seco em BV2 e SP2 (Figura 19), e maior atividade da CAT em BV2 e SE2 (Figura 20). Entretanto, os HPAs biliares não acompanharam o aumento da GST e CAT em BV2 e SP2 (Figuras 14 a 17). A GST hepática é uma enzima de biotransformação de fase 2 responsável pela conjugação de contaminantes eletrofílicos, e tem sido verificado um aumento de sua atividade através da análise de peixes expostos a contaminantes (HPAs e outros) em laboratório ou no campo em vida livre, mas também foi verificada inibição ou ausência de alteração, tornando sua interpretação difícil (Van Der Oost *et al.*, 2003). A Catalase é uma importante enzima de defesa antioxidante que promove a decomposição de H₂O₂, e cuja alteração devido a exposição a HPAs e outros contaminantes também envolve possível indução, inibição ou ausência de alteração (Van Der Oost *et al.*, 2003).

A verificada indução da GST e da CAT em BV2 e SP2 no período de seca pode estar associada a outros contaminantes não avaliados, tendo em vista que as áreas recifais de Boa Viagem e Suape estão sob a influência de inúmeras atividades domésticas e industriais que podem estar contribuindo com contaminantes de outras classes para estas áreas. Entretanto, a CAT foi induzida no período de seca em amostras da área de Serrambi em SE2 (Figura 20), neste caso em associação com aumento de naftaleno (Figura 14), criseno (Figura 16) e pireno (Figura 17) na bile dos peixes analisados. Desta forma, na área recifal de Serrambi pode-se supor que a maior bioconcentração de HPAs verificada na bile no período seco tenha levado a um aumento da CAT, proporcionando mais um estudo de campo semelhante aos descritos para os peixes *Limanda limanda* (Livingstone *et al.*, 1993), *Mullus barbatus* (Burgeot *et al.*, 1996) e *Myoxocephalus scorpius* (Stephensen *et al.*, 2000), em que a contaminação por HPAs se correlacionaram diretamente com a indução da CAT. A Praia de Serrambi é uma área em que no período da seca no verão há intensa movimentação turística com uso de embarcações a motor inclusive, e uma análise mais aprofundada dos contaminantes presentes naquela região pode contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos que podem levar a alteração desta enzima.

Padrões de variação espacial antes e após a contaminação por petróleo emulsificado

A partir do dia 15 de outubro de 2019 ocorreu a contaminação da Praia de Japaratinga por petróleo emulsificado na forma de placas em quantidades significativas. No dia 17 de outubro foi realizada a coleta dos peixes analisados em JP2 (Figura 13), portanto dois dias após

a chegada desta massa de petróleo nesta praia, e ainda havia uma quantidade significativa de placas de petróleo acumuladas na região supralitoral na areia da praia, além de fragmentos na região do infralitoral, visivelmente em processo de dissolução, formando natas flutuantes na superfície da água. Entretanto, as áreas recifais onde residem os peixes da espécie foco deste estudo são localizadas a aproximadamente 800 m de distância da região da praia onde o petróleo era visível, e nos recifes onde foram coletados os peixes (JP2, Figura 13) não havia evidência visível de contaminação por petróleo, como observada na área da praia em frente, a aproximadamente 800 m de distância. Com base numa estratégia de biomonitoramento autoreferencial, a comparação dos parâmetros biliares dos indivíduos coletados nesta data em JP2 com os mesmos parâmetros gerados em *Stegastes fuscus* em JP1 em novembro de 2018 (11 meses antes da contaminação por petróleo, também na estação seca) indicaram um aumento na mediana de Cri_{bile} de 10,9 URF (JP1-estação seca) para 16,4 URF (JP2-estação seca), e na mediana de Pir_{bile} de 12,1 para 18,9 após a chegada do óleo. Este aumento estatisticamente significativo destes HPAs biliares pode ser consequência do contato destes indivíduos com água e/ou fragmentos de óleo dispersos na região, apesar da área de coleta estar aparentemente limpa, e não ter sido viável fazer qualquer inspeção por mergulho nesses recifes. Entretanto, este aumento dos HPAs biliares em JP2 não foi suficiente para alterar nenhum dos parâmetros bioquímicos, quando comparados com os valores encontrados em JP1 (Figuras 18 a 22). Desta forma, estas evidências sugerem que a contaminação efetiva das áreas recifais sejam limitadas a áreas específicas onde eventualmente possa ter havido a acumulação desta emulsão de petróleo, que submergiu e/ou iniciou um processo de dissolução de seus componentes para a coluna de água.

Esta peculiaridade de uma possível variação espacial significativa em pequena escala da contaminação pelo petróleo emulsificado pode ser verificada também nos dados obtidos na região de Suape. As coletas de *S. fuscus* ocorreram ao longo do cordão arenítico recifal (Figura 11) que isola o CES na sua parte interna da área costeira externa, sendo que os peixes coletados em SP1 e SP2 antes do evento de contaminação por petróleo representam peixes coletados do lado interno deste cordão arenítico, voltado para o lado interno do Complexo Estuarino de Suape. SP3, SP4 e SP5 representam peixes coletados numa outra região deste mesmo cordão arenítico, em poças de maré isoladas na maré baixa, e conectadas com a área costeira externa ao CES.

Fen_{bile} (Figura 15) e Cri_{bile} (Figura 16) são maiores em SP1 e SP2 do que em SP3, que representa peixes coletados numa poça de maré profunda conectada com a área costeira externa, sem indícios de óleo, e onde foram registradas as menores medianas para HPAs biliares entre

todas as coletas no CES. Esta diferença pode estar relacionada ao fato de que peixes vivendo na área interna de CES (SP1 e SP2) estão sob maior influência das águas internas do CES, que fluem pelo canal de entrada e saída de água indicado pelas setas verdes na Figura 11, e se caracterizam por apresentarem maiores concentrações de HPAs pelas atividades do complexo industrial portuário, do que águas costeiras externas ao CES. Neste sentido, (Lemos, R. T. O. *et al.*, 2014) verificou que as maiores medianas das concentrações de HPAs dissolvidos e/ou dispersos avaliados por fluorescência dentro do CES ocorreram exatamente nestas regiões de entrada e saída de água no sistema estuarino, corroborando esta hipótese de que os peixes coletados em SP1 e SP2 estariam expostos a maiores concentrações de HPAs dissolvidos que são naturalmente encontrados no CES, do que os peixes coletados nas poças de maré mais em conexão com a área costeira externa do cordão arenítico recifal (Figura 11).

Os peixes coletados em SP4 provieram de uma poça de maré rasa na maré baixa, confinados e sem comunicação com a área costeira externa, e onde era visível a contaminação por pequenos fragmentos de óleo, inclusive se dissolvendo e se espalhando ao longo da superfície da água. Em algumas destas poças foi possível observar alguns exemplares de *Stegastes fuscus* abocanhando as pequenas manchas de óleo flutuante na superfície, provavelmente confundindo-as como possível item alimentar. Além disso, SP5 se refere a um grupo de peixes destas mesmas poças em que fragmentos de óleo eram visíveis, e que permaneceram na mesma água destas poças por mais 24 horas em laboratório. Os resultados indicam que Fen_{bille} , Cri_{bille} e Pir_{bille} aumentam significativamente em SP4 e SP5 em associação com uma indução da EROD de 484% em SP4 relativos a Japaratinga. Além disso, a CAT em SP3, SP4 e SP5 também foi induzida em 204%, 261%, 185%, respectivamente, relativo a Japaratinga.

Nos peixes da área recifal do Paiva que foram coletadas logo após o evento de contaminação por óleo (PV3) foram verificados os maiores aumentos dos HPAs biliares, relativos aos valores referenciais de Japaratinga. Foram verificados aumentos significativos nos peixes em PV3 de Fen_{bille} , Cri_{bille} e Pir_{bille} , de 378%, 342% e 358%, respectivamente, relativos aos valores observados na área de Japaratinga (JP1). Durante as coletas dos peixes em PV3 foi verificada a presença de massas de petróleo emulsificado depositados junto a areia no fundo dos arrecifes onde estavam estes peixes, o que aparentemente sugere que de fato estes peixes estavam expostos a estes HPAs que estavam se solubilizando da massa de petróleo depositada no fundo para a coluna de água. Além deste aumento dos HPAs biliares, nestas mesmas amostras (PV3) foram verificados aumentos das atividades da EROD (Figura 18) e da CAT

(Figura 20) de 599% e 254%, respectivamente, quando comparadas aos valores referenciais de Japaratinga (JP1).

A quantificação da atividade catalítica *in vivo* da enzima hepática EROD é um biomarcador relativamente específico da exposição de peixes a hidrocarbonetos halogenados planos como as dioxinas, furanos, bifenilas policloradas e HPAs, sendo que os mecanismos que levam a indução de sua atividade envolvem a ligação destes contaminantes com o receptor Ah, sua translocação para o núcleo celular, e a eventual indução da transcrição e síntese da proteína CYP1A, responsável por esta atividade catalítica padronizada (Whyte, J. J. *et al.*, 2000). A afinidade pelo receptor Ah destas diferentes moléculas de contaminantes está diretamente relacionada ao potencial de induzir aumentos na atividade da EROD, sendo que a molécula de dioxina 2,3,7,8-TCDD é a que apresenta maior afinidade por este receptor, e por sua vez tem o maior potencial de indução da EROD.

A potência relativa de diferentes HPAs como agonistas do receptor Ah e/ou indutores de CYP1A em peixes foi determinada, e verificou-se que os HPAs naftaleno (2 anéis aromáticos) e fenantreno (3 anéis) não apresentaram atividade, enquanto que HPAs de 4 ou mais anéis aromáticos como criseno e pireno apresentam significativo potencial de indução de CYP1A (Barron *et al.*, 2004). Esta abordagem molecular mecanística tem sido corroborada por experimentos *in vivo*. A exposição de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* isoladamente aos HPAs naftaleno e fenantreno em diferentes doses não levou a alterações na atividade da EROD, mas foi verificada indução significativa quando expostos ao criseno ou ao pireno (Pathiratne e Hemachandra, 2010). Apesar do aumento significativo dos HPAs biliares naftaleno, fenantreno, criseno e pireno nos peixes na área do Paiva em PV3 relatado acima, em associação com significativa indução da EROD nestes mesmos peixes, é provável que metabólitos de criseno e pireno sejam os principais responsáveis por esta indução. Nas coletas em Suape logo após o evento de contaminação por óleo, uma situação distinta em termos da associação de aumento dos HPAs biliares com indução da EROD foi verificada. A verificada indução significativa da EROD em peixes confinados em poças de maré nitidamente contaminadas por óleo em SP4, quando comparada com peixes coletados em poça aparentemente limpa conectada com a área externa (SP3), e com peixes coletados na região descrita para SP2 (Figura 18), está em concordância com um aumento de Pir_{bile} em SP4 comparado com SP3 e SP2 (Figura 17), que é um HPA com significativo potencial de indução de CYP1A (Barron *et al.*, 2004; Pathiratne e Hemachandra, 2010).

Neste estudo foi detectada uma indução significativa da CAT (Figura 20) após o evento de contaminação pelo óleo em peixes coletados na área recifal do Paiva (PV3), e em peixes coletados

em Suape (SP3, SP4 e SP5), em associação com aumentos significativos dos HPAs biliares fenantreno, criseno e pireno, semelhante ao padrão verificado da indução da EROD. Apesar de ter sido relatada a falta de sensibilidade e a inadequação desta enzima na detecção de alterações decorrentes da exposição a HPAs (Santana *et al.*, 2018), estes dados sugerem que sua aplicação no monitoramento de ambientes aquáticos contaminados não deve ser descartada. Foi detectada uma redução na peroxidação lipídica avaliada pelo protocolo TBARs (Figura 21) em amostras da área recifal do Paiva após a chegada do óleo em PV3, quando os peixes apresentaram maiores doses biliares de fenantreno, criseno e pireno, e também um aumento significativo da EROD e CAT. Apesar do potencial conhecido da biotransformação de fase 1 de HPAs pela EROD gerar EROs que podem por sua vez aumentar a peroxidação lipídica, é possível que nesta etapa inicial da exposição ao óleo em que os peixes foram coletados a indução de defesas antioxidantes enzimáticas como verificado neste estudo para a CAT, estivesse num primeiro momento levando a uma diminuição de TBARs.

A enzima acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel importante nos processos de condução nervosa na junção neuromuscular e é ligada normalmente a exposição a inseticidas, organofosforados e carbamatos (Sarkar *et al.*, 2006). Neste estudo foi detectada inibição significativa da AChE cerebral (Figura 22) em amostras de *Stegastes fuscus* coletadas em Boa Viagem na estação seca (BV2), em Suape na poça conectada com a área costeira externa (SP3), e na área do Paiva após a contaminação pelo óleo (PV3). Estas inibições detectadas em Boa Viagem na estação seca e em Suape (SP3) na poça de maré exposta a área costeira aberta não estão aparentemente relacionadas a um aumento de HPAs biliares, e sua relação com outros contaminantes é possível. Somente a inibição da AChE detectada em PV3 está associada a um aumento dos HPAs biliares, e foi relatado o potencial de que a exposição a HPA com maior número de anéis aromáticos pode inibir a AChE in vitro (Kang e Fang, 1997).

9 CONCLUSÕES

A dose biliar interna dos HPAs naftaleno, fenantreno, criseno e pireno em *Stegastes fuscus* por fluorescência fixa indicou que peixes das áreas recifais das praias de Japaratinga e Serrambi apresentam menores concentrações destes HPAs biliares, e níveis basais de biomarcadores bioquímicos EROD, GST, CAT e AChE. Além disso, a quantificação dos HPAs biliares também se mostrou um parâmetro sensível e diagnóstico de um aumento significativo da bioconcentração de HPAs pelos peixes após o início do evento de contaminação das áreas recifais da Praia do Paiva e de Suape pelo petróleo emulsificado, em associação a um aumento das enzimas de biotransformação de fase 1 EROD e de defesa antioxidante catalase.

A continuidade deste monitoramento, incluindo outras medidas de alterações biológicas mais ecologicamente relevantes como alterações histopatológicas e comportamentais ao longo das áreas recifais impactadas pelo petróleo é recomendada, e permitirá avaliar as tendências e consequências deste desastre ao longo dos próximos meses e anos.

A análise dos metabólitos de HPAs na bile pelo método de fluorescência fixa se mostrou eficiente e sensível para o estabelecimento de valores referência para os ambientes recifais monitorados, bem como para a quantificação e detecção de aumento da contaminação interna de exemplares de *Stegastes fuscus* por HPAs nas diferentes áreas estudadas.

As análises de metabólitos de HPAs na bile, EROD, GST, CAT e AChE permitiram avaliar efeitos biológicos decorrentes da exposição da espécie *Stegastes fuscus* a HPAs.

A donzelinha *Stegastes fuscus*, além de ser uma espécie chave das áreas recifais do litoral nordestino, se mostrou uma boa espécie sentinela e viável para utilização em programas de biomonitoramento ecotoxicológico dos ambientes recifais.

As ferramentas e estratégias utilizadas neste estudo podem ser aplicadas em outros ambientes impactados pelo petróleo ao longo do litoral brasileiro.

REFERÊNCIAS

AAS, E.; BEYER, J.; GOKSOYR, 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**, v. 5, n. 1, p. 9-23, 2000/01/01 2000. ISSN 1354-750X.

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**, v. 5, n. 1, p. 9-23, 2000.

ALMROTH, B. C. et al. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 2, p. 171-180, 2005/06/15/ 2005. ISSN 0166-445X.

ANDERSON, J. W.; LEE, R. F. Use of Biomarkers in Oil Spill Risk Assessment in the Marine Environment. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 12, n. 6, p. 1192-1222, 2006/12/01 2006. ISSN 1080-7039.

ANKLEY, G. T. et al. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 730-741, 2010. ISSN 0730-7268.

ARAÚJO, M. C. B. et al. Análise da Ocupação Urbana das Praias de Pernambuco, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada - Journal of Integrated Coastal Zone Management**, v. 7, n. 2, p. 97-104, 2007.

BALLESTEROS, M. L. et al. Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. **Science of The Total Environment**, v. 595, p. 711-722, 2017/10/01/ 2017. ISSN 0048-9697.

BARRON, M. G.; HEINTZ, R.; RICE, S. D. Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. **Mar Environ Res**, v. 58, n. 2-5, p. 95-100, 2004 2004. ISSN 0141-1136.

BARTELL, S. Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects . Edited by Claude Amiard-Triquet , Jean-Claude Amiard , and Philip S. Rainbow . Boca Raton (Florida): CRC Press (Taylor & Francis Group). \$119.95. xiii + 450 p.; ill.; index. ISBN: 978-1-4398-8017-3. 2013. **The Quarterly Review of Biology**, v. 89, p. 382-383, 12/01 2014.

BAUM, G. et al. Metabolic performance of the coral reef fish *Siganus guttatus* exposed to combinations of water borne diesel, an anionic surfactant and elevated temperature in Indonesia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 110, n. 2, p. 735-746, 2016/09/30/ 2016. ISSN 0025-326X.

BBC. Brazil oil spill: Where has it come from? <https://www.bbc.com/news/world-latin-america-50223106>, 2019.

BEENS, J.; BRINKMAN, U. A. T. The role of gas chromatography in compositional analyses in the petroleum industry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 260-275, 2000/04/01/ 2000. ISSN 0165-9936.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of biological chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952/03// 1952. ISSN 0021-9258.

BERNAL-REY, D. L. et al. Seasonal variations in the dose-response relationship of acetylcholinesterase activity in freshwater fish exposed to chlorpyrifos and glyphosate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 187, p. 109673, 2020/01/15/ 2020. ISSN 0147-6513.

BERTHET, B. Chapter 9 - Reference Species. In: AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.-C., et al (Ed.). **Aquatic Ecotoxicology**: Academic Press, 2015. p.205-227. ISBN 978-0-12-800949-9.

BEYER, J. et al. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 3, p. 224-244, 2010/11/01/ 2010. ISSN 1382-6689.

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**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07/ 1976. ISSN 0003-2697.

BRETTE, F. et al. Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish. **Science**, v. 343, n. 6172, p. 772-6, Feb 14 2014. ISSN 0036-8075.

BRUSSAARD, C. P. D. et al. Immediate ecotoxicological effects of short-lived oil spills on marine biota. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11206, 2016/04/04 2016. ISSN 2041-1723.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 201-268, 1995/08/01 1995. ISSN 1064-3389.

BURGEOT, T. et al. **Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea** 1996.

CERIONI, C. Governo foi lento e inepto na reação a vazamentos, dizem equipes do Ibama. <https://exame.abril.com.br/brasil/governo-foi-lento-e-inepto-na-reacao-a-vazamentos-dizem-equipes-do-ibama/>, 2019.

COLLIER, T. K. et al. 4 - Effects on Fish of Polycyclic Aromatic HydrocarbonS (PAHS) and Naphthenic Acid Exposures. In: TIERNEY, K. B.; FARRELL, A. P., et al (Ed.). **Fish Physiology**: Academic Press, v.33, 2013. p.195-255. ISBN 1546-5098.

COLVIN, K. A.; LEWIS, C.; GALLOWAY, T. S. Current issues confounding the rapid toxicological assessment of oil spills. **Chemosphere**, v. 245, p. 125585, 2020/04/01/ 2020. ISSN 0045-6535.

COSTANZA, R. et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 253-260, 1997/05/01 1997. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/387253a0> >.

D BURKE, M.; MAYER, R. **Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene.** 1973. 583-8.

DUARTE, I. A. et al. Biomarker and behavioural responses of an estuarine fish following acute exposure to fluoxetine. **Marine Environmental Research**, v. 147, p. 24-31, 2019/05/01/ 2019. ISSN 0141-1136.

DUTTA, T. K.; HARAYAMA, S. Fate of Crude Oil by the Combination of Photooxidation and Biodegradation. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 8, p. 1500-1505, 2000/04/01 2000. ISSN 0013-936X.

ESCOBAR, H. Mysterious oil spill threatens marine biodiversity haven in Brazil. <https://www.sciencemag.org/news/2019/11/mysterious-oil-spill-threatens-marine-biodiversity-haven-brazil>, 2019.

F. PAYNE, J.; MATHIEU, A.; COLLIER, T. **Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish.** 2003. 191-224 ISBN 9780470867136.

FABRIN, T. M. C. et al. Performance of biomarkers metallothionein and ethoxyresorufin O-deethylase in aquatic environments: A meta-analytic approach. **Chemosphere**, v. 205, p. 339-349, 2018/08/01/ 2018. ISSN 0045-6535.

FEITOSA, J. L. L. et al. Food resource use by two territorial damselfish (Pomacentridae: Stegastes) on South-Western Atlantic algal-dominated reefs. **Journal of Sea Research**, v. 70, p. 42-49, 2012/05/01/ 2012. ISSN 1385-1101.

FERREIRA, C. E. L. et al. Trophic structure patterns of Brazilian reef fishes: a latitudinal comparison. **Journal of Biogeography**, v. 31, n. 7, p. 1093-1106, 2004. ISSN 0305-0270.

FERREIRA, C. E. L. et al. Herbivory by the Dusky Damselfish *Stegastes fuscus* (Cuvier, 1830) in a tropical rocky shore: effects on the benthic community. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 229, n. 2, p. 241-264, 1998/11/01/ 1998. ISSN 0022-0981.

FERREIRA DA COSTA, M. et al. Verticalização da Praia da Boa Viagem (Recife, Pernambuco) e suas Consequências Sócio-Ambientais. **Revista de Gestão Costeira Integrada - Journal of Integrated Coastal Zone Management**, v. 8, n. 2, p. 233-245, 2008.

FRANCO, M. E.; LAVADO, R. Applicability of in vitro methods in evaluating the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish: Advances and challenges. **Science of The Total Environment**, v. 671, p. 685-695, 2019/06/25/ 2019. ISSN 0048-9697.

GAGNON, M. M.; RAWSON, C. A. Bioindicator species for EROD activity measurements: A review with Australian fish as a case study. **Ecological Indicators**, v. 73, p. 166-180, 2017/02/01/ 2017. ISSN 1470-160X.

GOKSØYR, A. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. In: DEGEN, G. H.;SEILER, J. P., *et al*, Toxicology in Transition, 1995, Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg, 1995//. p.80-95.

GOLD-BOUCHOT, G. *et al*. Pollutants and biomarker responses in two reef fish species (*Haemulon aurolineatum* and *Ocyurus chrysurus*) in the Southern Gulf of Mexico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 116, n. 1, p. 249-257, 2017/03/15/ 2017. ISSN 0025-326X.

GROS, J. *et al*. First Day of an Oil Spill on the Open Sea: Early Mass Transfers of Hydrocarbons to Air and Water. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 16, p. 9400-9411, 2014/08/19 2014. ISSN 0013-936X.

H. HABIG, W.; PABST, M.; JAKOBY, W. **Glutathione S-transferase, The first enzymatic step in mercapturic acid formation.** 1974. 7130-9.

HEERY, E. C. *et al*. Urban coral reefs: Degradation and resilience of hard coral assemblages in coastal cities of East and Southeast Asia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, p. 654-681, 2018/10/01/ 2018. ISSN 0025-326X.

HINTON, D.; DI GIULIO, R. **The Toxicology of Fishes.** 2008. ISBN ISBGN-13: 978-0-415-24868-6.

HONG, W.-J. *et al*. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and alkylated PAHs in the coastal seawater, surface sediment and oyster from Dalian, Northeast China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 11-20, 2016/06/01/ 2016. ISSN 0147-6513.

INCARDONA, J. P. *et al*. Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. **Aquatic Toxicology**, v. 142-143, p. 303-316, 2013.

JALES, M. C. *et al*. O ecossistema recifal de Serrambi (Pernambuco-Brasil): composição fitoplanctônica. 2013.

JOHANSEN, J. L. *et al*. Publisher correction: Oil exposure disrupts early life-history stages of coral reef fishes via behavioural impairments. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 9, p. 1412-1412, 2017/09/01 2017. ISSN 2397-334X.

JUNIOR, J. L. B.; DIAZ, X.; NEUMANN-LEITÃO, S. Diversidade de larvas de peixes das áreas internas e externas do porto de Suape (Pernambuco-Brazil). **Tropical Oceanography**, v. 39, p. 1-13, 2011.

KANG, J.-J.; FANG, H.-W. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Inhibit the Activity of Acetylcholinesterase Purified from Electric Eel. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 238, n. 2, p. 367-369, 1997/09/18/ 1997. ISSN 0006-291X.

KAUSHAL, J. *et al*. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 192-199, 2018/10/01/ 2018. ISSN 1878-8181.

KHURSIGARA, A. J.; ACKERLY, K. L.; ESBAUGH, A. J. Oil toxicity and implications for environmental tolerance in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 220, p. 52-61, 2019/06/01/ 2019. ISSN 1532-0456.

LEMOS, R. T. D. O.; CARVALHO, P. S. M. D.; ZANARDI-LAMARDO, E. Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. **Marine Pollution Bulletin**, v. 82, n. 1, p. 183-188, 2014/05/15/ 2014. ISSN 0025-326X.

LEMOS, R. T. O.; CARVALHO, P. S. M.; ZANARDI-LAMARDO, E. Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. **Marine Pollution Bulletin**, v. 82, n. 1-2, p. 183-188, 2014.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. Rapid kinetic microassay for catalase activity. **Journal of biomolecular techniques : JBT**, v. 18, n. 4, p. 185-187, 2007. ISSN 1524-0215.

LIN, E. L. C.; CORMIER, S. M.; TORSSELLA, J. A. Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence: Comparison with HPLC-fluorescent detection. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 35, n. 1, p. 16-23, 1996.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar Pollut Bull**, v. 42, n. 8, p. 656-66, Aug 2001. ISSN 0025-326X (Print)0025-326x.

LIVINGSTONE, D. R. et al. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, n. 11, p. 602-606, 1993/11/01/ 1993. ISSN 0025-326X.

LOGAN, D. T. Perspective on Ecotoxicology of PAHs to Fish. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 13, n. 2, p. 302-316, 2007/03/20 2007. ISSN 1080-7039.

LUCAS, J. et al. Effects of pyrolytic and petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on swimming and metabolic performance of zebrafish contaminated by ingestion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 132, p. 145-152, 2016/10/01/ 2016. ISSN 0147-6513.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011/01/17/ 2011. ISSN 0166-445X.

MADRUGA FILHO, D. Aspectos geoambientais entre as praias do Paiva e Gaibú, Município do Cabo de Santo Agostinho (Litoral sul de Pernambuco). 2004.

MMA, M. D. M. A. Cartas de Sensibilidade ao Óleo. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/cartas-de-sensibilidade-ao-oleo>>.

MYERS, M. S.; JOHNSON, L. L.; COLLIER, T. K. Establishing the Causal Relationship between Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and Hepatic Neoplasms and Neoplasia-Related Liver Lesions in English Sole (*Pleuronectes vetulus*). **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 9, n. 1, p. 67-94, 2003/01/01 2003. ISSN 1080-7039.

NARBONNE, J. F. et al. Biological Markers of Environmental Contamination in Marine Ecosystems: Biomar Project Coordinating Group. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 18, n. 3-4, p. 205-220, 1999/01/01 1999. ISSN 0731-3837.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE ON OIL IN THE SEA: INPUTS, F.; EFFECTS. In: (Ed.). **Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects**. Washington (DC): National Academies Press (US)

Copyright 2003 by the National Academy of Sciences. All rights reserved., 2003.

NEWMAN, M. C. Ecotoxicology: The History and Present Directions. In: JØRGENSEN, S. E. e FATH, B. D. (Ed.). **Encyclopedia of Ecology**. Oxford: Academic Press, 2008. p.1195-1201. ISBN 978-0-08-045405-4.

OLIVEIRA, R. V. D. Suape em construção, peões em luta: o novo desenvolvimento e os conflitos do trabalho. **Caderno CRH**, v. 26, p. 233-252, 2013. ISSN 0103-4979.

PAMPANIN, D. M. et al. Biological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their first metabolic products in in vivo exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 79, n. 13-15, p. 633-646, 2016/08/02 2016. ISSN 1528-7394.

PASPARAKIS, C. et al. Impacts of deepwater horizon oil on fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 224, p. 108558, 2019/10/01/ 2019. ISSN 1532-0456.

PATHIRATNE, A.; HEMACHANDRA, C. K. Modulation of ethoxyresorufin O-deethylase and glutathione S-transferase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by polycyclic aromatic hydrocarbons containing two to four rings: Implications in biomonitoring aquatic pollution. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 6, p. 1012-1018, 2010.

PATHIRATNE, A.; HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, K. A. S. Assessment of bile fluorescence patterns in a tropical fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to naphthalene, phenanthrene, pyrene and chrysene using fixed wavelength fluorescence and synchronous fluorescence spectrometry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 5, p. 554-558, 2010.

PATIN, S. Environmental Impact of Crude Oil Spills☆. In: (Ed.). **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-409548-9.

PEEBUA, P. et al. Evaluation of alachlor herbicide impacts on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using biochemical biomarkers. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 78, n. 2, p. 138-141, // 2007. ISSN 00074861 (ISSN).

PONTES, B.; CASTILHO, C. D. O conceito e a instrumentalização da natureza: olhares transversais na dinâmica territorial da Praia do Paiva-PE. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 9, n. 03, p. 722-736, 2016.

POWERS, D. Fish as model systems. **Science**, v. 246, n. 4928, p. 352-358, 1989.

RAMDINE, G. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from mangrove of Guadeloupe: Levels, bioavailability, and effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 80-89, 2012/05/01/ 2012. ISSN 0147-6513.

RECABARREN-VILLALÓN, T.; RONDA, A. C.; ARIAS, A. H. Polycyclic aromatic hydrocarbons levels and potential biomarkers in a native South American marine fish. **Regional Studies in Marine Science**, v. 29, p. 100695, 2019/05/01/ 2019. ISSN 2352-4855.

REYNAUD, S.; DESCHAUX, P. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 2, p. 229-238, 2006/05/01/ 2006. ISSN 0166-445X.

RUDDOCK, P.; BIRD, D.; MCCALLEY, D. Bile Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Three Species of Fish from the Severn Estuary. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 51, p. 97-105, 03/01 2002.

S. NELSON, J.; GRANDE, T.; WILSON, M. **Fishes of the World, Fifth Edition**. 2016. ISBN 9871118342336.

SANNI, S. et al. I: Biomarker quantification in fish exposed to crude oil as input to species sensitivity distributions and threshold values for environmental monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 125, n. Supplement C, p. 10-24, 2017/04/01/ 2017. ISSN 0141-1136.

SANTANA, M. S. et al. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 449-461, 2018/11/01/ 2018. ISSN 0269-7491.

SARKAR, A. et al. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 4, p. 333-340, 2006/05/01 2006. ISSN 1573-3017.

SCHWAMBORN, S. H. L.; FERREIRA, B. P. Age Structure and Growth of the Dusky Damsel fish, *Stegastes Fuscus*, From Tamandaré Reefs, Pernambuco, Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 63, n. 1, p. 79-88, 2002/01/01 2002. ISSN 1573-5133.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem J**, v. 360, n. Pt 1, p. 1-16, Nov 15 2001. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021.

SILVA, J. S. et al. Spatial and Temporal Patterns of Use of Boa Viagem Beach, Northeast Brazil. **Journal of Coastal Research**, v. 24, n. sp1, p. 79-86, 8, 2008.

SOLTANI, N. et al. Potentially toxic elements (PTEs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish and prawn in the Persian Gulf, Iran. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p. 251-265, 2019/05/30/ 2019. ISSN 0147-6513.

SPEIGHT, J. G. Chapter 4 - Mechanisms of Introduction Into the Environment. In: SPEIGHT, J. G. (Ed.). **Reaction Mechanisms in Environmental Engineering**: Butterworth-Heinemann, 2018. p.115-161. ISBN 978-0-12-804422-3.

STENERSEN, J. **Chemical pesticides mode of action and toxicology**. CRC press, 2004. ISBN 0203646835.

STEPHENSEN, E. K. et al. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 431-442, 2000/04/01/ 2000. ISSN 0166-445X.

SUAPE. <http://www.suape.pe.gov.br/en/business/complex-s-development-poles>. 2019. Acesso em: September 1st.

SUTER, G., CORMIER, S., & NORTON, S. . Ecological epidemiology and causal analysis. In: SUTER, G. W. (Ed.). **Ecological risk assessment**. Boca Raton: CRC Press, 2nd ed 2007. p.39–68.

TARAZONA, J. V.; RAMOS-PERALONSO, M. J. Ecotoxicology A2 - Wexler, Philip. In: (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p.276-280. ISBN 978-0-12-386455-0.

TRISCIANI, A. et al. Hepatic biotransformation genes and enzymes and PAH metabolites in bile of common sole (*Solea solea*, Linnaeus, 1758) from an oil-contaminated site in the Mediterranean Sea: A field study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 806-814, 2011/04/01/ 2011. ISSN 0025-326X.

TURNER, N. R.; RENEGAR, D. A. Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 119, n. 2, p. 1-16, 2017/06/30/ 2017. ISSN 0025-326X.

UTLEY, H. G.; BERNHEIM, F.; HOCHSTEIN, P. Effect of sulfhydryl reagents on peroxidation in microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 118, n. 1, p. 29-32, 1967/01/01/ 1967. ISSN 0003-9861.

VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178-189, 2006/06/01/ 2006. ISSN 0147-6513.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003/02/01/ 2003. ISSN 1382-6689.

VAN DER OOST, R. et al. Identifying adverse outcome pathways (AOP) for Amsterdam city fish by integrated field monitoring. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 74, p. 103301, 2020/02/01/ 2020. ISSN 1382-6689.

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

WHYTE, J. et al. Ethoxyresorufin- O -deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, p. 347-570, 08/01 2000.

WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 347-570, 2000.

YU, Z. et al. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wild marine fish from the coastal waters of the northern South China Sea: Risk assessment for human health. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 742-748, 2019/09/30/ 2019. ISSN 0147-6513.

ZHOU, H. et al. Ecotoxicology: The History and Present Direction☆. In: FATH, B. (Ed.). **Encyclopedia of Ecology (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, 2019. p.415-423. ISBN 978-0-444-64130-4.