



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

MAIANNE JESSICA DA SILVA SANTOS

**TOXICIDADE DA FRAÇÃO ACOMODADA EM ÁGUA DO ÓLEO ENCONTRADO
NO LITORAL PERNAMBUCANO EM 2019 NA OSTRÁ-DE-FUNDO *Crassostrea
gasar* (Adanson, 1757)**

RECIFE
2024

MAIANNE JESSICA DA SILVA SANTOS

**TOXICIDADE DA FRAÇÃO ACOMODADA EM ÁGUA DO ÓLEO ENCONTRADO
NO LITORAL PERNAMBUCANO EM 2019 NA OSTRÁ-DE-FUNDO *Crassostrea*
gasar (Adanson, 1757)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Co-orientador: MSc. Célio Freire Mariz Jr.

RECIFE
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Santos, Maianne Jessica da Silva.

Toxicidade da fração acomodada em água do óleo encontrado no litoral pernambucano em 2019 na ostra-de-fundo *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) / Maianne Jessica da Silva Santos. - Recife, 2024.

47 : il., tab.

Orientador(a): Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Coorientador(a): Célio Freire Mariz Jr.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências Ambientais - Bacharelado, 2024.

Inclui referências.

1. Ecotoxicologia. 2. Biomarcadores bioquímicos. 3. Derramamento de óleo. 4. *Crassostrea gasar*. I. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de . (Orientação). II. Mariz Jr., Célio Freire . (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

MAIANNE JESSICA DA SILVA SANTOS

**TOXICIDADE DA FRAÇÃO ACOMODADA EM ÁGUA DO ÓLEO ENCONTRADO
NO LITORAL PERNAMBUCANO EM 2019 NA OSTRÁ-DE-FUNDO *Crassostrea*
gasar (Adanson, 1757)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Aprovada em: 07/10/2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho (Orientador)
Departamento de Zoologia - UFPE

Dr. Rômulo Nepomuceno Alves/UFPE
(1º Titular)

MSc. Maria Karolaine de Melo Alves/UFPE
(2º Titular)

RECIFE

2024

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado tantos benefícios ao longo da minha vida, mesmo eu não merecendo absolutamente nada. Agradeço imensamente a Nossa Senhora, minha mãezinha querida, a quem rezei constantemente e sempre me ajudou nos meus momentos de maior desespero. E também a todos os Santos por intercederem por mim e serem uma inspiração de vida e conduta.

Sou profundamente grata ao meu orientador, Paulo Carvalho, por todo o apoio, encorajamento e aprendizado que o senhor me proporcionou ao longo da elaboração deste trabalho e da minha estadia no LABECOTOX. Sua disponibilidade para discutir ideias e sua preocupação com o crescimento profissional de seus alunos é admirável.

Minha mais sincera gratidão ao meu coorientador, Célio Mariz, por todas as correções, puxões de orelha, elogios, gargalhadas e ensinamentos. Mesmo lidando com suas próprias obrigações, jamais me deixou na mão, e por isso eu sou infinitamente grata. Obrigado por tudo Cé, eu espero um dia ser capaz de retribuir tudo que você me proporcionou.

Agradeço aos meus pais, Jeová e Marizete, pois jamais me deixaram faltar nada e sempre lutaram pra me dar tudo do bom e do melhor. Darei tudo de mim para honrar os sacrifícios que vocês fizeram para me trazer até aqui. Agradeço ao meu namorado, Juan Oliveira, por ser meu porto seguro e maior confidente. A minha amiga, Raissa Vila Nova, por todos esses anos de amizade e parceria. A minha prima/irmã, Juliane Bastos, que é uma inspiração desde a infância. A minhas amigas de graduação, Silvia e Yasmim, por tornarem a graduação mais leve e agradável com muitas risadas e companheirismo. E a tantos outros que foram vitais nessa etapa da minha vida e que não conseguirei agradecer individualmente pelo espaço limitado. Obrigado Euzébio, Thiago, Nataly, Michelle, Ana e Rayanne.

Agradeço a todos que pude conhecer no LABECOTOX. A Clara Almeida, por ser minha casca de bala e me apoiar em tudo que eu me propunha a fazer. A Maria, pela doçura nas palavras, pela paciência ao ensinar e por ajudar imensamente na construção deste trabalho. A Letícia, por todo carinho que me deu, foi um presente ter te conhecido. A Shay, por confiar em mim até quando eu não confiava e por me fazer rir até do vento. A Natallia, por toda a ajuda prestada e palavras bonitas. E a todos os outros que conheci recentemente, mas que sempre estavam lá quando eu precisava. Obrigado Thalita, Larissa, Bia, Duda e Gabi.

Sou grata ao Organomar por toda a ajuda e ensinamentos, em especial a professora Eliete Zanardi, e a suas orientandas, Júlia Griz e Roxanny.

Agradeço a UFPE e ao CNPq pelas bolsas, que garantiram minha permanência na universidade.

“É justo que muito custe o que muito vale”

Santa Teresa D'Ávila

RESUMO

Em agosto de 2019, o Brasil sofreu um dos maiores derramamentos de petróleo de sua história, com manchas de óleo atingindo praias do nordeste e espalhando-se ao longo da costa. O óleo foi coletado na Praia do Paiva e foi preparada uma fração acomodada em água (FAA) para ser utilizada em um experimento que avaliou efeitos tóxicos deste óleo através da exposição de ostras da espécie *Crassostrea gasar*, a FAA. As ostras foram expostas a diluições de 5% e 12,5% de FAA por um período de 96 horas, que correspondem a concentrações de uma soma de HPAs totais (Σ HPAt) igual a 8,5 e 21,8 ng- Σ PAHt L⁻¹. Após o período de exposição, as brânquias e glândula digestiva foram dissecadas e armazenadas a -80 °C para análise de biomarcadores bioquímicos, incluindo as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), além da peroxidação lipídica (TBARs) e acetilcolinesterase (AChE).

Os resultados demonstraram alterações importantes nas ostras expostas. Nas brânquias, foi observada uma redução significativa da atividade da SOD nas ostras expostas à diluição de 12,5%, enquanto na glândula digestiva, não houve mudanças significativas na atividade da SOD. Quanto à GST, a atividade dessa enzima foi induzida nas brânquias das ostras expostas à concentração mais alta de FAA (12,5%), no entanto, na glândula digestiva, a atividade da GST não apresentou alterações significativas em nenhuma das diluições testadas. A atividade da CAT não revelou mudanças estatisticamente significativas em ambos os tecidos. Já a enzima AChE apresentou uma diminuição de atividade nas brânquias das ostras, mas na glândula digestiva não foi observada alteração. Por fim, a peroxidação lipídica, medida pelos níveis de malondialdeído (MDA), nas brânquias apresentou uma redução, enquanto na glândula digestiva os níveis de MDA não mostraram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle. Esses resultados indicam que a exposição a FAA do óleo em diluições iguais a 12,5% induz alterações bioquímicas significativas nas ostras, especialmente nas brânquias, afetando sua capacidade antioxidante e atividade enzimática.

Palavras chave: HPAs, FAA, derramamento de óleo, biomarcadores bioquímicos

ABSTRACT

In August 2019, Brazil suffered one of the largest oil spills in its history, with oil slicks hitting beaches in the northeast and spreading along the coast. The oil was collected at Praia do Paiva and a water-accommodated fraction (WAF) was prepared to be used in an experiment that assessed the toxic effects of this oil by exposing *Crassostrea gasar* oysters to WAF. The oysters were exposed to 5% and 12.5% dilutions of WAF for a period of 96 hours, corresponding to concentrations of a sum of total PAHs (Σ PAHt) equal to 8.5 and 21.8 ng- Σ PAHt L⁻¹. After the exposure period, the gills and digestive gland were dissected and stored at -80 °C for analysis of biochemical biomarkers, including the enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), as well as lipid peroxidation (TBARs) and acetylcholinesterase (AChE).

The results showed significant changes in the exposed oysters. In the gills, a significant reduction in SOD activity was observed in oysters exposed to the 12.5% dilution, while in the digestive gland, there were no significant changes in SOD activity. As for GST, the activity of this enzyme was induced in the gills of oysters exposed to the highest dilution of WAF (12.5%), however, in the digestive gland, GST activity did not show significant changes at any of the dilutions tested. CAT activity showed no statistically significant changes in either tissue. The enzyme AChE showed a decrease in activity in oyster gills, but no change was observed in the digestive gland. Finally, lipid peroxidation, measured by malondialdehyde (MDA) levels, showed a reduction in the gills, while in the digestive gland MDA levels showed no significant differences when compared to the control group. These results indicate that exposure to WAF oil in dilutions equal to 12.5% induces significant biochemical changes in oysters, especially in the gills, affecting their antioxidant capacity and enzymatic activity.

Keywords: PAHs, WAF, oil spill, biochemical biomarkers

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Hierarquia biológica das possíveis medidas de toxicidade dos contaminantes e suas características	17
Figura 2: Esquema ilustrativo das etapas da preparação da FAA	28
Figura 3: Sala de exposição dos aquários	29
Figura 4: Esquema ilustrativo do processamento das amostras de tecido de <i>C. gasar</i>	30
Figura 5: Concentração de malondialdeído (MDA) presente na brânquia e na glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gasar</i> após 96h de exposição a concentrações crescentes da fração acomodada do óleo coletado no litoral de Pernambuco	34
Figura 6: Atividade da catalase (CAT) na brânquia e na glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gasar</i> após 96h de exposição a concentrações crescentes da fração acomodada do óleo coletado no litoral de Pernambuco	34
Figura 7: Atividade da Glutathione-S-Transferase na brânquia e na glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gasar</i> após 96h de exposição a concentrações crescentes da fração acomodada do óleo coletado no litoral de Pernambuco	35
Figura 8: Atividade da Superóxido dismutase (SOD) na brânquia e na glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gasar</i> após 96h de exposição a concentrações crescentes da fração do óleo coletado no litoral de Pernambuco	36
Figura 9: Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) na brânquia e na glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gasar</i> após 96h de exposição a concentrações crescentes da fração acomodada do do óleo coletado no litoral de Pernambuco	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração Total de HPAs extraídos da solução bruta (100%) da FAA preparada com amostras coletadas de óleo no litoral de Pernambuco	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-ER	7- Etoxiresorufina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CAT	Catalase
CDNB	Cloro-2,4-dinitrobenzeno
DTNB	Ditiobisnitrobenzato
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EROD	Enzima Orto-deetilase
FAA	Fração acomodada em água
GPX	Glutathiona Peroxidase
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona-s-Transferase
HCl	Ácido Clorídrico
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
KPI	Fosfato de Potássio
LPO	Peroxidação Lipídica
MDA	Malondialdeído
PI	Padrão Interno
PSU	Unidade Prática de Salinidade
RCF	Etoxiresorufina
SI	Substrato Iniciador
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	Toxicologia	15
2.2	Ecotoxicologia	15
2.3	Petróleo.....	18
2.4	Acidentes com Petróleo	19
2.5	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	21
2.6	Ostras e a espécie <i>Crassostrea gasar</i> como organismo modelo para estudos ecotoxicológicos	21
2.7	Biomarcadores bioquímicos de contaminação ambiental	23
2.7.1	Biomarcadores de neurotoxicidade	23
2.7.2	Biomarcadores de estresse oxidativo	24
2.7.3	Biomarcadores de biotransformação.....	26
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivos gerais.....	26
3.1.1	Objetivos específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Obtenção das ostras <i>C. gasar</i>	27
4.2	Preparação da fração acomodada do óleo em água e caracterização da concentração de HPAs	27
4.3	Desenho experimental da exposição.....	28
4.4	Processamento das amostras	29
4.5	Biomarcadores bioquímicos após 96 horas de exposição	30
4.5.1	Biotransformação de fase II glutathiona S-Transferase (GST).....	30
4.5.2	Defesas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD)	30
4.5.3	Catalase (CAT).....	31

4.5.4	Peroxidação lipídica pelo método do malondialdeído (TBARs).....	31
4.5.5	Acetilcolinesterase (AChE).....	31
4.6	Análise estatística.....	32
5	RESULTADOS.....	32
5.1	Quantificação de HPAs na amostra de FAA	32
5.2	Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo e de neurotoxicidade	33
5.2.1	Peroxidação Lipídica (TBARs).....	33
5.2.2	Catalase (CAT).....	34
5.2.3	Glutathione-S-transferase (GST).....	35
5.2.4	Superóxido Dismutase (SOD).....	35
5.2.5	Acetilcolinesterase (AChE).....	36
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	40
8	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é um recurso não-renovável amplamente utilizado na sociedade moderna, desempenhando um papel crucial em diversos setores, como a produção de energia elétrica, a indústria e o transporte (Martins, 2019). Cerca de 90% de sua composição total é formada pelos chamados hidrocarbonetos alifáticos, e entre 5 a 10% é composto por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Meador, 2003), que constituem uma classe de compostos formados por dois ou mais anéis benzênicos condensados (Li et al., 2017). Esses compostos tem chamado atenção da comunidade científica devido às suas características tóxicas, sendo 16 HPAs identificados como poluentes prioritários para monitoramento ambiental (Perrichon et al., 2016) pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).

Apesar da relevância do petróleo como fonte primordial de combustível e de suas múltiplas aplicações na sociedade moderna, é importante considerar os danos ambientais que sua exploração pode causar. Os ecossistemas próximos às áreas de extração, refino, processamento, distribuição e rotas de transporte de petróleo estão altamente susceptíveis aos impactos diretos e indiretos dessas atividades (Martins, 2019), pois essas operações relacionadas a exploração deste recurso tão valioso configuram potenciais fontes de poluição ambiental (Kataoka, 2001).

Mesmo com os avanços tecnológicos nas práticas de exploração, transporte e armazenamento do petróleo, acidentes ainda ocorrem com certa frequência, resultando no despejo anual de cerca de 2,5 milhões de toneladas de petróleo no oceano (Etkin, 1998). Embora os derramamentos acidentais não sejam a principal fonte de introdução do óleo no ambiente, eles ganham notoriedade por estarem associados a impactos severos que afetam diretamente a biodiversidade do ecossistema marinho, mesmo em derramamentos de menor escala, conforme resultados observados em Brussaard et al. (2016). Entre setembro e novembro de 2019, a costa nordeste brasileira foi impactada por densas massas de resíduos de petróleo, caracterizando um desastre ambiental em grande escala que se estendeu por 3000 km e afetou diversos ecossistemas costeiros (Magalhães et al., 2021; Magris and Giarrizzo, 2020).

Diante dessa situação, as atividades de monitoramento ambiental adotam como modelo em seus estudos ecotoxicológicos as espécies sentinelas, que por serem sensíveis à presença de um ou vários poluentes, determinam de forma mensurável a

toxicidade desses poluentes no ambiente, servindo para indicar precocemente possíveis riscos ao ecossistema (Berthet, 2015).

Programas de monitoramento do ambiente aquático vêm utilizando com frequência peixes e bivalves como organismos biomonitores (Cajaraville et al., 2000). Os moluscos bivalves (ex.: mexilhões e ostras) em especial apresentam várias características biológicas e ecológicas que representam vantagens para sua utilização neste tipo de estudo, como a alimentação através da filtração, estilo de vida sésil e alta capacidade de bioacumular poluentes (Niyogi et al., 2001).

Os moluscos bivalves desempenham uma função significativa na alimentação humana, sendo uma valiosa fonte de nutrientes essenciais e de proteína de alta qualidade (Oliveira, 2012). Eles apresentam algumas vantagens em comparação a outros grupos biológicos por serem organismos sésseis, o que facilita sua amostragem (Borja et al., 2000; Joyce et al., 2015). Além disso, como são organismos filtradores, eles têm a capacidade de concentrar em seus tecidos os contaminantes presentes no ambiente em que vivem, através do processo de bioacumulação (Zuykov et al., 2013).

Em virtude de suas características, os moluscos bivalves são organismos sentinelas excelentes em atividades de biomonitoramento e estudos de contaminação em ambientes aquáticos (León et al., 2013). Por exemplo, um estudo envolvendo ostras da espécie *Crassostrea brasiliana* expostas ao diesel numa FAA, indicaram a alta capacidade desse organismo em bioacumular hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de maneira dependente da dose (Lüchmann et al., 2011).

No contexto do litoral brasileiro, a ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) é uma espécie estuarina de grande importância econômica e ecológica, que é amplamente distribuída ao longo da costa e que pode ser encontrada em ambientes estuarinos do litoral pernambucano (Nascimento, 1991), estando presente inclusive nas regiões afetadas pela chegada do óleo no litoral brasileiro em 2019. Sua utilização é muito relevante em estudos de contaminação, sendo utilizada, por exemplo, em uma pesquisa que transplantou ostras dessa espécie em estuários contaminados, e os resultados obtidos indicaram alterações nas respostas de múltiplos biomarcadores (Ferreira et al., 2019).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos a partir de biomarcadores bioquímicos em ostras da espécie *Crassostrea gasar* expostas a fração acomodada em água do óleo que chegou ao litoral brasileiro em 2019.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Toxicologia

A toxicologia é um campo da ciência voltado para o estudo das substâncias tóxicas cuja história remonta a séculos atrás, com os primeiros registros de interesse humano em entender as propriedades tóxicas das plantas, minerais e outros materiais (Perpétuo et al., 2019). Podemos citar como exemplo os experimentos realizados por Mitrídates IV (120-63 a.C.), um governante do antigo reino de Ponto, na Anatólia (atual Turquia), que por medo de ser assassinado tinha o hábito de ingerir diariamente e administrar em seus escravos quantidades crescentes de venenos e antídotos, buscando assim, desenvolver uma tolerância (CHASIN and Pedrozo, 2003).

Por volta do século XVI, a toxicologia começou a ter um aprofundamento em seus conceitos, pois o médico e alquimista suíço Paracelsus (1493-1541) desenvolveu através de experimentações a teoria central de que qualquer substância pode ser tóxica dependendo da dose a que os indivíduos fossem expostos (Beasley and Levengood, 2012). Desde então, os estudos toxicológicos evoluíram bastante à medida que os avanços na química, biologia e medicina aconteciam, proporcionando desta forma uma compreensão mais profunda dos mecanismos pelos quais os agentes tóxicos afetam os organismos vivos.

2.2 Ecotoxicologia

Segundo Hoffman et al. (2002), René Truhaut, em 1969, foi o responsável por cunhar o termo “ecotoxicologia” e também por defini-lo como sendo o ramo derivado da toxicologia que estuda os efeitos deletérios causados por poluentes de origem natural ou artificial sobre organismos que constituem o ecossistema.

Com a ascensão da industrialização como paradigma de desenvolvimento, o século XIX foi caracterizado principalmente pelo surgimento de um novo cenário urbano, impulsionado pelo grande fluxo migratório das áreas rurais para as zonas urbanas. No entanto, o avanço industrial não se deu isento de consequências adversas, uma vez que a busca pela maximização da produção exigia o uso extensivo de compostos químicos, compostos estes que, se não fossem bem descartados e tratados, representavam um potencial impacto negativo para toda a biota.

Um exemplo emblemático das consequências devastadoras do descarte indevido de compostos químicos é o trágico episódio da Baía de Minamata, no Japão, em 1956. O efluente despejado na Baía continha mercúrio, o qual servia como catalizador na fabricação de acetaldeído da indústria Chisso, e como resultado, a comunidade local foi exposta a altos níveis de metilmercúrio, causando uma série de doenças neurológicas graves, conhecidas como “doença de Minamata” (Ekino et al., 2007).

Atualmente, a ecotoxicologia visa estimar os efeitos deletérios causados pelos contaminantes nos organismos vivos. As respostas biológicas desencadeadas pela exposição de um organismo a um contaminante frequentemente obedecem a uma sequência hierárquica (Figura 1), que se inicia com modificações bioquímicas e desdobrando-se em alterações fisiológicas. Estas últimas, por sua vez, acarretam impactos no desempenho ecológico dos indivíduos, afetando aspectos da dinâmica populacional, e potencialmente afetando níveis superiores de comunidades e ecossistemas.

Em nível bioquímico, a avaliação da toxicidade causada por um poluente em um organismo pode incluir a análise de alterações na atividade enzimática de biomarcadores de estresse oxidativo, como a catalase, uma enzima do sistema de defesa antioxidante. No nível fisiológico, podem ser monitoradas medidas como a taxa de filtração. Já em organismos individuais, alterações comportamentais podem ser observadas, resultando em impactos na comunidade, como a diminuição da taxa de reprodução. Esses efeitos podem, em última instância, repercutir no nível do ecossistema, modificando, por exemplo, a riqueza de espécies e a estrutura do ambiente.

Figura 1: Hierarquia biológica das possíveis medidas de toxicidade dos contaminantes e suas características



Fonte: (ALVES, 2017)

Portanto, para o devido estabelecimento de regulamentações ambientais eficazes, é necessário que haja uma boa compreensão dos efeitos adversos dos contaminantes ambientais sobre os organismos, e para isso, torna-se necessário a utilização de organismos testes sensíveis para medir a toxicidade de um determinado contaminante após exposição a diferentes doses ou concentrações do mesmo.

A relação dose-resposta ou concentração-resposta baseia-se na exposição controlada de um organismo sensível a um contaminante disposto em diferentes doses ou concentrações no meio de exposição, com o intuito de determinar o limiar a partir do qual os efeitos adversos, tanto letais quanto subletais, começam a ser verificados. Esta verificação é baseada nos métodos de quantificação da toxicidade sendo utilizados, e deve ser baseada numa avaliação estatística comparativa entre os indivíduos expostos ao contaminante e indivíduos controle.

O ambiente aquático é um dos ecossistemas mais vitais para a sustentação da vida na Terra, desempenhando papéis essenciais na regulação do clima, na manutenção

da biodiversidade e no fornecimento de recursos essenciais para humanos e outras formas de vida. No entanto, é também o mais suscetível à influência negativa das atividades humanas, conforme ressaltado por McLachlan and Defeo (2017). A poluição resultante dessas atividades, incluindo substâncias químicas tóxicas e resíduos, inevitavelmente encontra seu caminho para os corpos d'água, seja por meio do escoamento superficial de áreas urbanas e agrícolas ou pela lixiviação de contaminantes do solo.

Além disso, os ecossistemas aquáticos são especialmente delicados devido à sua cadeia alimentar bem definida, que intensifica a probabilidade de bioacumulação (Di Giulio and Hinton, 2008). Como resultado, os principais predadores aquáticos tendem a acumular concentrações mais elevadas de substâncias tóxicas em seus tecidos, representando não apenas uma ameaça para sua própria saúde, mas também para os organismos que deles se alimentam.

Diante desse cenário, torna-se crucial promover estudos ecotoxicológicos direcionados ao ambiente aquático. Essas iniciativas são essenciais para avaliar os impactos da poluição, entender os mecanismos de bioacumulação e biomagnificação, bem como desenvolver estratégias eficazes de gestão e mitigação dos riscos ambientais associados à contaminação aquática.

2.3 Petróleo

O petróleo é uma substância natural formada ao longo de milhões de anos a partir da decomposição de matéria orgânica que se acumula no fundo de regiões oceânicas. Esse processo ocorre em condições específicas, no qual a matéria orgânica, sob camadas de sedimentos, é submetida a altas pressões e temperaturas, onde só através da perfuração das rochas é possível extraí-la, fazendo com que o óleo suba para a superfície. O petróleo bruto tem como principais componentes os hidrocarbonetos alifáticos, que chegam a atingir cerca de 90% de sua composição total, enquanto os outros 5 a 10% é composto pelos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Meador, 2003), onde 16 HPAs, por apresentarem características tóxicas, foram identificados como poluentes prioritários para monitoramento ambiental (Perrichon et al., 2016).

A relevância do petróleo em nossa sociedade é gigante, pois é considerado uma das substâncias mais significativas e influentes da era industrial e moderna, servindo como fonte de energia primária crucial para uma variedade de aplicações, que vão desde

combustíveis até materiais para a produção de plásticos e produtos químicos. Sua importância é tão grande que o desenvolvimento econômico de muitos países está intimamente ligado à sua produção, exportação e uso (Council et al., 2003). Entretanto, apesar de sua importância econômica, o petróleo também é uma das principais fontes de poluição ambiental, uma vez que a queima de combustíveis fósseis, como a gasolina e o diesel, contribui significativamente para as emissões de gases de efeito estufa, exacerbando as mudanças climáticas e seus efeitos associados, como o aumento das temperaturas globais, eventos climáticos extremos e elevação do nível do mar.

Além dos problemas atrelados com a queima, os derramamentos de petróleo representam uma ameaça ainda mais grave para os ecossistemas marinhos e costeiros, causando danos irreparáveis à vida selvagem e aos habitats naturais. Segundo estimativas, cerca de 3,2 milhões de toneladas de hidrocarbonetos derivados do petróleo chegam ao ambiente marinho a cada ano, sendo os derramamentos resultantes das operações regulares de navios-tanque e as descargas de resíduos urbanos os principais agentes poluidores responsáveis por essa contaminação (Levengood and Beasley, 2007).

2.4 Acidentes com Petróleo

Ao longo da história, inúmeros desastres relacionados ao derramamento de petróleo ocorreram em várias partes do mundo, deixando um impacto duradouro no ambiente marinho e na saúde humana. Dois exemplos emblemáticos desses eventos foram o derramamento de petróleo no Golfo Pérsico, em 1991, onde 1 milhão e 360 mil toneladas de petróleo foram derramadas, e o derrame de petróleo da plataforma marinha Deepwater Horizon, no qual aproximadamente 507 milhões de litros de petróleo bruto foram liberados no Golfo do México (Barron et al., 2020).

No Brasil, em agosto de 2019, o país foi impactado por um dos maiores derramamentos de petróleo de sua história (Reddy et al., 2022). Este desastre ambiental começou a ser percebido quando manchas de óleo começaram a aparecer em praias do nordeste brasileiro, se espalhando ao longo da costa e afetando centenas de quilômetros de litoral, principalmente em estados do nordeste.

Cerca de 5.379 toneladas de resíduos de óleo foram coletados das praias afetadas (Soares et al., 2022), onde grande parte desse óleo permaneceu submersa ou aderiu a rochas e recifes de corais, representando uma ameaça contínua ao ecossistema marinho, e a persistência desses resíduos de óleo nos ambientes marinhos é preocupante,

pois eles podem continuar a liberar compostos tóxicos e causar danos prolongados à vida marinha.

Os ecossistemas estuarinos são ambientes únicos e altamente produtivos encontrados na interface entre ambientes de água doce e água salgada, geralmente onde rios encontram o mar. Essas áreas costeiras apresentam uma mistura variada de condições físicas, químicas e biológicas, criando um ambiente dinâmico e diversificado. Uma das características distintivas deste ecossistema é a alta variação na salinidade da água, que resulta da mistura de água doce proveniente dos rios e água salgada do oceano (Thurman and TRUJILLO, 1996). Essa oscilação na salinidade cria gradientes ambientais únicos, proporcionando uma ampla gama de nichos ecológicos para uma diversidade impressionante de organismos adaptados a essas condições variáveis.

A diversidade biológica nos ecossistemas estuarinos é notável, com uma variedade de espécies adaptadas para sobreviver em condições desafiadoras. Peixes, aves, crustáceos, moluscos e uma infinidade de organismos microscópicos habitam essas águas, muitas vezes desempenhando papéis fundamentais na cadeia alimentar e nos ciclos biogeoquímicos. Esses ambientes funcionam como berçário, local de alimentação e de reprodução para muitas espécies marinhas, que aproveitam a grande disponibilidade de nutrientes presentes no ambiente (Barletta-Bergan et al., 2002).

Além de sua importância ecológica, os ecossistemas estuarinos também têm um valor econômico significativo. Eles sustentam pescarias comerciais importantes (NAHUM et al., 2006), oferecem oportunidades para turismo e recreação (Marchesini and da Cruz, 2013) e ainda desempenham um papel vital na proteção contra desastres naturais (Souza et al., 2023).

No entanto, os ecossistemas estuarinos estão sob crescente pressão devido as atividades antrópicas. Algumas das principais fontes de impacto incluem o despejo de esgoto das áreas urbanas, a emissão de produtos químicos orgânicos e inorgânicos pela indústria, a agricultura e o intenso tráfego de embarcações, atividade essa que pode resultar em vazamentos acidentais de petróleo e derivados, combustíveis e outros produtos transportados pelo mar (Kennish, 2019).

2.5 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos que apresentam múltiplos anéis aromáticos na sua composição. Esses compostos são formados durante processos de combustão incompleta de materiais orgânicos (Johnson et al., 2008), como a queima de carvão, óleo, gás e biomassa, bem como em processos naturais, como erupções vulcânicas e incêndios florestais.

Os HPAs podem ser encontrados em diversos compartimentos ambientais, como no solo, no ar e na água. Dentre os inúmeros HPAs conhecidos, dezesseis são considerados prioritários devido à sua onipresença em ambientes contaminados e à sua toxicidade conhecida (Altenburger et al., 2003). Esses compostos são frequentemente monitorados em estudos de áreas contaminadas como indicadores de contaminação por petróleo e outros derivados. Entre os dezesseis, seis são reconhecidos como carcinogênicos para humanos e outros organismos, como o benzo(a)pireno, enquanto os outros dez restantes têm sido objeto de estudos devido ao seu potencial tóxico, especialmente para animais aquáticos (Payne et al., 2003).

Inicialmente, o petróleo derramado pode causar a morte de organismos com poucas horas de contato direto com sua forma bruta (Alford et al., 2014), mas quando uma parte do óleo se mistura à água, a absorção pelos organismos é facilitada, principalmente com o passar do tempo. Essa exposição contínua é particularmente preocupante por conta da presença dos HPAs, compostos que têm efeitos adversos na saúde dos organismos marinhos e que podem causar danos nos tecidos, órgãos e sistemas fisiológicos dos animais, levando à morte ou a efeitos subletais. Sem contar que os efeitos do derramamento de petróleo podem persistir por anos ou décadas após o incidente inicial, e a recuperação dos ecossistemas afetados pode ser lenta e incompleta, especialmente em áreas sensíveis e habitats críticos.

2.6 Ostras e a espécie *Crassostrea gasar* como organismo modelo para estudos ecotoxicológicos

As ostras são moluscos bivalves comumente encontrados em ambientes marinhos e estuarinos ao redor do mundo. Esses animais são chamados de bivalves por terem seus corpos formados por duas valvas, conhecidas como conchas, que são compostas principalmente de carbonato de cálcio, e estão conectadas por articulações, formadas por ligamentos de elastina e proteína, secretadas pelo manto desses moluscos

(Wakamatsu, 1975). A forma e o tamanho das conchas do gênero *Crassostrea* podem variar entre as espécies, mas geralmente possuem uma estrutura moderadamente fina, dispendo de uma valva direita maior e côncava (Costa, 1975; Galtsoff, 1964) e um comprimento médio que varia entre $5,05 \pm 8,29$ cm (Christo and Absher, 2008).

Em termos de distribuição global, as ostras do gênero *Crassostrea* são encontradas em uma ampla gama de regiões, incluindo América do Norte, América do Sul, Europa, Ásia e Oceania (Steinwandter et al.). No Brasil, atualmente reconhece-se a ocorrência de duas espécies de ostras do gênero *Crassostrea* no litoral brasileiro: *Crassostrea rizophorae* e *Crassostrea gasar* (Ignacio et al., 2000; Varela et al., 2007), conhecidas respectivamente como ostra-do-mangue e ostra-de-fundo.

Além de seu papel ecológico, as ostras possuem uma importância econômica significativa. Sua carne é altamente valorizada como alimento por ser rica em minerais, vitaminas e proteínas, enquanto suas conchas são utilizadas na fabricação de uma variedade de produtos artesanais (Wakamatsu, 1975).

As ostras são consideradas excelentes organismos para serem utilizados em estudos ecotoxicológicos por diversas razões. Em primeiro lugar, sua eficiência como organismos filtradores é notável. Ao consumirem grandes volumes de água para se alimentar da matéria orgânica ali dissolvida, as ostras bioacumulam e conseqüentemente se expõem a contaminantes químicos presentes na água (Martins et al., 2022).

Essa capacidade de filtração torna as ostras sensíveis às mudanças na qualidade da água. Além disso, devido ao fato de viverem imersas no meio de exposição, os organismos aquáticos, como as ostras, são particularmente vulneráveis a exposições elevadas a contaminantes (Di Giulio and Hinton, 2008). Isso permite que as ostras acumulem substâncias em seus tecidos, como metais pesados, pesticidas e outros poluentes, tornando-as indicadores úteis da presença e concentração desses contaminantes no ambiente.

Outra vantagem das ostras é que elas são organismos sésseis, ou seja, crescem e se desenvolvem em um substrato fixo, facilitando o monitoramento e a comparação de dados sobre a qualidade da água em determinadas áreas (Rizzi and Machado, 2007).

Um exemplo de ostra com relevância econômica e ecológica é a espécie *C. gasar*, encontrada em ambientes estuarinos da costa pernambucana (Nascimento, 1991).

Entre as ostras nativas, *C. gasar* é uma das espécies mais cultivadas, devido ao seu tamanho e aos resultados nos cultivos em comparação com outras espécies, como *C. rhizophorae* (Guilding, 1828) (Christo and Absher, 2006). Dadas suas características, *C. gasar* é uma espécie excelente para avaliar a bioacumulação e a toxicidade causada por HPAs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos), através da quantificação de biomarcadores bioquímicos em estudos de avaliação e monitoramento de regiões estuarinas.

2.7 Biomarcadores bioquímicos de contaminação ambiental

Os biomarcadores são indicadores biológicos que através de medidas específicas refletem os efeitos decorrentes da exposição a substâncias poluentes (Amorim, 2003). Estes efeitos podem ser percebidos em vários níveis, indo desde bioquímicos até a comportamentais, e são medidos através da análise de amostras do organismo que foi exposto a esses poluentes químicos (Sarkar et al., 2006).

Esses biomarcadores podem ser caracterizados pelo emprego de mecanismos de defesa contra contaminantes, como a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) (que auxilia no processo de excreção de contaminantes do organismo), variações nos níveis de peroxidação lipídica (LPO), inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), entre outros. O uso de biomarcadores em estudos ecotoxicológicos é excelente, pois auxilia bastante na determinação de programas de monitoramento ambiental (CARVALHO-NETA, 2010). Assim, os biomarcadores emergem como instrumentos valiosos no processo de avaliação de riscos, abrangendo desde a identificação e classificação dos perigos até a caracterização dos efeitos.

2.7.1 Biomarcadores de neurotoxicidade

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor essencial no sistema nervoso central e periférico, desempenhando papéis vitais na transmissão de sinais entre os neurônios e nas respostas musculares. A enzima responsável pela hidrólise da ACh em acetato e colina é a acetilcolinesterase (AChE), inativando o neurotransmissor. A atividade dessa enzima determina o fim de respostas sinápticas do receptor muscarínico e nicotínico (Picciotto et al., 2012).

A presença da AChE impede a sobreestimulação dos receptores colinérgicos pós-sinápticos, garantindo que a resposta neural ou muscular seja breve e precisa. A análise

da atividade da AChE já é utilizada em programas de monitorização ambiental (Burgeot et al., 1996), pois a inibição da sua atividade é um indicador da exposição do organismo a contaminantes, como, por exemplo, HPAs, organofosforados e carbamatos.

2.7.2 Biomarcadores de estresse oxidativo

Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) são moléculas que naturalmente estão presentes no organismo e que surgem pelos processos de oxidação dos alimentos e produção de energia (Di Giulio and Hinton, 2008). A presença dessas moléculas em concentrações adequadas é importante pois auxilia o organismo a manter o equilíbrio metabólico, entretanto, pode haver um aumento na concentração de EROs estimulada pela exposição a algum poluente, gerando uma situação de estresse oxidativo. O aumento no surgimento desses radicais livres pode estar ligado a ação de enzimas peroxidases, que catalisam reações de oxidação-redução, e da ação de certas enzimas da família CYP450, responsáveis por catalisar a oxidação de várias moléculas (ALVES, 2020). Um organismo afetado pelo estresse oxidativo apresentará alterações nos seus biomarcadores ecotoxicológicos, que podem ser classificados como biomarcadores de dano ou defesa (Amiard-Triquet et al., 2012).

Biomarcadores de defesa são aqueles que agem na função de defender o organismo daquele contaminante ao proteger as moléculas da ação das EROs, que como dito anteriormente, ocasiona danos nas células do organismo afetado (Valavanidis et al., 2006). Portanto, a análise de biomarcadores pertencentes ao sistema de defesa antioxidante, como a ação das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), é fundamental.

2.7.2.1 Defesa antioxidante externa

O sistema de defesas antioxidantes de origem exógena é constituído basicamente por substâncias de baixo peso molecular, como as vitaminas C e E, por minerais, como o selênio e o zinco, e por compostos fenólicos com potencial significativo de ação antioxidante (Barbosa et al., 2010). Todos esses elementos não enzimáticos presentes nos fluidos biológicos agem contra os danos oxidativos resultantes da formação de radicais livres, protegendo o organismo do estresse oxidativo.

2.7.2.2 *Defesa antioxidante interna*

As defesas antioxidantes de origem endógena são constituídas por enzimas e proteínas de alto peso molecular que tentam reduzir os efeitos oxidantes causados pela presença de EROs (ALVES, 2020). Um exemplo é a proteína enzimática antioxidante Superóxido Dismutase (SOD), que tem a função de inibir a ação de EROs ao doar um elétron para esses radicais livres instáveis, contribuindo para a reparação das moléculas afetadas (Lushchak, 2011). A enzima SOD é responsável por catalisar a conversão do radical superóxido, que possui alta reatividade e potencial de danificar moléculas essenciais, como proteínas e lipídios, em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Lushchak et al., 2001). Embora o peróxido de hidrogênio também seja tóxico, ele é bem menos reativo que o radical superóxido e que também pode ser decomposto posteriormente pela ação de outras enzimas de defesa antioxidante, como a CAT e a GPx. A enzima antioxidante CAT possui a função de catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, evitando a formação de radicais livres mais perigosos e reativos, como o radical hidroxila, prevenindo danos celulares (ALVES, 2020). Sua presença ocorre principalmente na organela celular peroxissomo, a qual é responsável por várias reações metabólicas que acabam gerando o peróxido de hidrogênio como subproduto (Di Giulio and Hinton, 2008), tornando a catalase importantíssima para a eliminação eficiente do mesmo.

2.7.2.3 *Indicador de dano oxidativo*

A peroxidação lipídica (LPO) é um processo onde os lipídios presentes nas membranas celulares, em especial os ácidos graxos poli-insaturados, são oxidados por radicais livres, como o radical superóxido ou o radical hidroxila, causando diversos problemas às células (Barbosa et al., 2010). Esse processo é considerado um importante indicador de dano oxidativo por gerar vários subprodutos tóxicos que podem ser utilizados como biomarcadores de dano oxidativo, sendo um deles o malondialdeído (MDA), que indica a extensão do dano causado aos lipídios da membrana (Lima and Abdalla, 2001). A concentração de MDA pode ser medida através do método TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), que consiste em um ensaio que, por formar um produto colorido pela reação do MDA com o TBA, possibilita quantificação através da leitura num espectrofotômetro.

2.7.3 Biomarcadores de biotransformação

A metabolização de agentes poluentes segue um processo trifásico, onde as fases iniciais têm como objetivo primário tornar os xenobióticos solúveis e reduzir sua toxicidade, biotransformando eles para facilitar a excreção, enquanto a última fase se encarrega da eliminação dessas substâncias do organismo afetado (Van der Oost et al., 2000).

2.7.3.1 Biotransformação de fase I

A proteína CYP1A é induzida pela exposição a moléculas poluentes, como os HPAs, e essa exposição faz com que o xenobiótico ao qual o organismo foi exposto se ligue a um complexo proteico, que por sua vez, se liga ao DNA. A proteína resultante, CYP1A, pode ter sua atividade catalítica analisada por conta da conversão do substrato 7-etoxirresorufina (7-ER) em resorufina hidroxilada (Whyte et al., 2000).

As enzimas do complexo do citocromo P450, especialmente a enzima etoxiresorufina-o-deetilase (EROD), tem a função de catalisar reações de oxidação de xenobióticos (Huber et al., 2008), sendo caracterizado como um marcador enzimático da atividade da proteína CYP1A após tratamento com 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (DeVito, 1996).

2.7.3.2 Biotransformação de fase II

A enzima de biotransformação glutationa S-transferase (GST) age na facilitação do processo de excreção, atuando como uma importante mediadora na desintoxicação do organismo. Seu mecanismo envolve a conjugação da glutationa reduzida (GSH) com compostos eletrofílicos, não permitindo que outras moléculas se liguem aos xenobióticos, proporcionando assim uma proteção vital contra agentes tóxicos (ALVES, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente trabalho visa avaliar efeitos ecotoxicológicos em ostras *Crassostrea gasar*, causados pela exposição a HPAs presentes na fração acomodada em água do óleo que atingiu a costa pernambucana.

3.1.1 Objetivos específicos

- Preparar a FAA do óleo e caracterizar os HPAs presentes;
- Expor as ostras *C. gasar* a diluições de 5% e 12,5% da FAA por 96 h;
- Analisar os biomarcadores bioquímicos em brânquias e glândula digestiva após a exposição

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das ostras *C. gasar*

As ostras da espécie *C. gasar* utilizadas neste estudo foram obtidas através da empresa “Ostramar”, especializada em ostreicultura, e posteriormente foram transportadas até o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Universidade Federal de Pernambuco (LABECOTOX/UFPE).

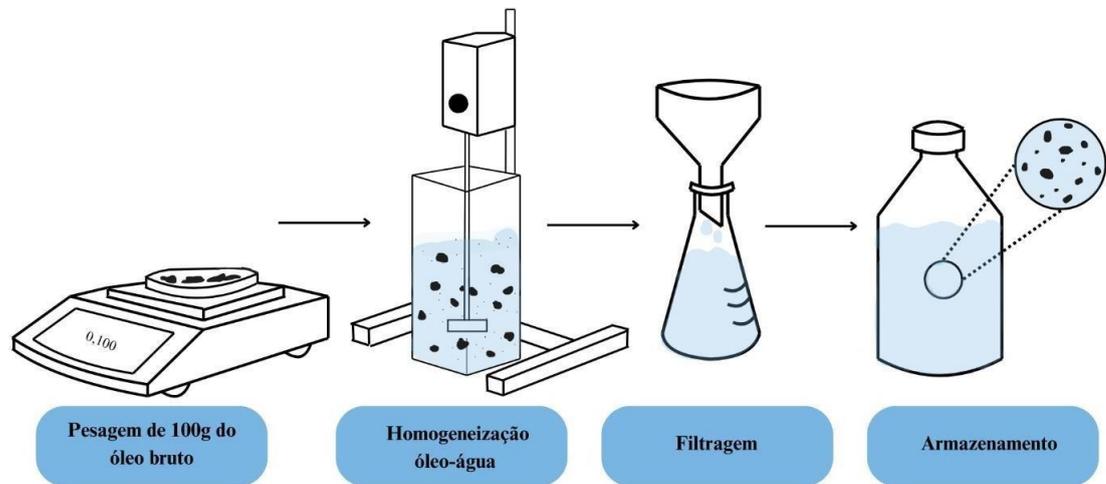
No laboratório, as ostras foram imediatamente alocadas em aquários de vidro com capacidade de 15 L para o início da exposição nas seguintes condições: salinidade inicial de 25 unidade de salinidade prática (PSU), temperatura de 28° C, pH 7,88 ± 0,2.

4.2 Preparação da fração acomodada do óleo em água e caracterização da concentração de HPAs.

A preparação da fração acomodada em água (FAA) do óleo coletado na Praia do Paiva foi baseada em Singer et al. (2000).

A FAA foi obtida a partir da mistura na proporção de 1:100 (massa/volume), sendo assim, 1 g de óleo para 100 mL de água salobra 25 PSU, com os seguintes parâmetros físico-químicos: pH 7,8 ± 0,2, oxigênio dissolvido 7,0 ± 0,5 mg L⁻¹, e temperatura 27 ± 1°C, seguida de agitação lenta em frasco de vidro com haste inoxidável com pá giratória por 24 horas. Após o período de agitação, o volume total foi filtrado em filtro de 2 µm de abertura e armazenado em garrafas âmbar numa temperatura de 4°C (Figura 2).

Figura 2: Esquema ilustrativo das etapas da preparação da FAA.



FONTE: Autora, 2024

Para a quantificação dos HPAs foi realizado um procedimento de extração líquido-líquido dos HPAs, onde foi separado numa garrafa âmbar com 1 L da FAA bruta e foi adicionado o padrão interno (PI), com HPA deuterados, e 20 mL de n-hexano. Após a obtenção do extrato, este foi concentrado utilizando um rotaevaporador e subsequentemente submetido a uma coluna contendo sílica (3,2 g) e alumina (1,8 g) para purificação. Por fim, o extrato purificado foi injetado no cromatógrafo a gás (modelo 7820A, Agilent Technologies) para conclusão do processo e obtenção dos dados de composição e concentração dos HPAs segundo metodologia descrita em Mariz Jr et al. (2024).

4.3 Desenho experimental da exposição

A FAA preparada para o experimento foi inicialmente diluída nas concentrações de 10% e 25% de FAA em aquários de vidro de 15 L contendo água salobra entre 25 e 27 PSU e com aeração constante. A princípio, para cada concentração foram utilizados 3 aquários com 5 ostras por aquário (3 L/ostra), totalizando 9 aquários e 45 ostras (Figura 3).

Figura 3: Sala de exposição dos aquários.



FONTE: Autora, 2024.

As ostras foram expostas por um período de 24h às concentrações de 10% e 25%, entretanto, por conta de problemas envolvendo um elevado nível de amônia na água neste intervalo de 24h, foi necessário aumentar o volume de água disponível para cada ostra. O número de aquários de exposição aumentou para 18, permitindo que cada ostra fosse mantida em 6 L de água, minimizando o acúmulo de amônia. Esse aumento do volume de água (duplicado) também ocasionou uma maior diluição da FAA, que passou de 10% e 25% inicialmente para 5% e 12,5%, respectivamente. As ostras foram mantidas nestas novas concentrações até o fim do experimento, totalizando 96h de exposição. Vale ressaltar que a renovação total da água dos aquários com suas respectivas concentrações da FAA ocorreu após 48h de exposição.

4.4 Processamento das amostras

Após o período de 96h exposição, as ostras foram medidas em comprimento e largura e tiveram suas brânquias e glândula digestiva dissecadas. Foi utilizada uma quantidade de amostra que variava entre 0,1000 e 0,1200g para homogeneização em solução tampão fosfato de sódio e de potássio (PBS) pH 7,4, em uma proporção de 1:5

(m/v). Em seguida a amostra homogeneizada foi centrifugada por 30 minutos a 9000 RCF (força centrífuga relativa) e 4 °C em centrífuga refrigerada. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante de cada amostra para serem armazenadas no ultrafreezer a -80°C para posterior análises da cinética enzimática.

Figura 4: Esquema ilustrativo do processamento das amostras de tecido de *C. gasar*.



FONTE: Autora, 2024.

4.5 Biomarcadores bioquímicos após 96 horas de exposição

4.5.1 Biotransformação de fase II glutathiona S-Transferase (GST)

Para o teste da atividade enzimática da GST, foi preparado o Mix da GST e o substrato iniciador (SI) cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Utilizou-se uma placa Greiner translúcida de 96 poços vazia, onde foi realizada uma leitura no espectrofluorímetro a 340 nm, com o objetivo de verificar a homogeneidade da absorbância nos poços. Em seguida, o teste foi iniciado com a adição de 5 µL da alíquota do sobrenadante do tecido homogeneizado das ostras, 35 µL de água ultrapura e 200 µL do Mix da GST à placa. A leitura basal foi realizada em 340 nm por 3 minutos, e então 10 µL do substrato iniciador (CDNB) foi rapidamente acrescentado.

4.5.2 Defesas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD)

Foi preparada uma solução de pirogalol, constituída por uma solução de 0,05 M de ácido clorídrico (HCl), diluindo 6 mM de pirogalol. Também foi separado o tampão de ensaio Tris HCl, composto por 0,05 M de tris-HCl e 0,01 M de EDTA. Para o início do teste, foi utilizada uma placa translúcida Greiner de 96 poços, onde foram adicionados, com auxílio de uma pipeta, 50 µL da alíquota do sobrenadante do tecido homogeneizado das ostras, 55 µL de água ultrapura e, por último, 140 µL do tampão de

ensaio. A leitura basal foi realizada no espectrofluorímetro a 420 nm por 3 minutos. Após isso, foram pipetados 35 μL da solução de pirogalol em cada poço, e a leitura foi refeita.

4.5.3 **Catalase (CAT)**

Primeiro, foi preparada a mistura de reação para CAT, composta por 25 mL de Fosfato de Potássio (KPi) 0,05 M com pH 7,4, juntamente com 0,150 mL de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), em um frasco âmbar. O teste teve início com a leitura dos poços vazios de uma placa UV Greiner de 96 poços no espectrofluorímetro a 240 nm por 5 minutos, com o objetivo de verificar a absorbância dos poços. Após essa verificação, foram pipetados 5 μL da alíquota do sobrenadante do tecido homogeneizado das ostras em cada poço da placa. Com a placa já posicionada na bandeja do espectrofluorímetro, 250 μL do Mix para a reação de CAT foi adicionado, e a leitura foi feita imediatamente.

4.5.4 **Peroxidação lipídica pelo método do malondialdeído (TBARs)**

O teste de peroxidação lipídica (LPO) forma um conjugado passível de leitura por espectrofotometria que indica os danos oxidativos causados pela conjugação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O ensaio teve início com uma leitura basal realizada no espectrofluorímetro, utilizando microplacas pretas de 96 poços, contendo 160 μL de tampão fosfato de sódio e potássio (PBS), 10 μL de hidroxitolueno butilado (BHT) dissolvido em etanol 99%, 20 μL da alíquota do sobrenadante do tecido homogeneizado das ostras e 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Após essa primeira leitura, foram adicionados 75 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,3%, e a placa foi levada à estufa a 60°C por 1 hora. Por fim, a leitura foi refeita no espectrofluorímetro. A excitação utilizada em ambas as leituras foi de 535 nm, com emissão em 590 nm, e os valores de fluorescência obtidos foram aplicados à curva de concentração de MDA ($R^2 > 0,99$).

4.5.5 **Acetilcolinesterase (AChE)**

Foi separado o tampão de homogeneização KPi 0,01 M com pH 7,4, juntamente com a solução substrato iniciadora DTNB e a solução de iodeto de acetilcolina. Utilizou-se uma placa Greiner translúcida de 96 poços e o teste começou com a adição de 50 μL da alíquota do sobrenadante do tecido homogeneizado das ostras, 200 μL da solução de DTNB. A leitura basal foi realizada no espectrofluorímetro a 415 nm por 2 minutos.

Após a finalização dessa leitura, foram rapidamente pipetados 50 μL da solução de iodeto de acetilcolina em cada poço, para medir a absorbância da atividade da enzima AChE.

4.6 Análise estatística

Todos os parâmetros analisados quanto a normalidade e homocedasticidade dos dados foram avaliados por ANOVA de um fator. Para os dados que não apresentaram os pré-requisitos da ANOVA, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis não paramétrico. Os testes a posteriori de Dunnet (ANOVA) e Dunn (Kruskal-Wallis) foram utilizados para comparação entre os tratamentos expostos a FAA e o grupo controle.

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação de HPAs na amostra de FAA

A concentração de HPAs totais incluindo moléculas parentais e alquiladas (ΣHPAt) presentes na FAA bruta foi igual a 170 ng- $\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$. Dentro dessa composição complexa, observou-se que o criseno se destacou como o HPA parental mais abundante, apresentando uma concentração de 18,9 ng L^{-1} . Os HPAs alquilados Fluorantenos + Pirenos e Benzo[a]antracenos + Crisenos também apresentaram as maiores concentrações, atingindo 25 ng L^{-1} (Tabela 1). As diluições utilizadas na exposição das ostras de 5% e 12,5% de FAA correspondem a concentrações de uma soma de HPAs totais (ΣHPAt) igual a 8,5 e 21,8 ng- $\Sigma\text{PAHt L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 1 - Concentração Total de HPAs extraídos da solução bruta (100%) da FAA preparada com amostras coletadas de óleo no litoral de Pernambuco

Analito de Interesse	Concentração em ng L ⁻¹
Naftaleno	2,78
1-Metilnaftaleno	<LQ
2-Metilnaftaleno	<LQ
C1 Naftalenos	<LQ
C2 Naftalenos	ND
C3 Naftalenos	ND
C4 Naftalenos	ND
Acenaftileno	ND
Acenafteno	ND
Fluoreno	<LQ
C1 Fluorenos	ND
C2 Fluorenos	ND
C3 Fluorenos	ND
Fenantreno	ND
Antraceno	ND
C1 Fenantrenos + Antracenos	ND
C2 Fenantrenos + Antracenos	ND
C3 Fenantrenos + Antracenos	3,08
C4 Fenantrenos + Antracenos	6,2
Fluoranteno	ND
Pireno	3,9
C1 Fluorantenos + Pirenos	16,2
C2 Fluorantenos + Pirenos	25,3
C3 Fluorantenos + Pirenos	23,3
Benzo[a]antraceno	ND
Criseno	18,9
C1 Benzo[a]antracenos + Crisenos	18,7
C2 Benzo[a]antracenos + Crisenos	25,5
C3 Benzo[a]antracenos + Crisenos	24,3
Benzo[b]fluoranteno	ND
Benzo[k]fluoranteno	ND
Benzo[a]pireno	ND
Dibenzo[a,h]antraceno	ND
Indeno[1,2,3-cd]pireno	ND
Benzo[ghi]perileno	1,51
Somatório	170

5.2 Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo e de neurotoxicidade

5.2.1 Peroxidação Lipídica (TBARs)

A concentração de MDA na brânquia apresentou redução estatística significativa nos organismos expostos aos tratamentos de 5% e 12,5%, quando comparados aos indivíduos do tratamento controle (Figura 5). Em contraponto, as amostras de glândula

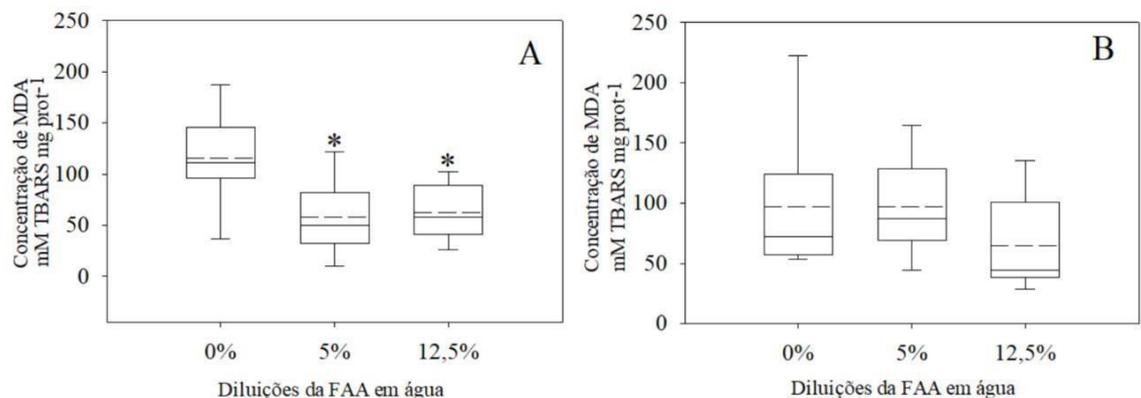
digestiva não apresentaram alteração na concentração de MDA nos organismos expostos quando comparados aos organismos do tratamento controle (Figura 5).

Figura 5: Concentração de malondialdeído (MDA) presente na brânquia e na glândula digestiva de ostras *Crassostrea gasar* após 96h de exposição a concentrações crescentes da fração acomodada do óleo coletado no litoral de Pernambuco.

A: Concentração de MDA presente na brânquia das ostras (ANOVA, $F = 8,065$, $p \leq 0,002$, seguido de Dunnet $p < 0,05$);

B: Concentração de MDA presente na glândula digestiva das ostras (Kruskal–Wallis, $p > 0,05$);

(*) Diferença significativa estatisticamente em comparação com o controle. A linha horizontal tracejada do box plot representa os valores médios obtidos, enquanto a linha horizontal contínua do box plot representa a mediana.



5.2.2 Catalase (CAT)

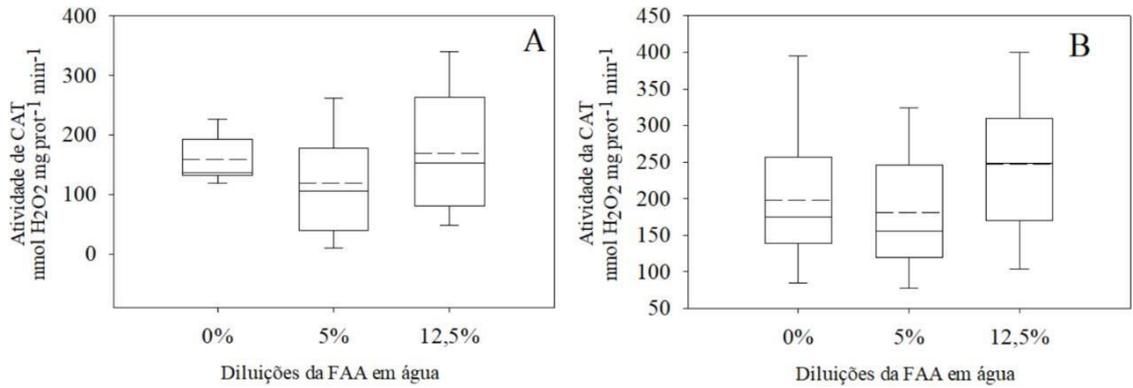
A atividade da CAT na brânquia (Figura 6) e na glândula digestiva (Figura 6) não foi estatisticamente diferente para as ostras expostas aos tratamentos com 5% e 12,5% de FAA, em relação ao controle em nenhuma das matrizes avaliadas neste estudo.

Figura 6: Atividade da catalase (CAT) na brânquia e na glândula digestiva de ostras *Crassostrea gasar* após 96h de exposição a concentrações crescentes da fração acomodada do óleo coletado no litoral de Pernambuco.

A: Atividade da CAT na brânquia das ostras (Kruskal–Wallis, $p > 0,05$);

B: Atividade da CAT na glândula digestiva das ostras (ANOVA, $p > 0,05$);

(*) Diferença significativa estatisticamente em comparação com o controle. A linha horizontal tracejada do box plot representa os valores médios obtidos, enquanto a linha horizontal contínua do box plot representa a mediana.



5.2.3 Glutathione-S-transferase (GST)

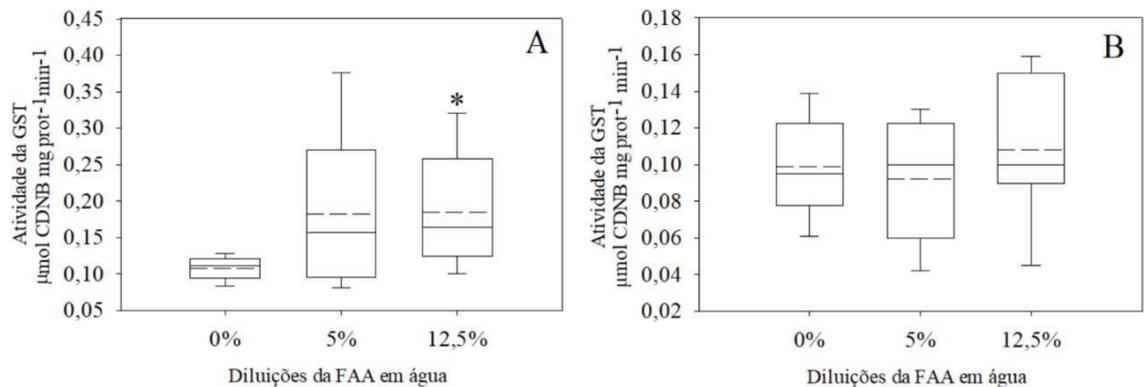
Na brânquia foi encontrada um aumento estatístico na atividade da GST para os organismos expostos ao tratamento de exposição com 12,5% de FAA (Figura 7). As amostras de glândula digestiva não apresentaram alteração na atividade da GST nos organismos expostos quando comparados aos organismos do tratamento controle (Figura 7).

Figura 7: Atividade da Glutathione-S-Transferase na brânquia e na glândula digestiva de ostras *Crassostrea gasar* após 96h de exposição a concentrações crescentes da fração acomodada do óleo coletado no litoral de Pernambuco.

A: Atividade da GST na brânquia das ostras (Kruskal–Wallis, $H = 7,211$, $p \leq 0,027$, seguido de Dunn $p < 0,05$);

B: Atividade da GST na glândula digestiva das ostras (ANOVA, $p > 0,050$);

(*) Diferença significativa estatisticamente em comparação com o controle. A linha horizontal tracejada do box plot representa os valores médios obtidos, enquanto a linha horizontal contínua do box plot representa a mediana.



5.2.4 Superóxido Dismutase (SOD)

Nas amostras de brânquia foi verificada uma redução estatística nos organismos do tratamento de exposição com 12,5% de FAA (Figura 8). Enquanto nas amostras de

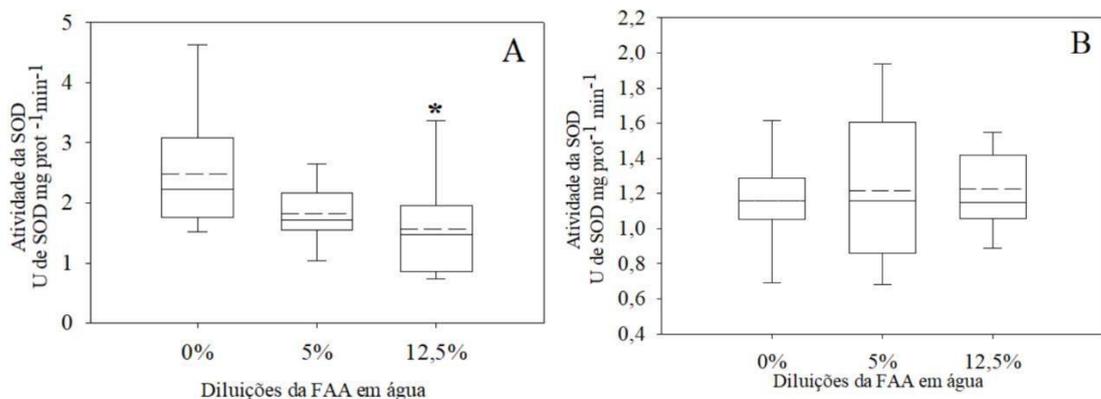
glândula digestiva não houve alteração na atividade da SOD nos organismos expostos quando comparados aos organismos do tratamento controle (Figura 8).

Figura 8: Atividade da Superóxido dismutase (SOD) na brânquia e na glândula digestiva de ostras *Crassostrea gasar* após 96h de exposição a concentrações crescentes da fração do óleo coletado no litoral de Pernambuco.

A: Atividade da SOD na brânquia das ostras (Kruskal–Wallis, $H = 6,805$, $p \leq 0,033$, seguido de Dunnett $p < 0,05$);

B: Atividade da SOD na glândula digestiva das ostras (ANOVA, $p > 0,05$);

(*) Diferença significativa estatisticamente em comparação com o controle. A linha horizontal tracejada do box plot representa os valores médios obtidos, enquanto a linha horizontal contínua do box plot representa a mediana.



5.2.5 Acetilcolinesterase (AChE)

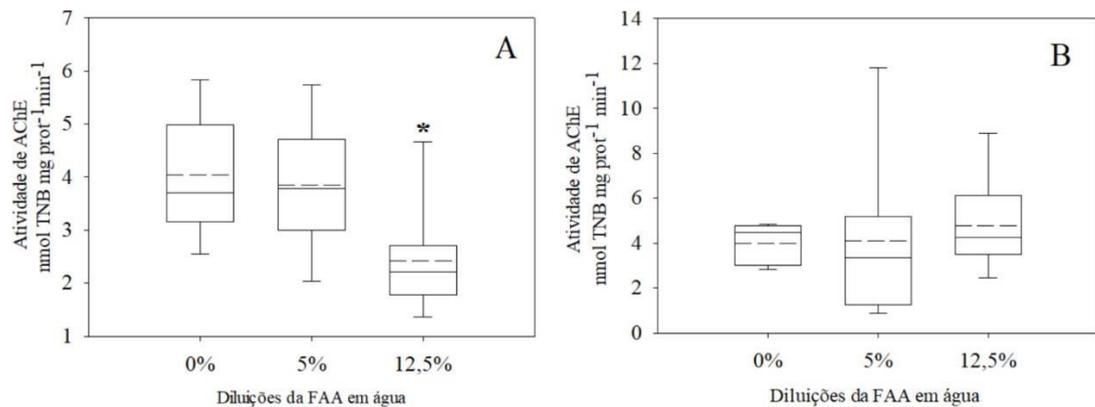
A atividade enzimática da AChE apresentou uma redução nas amostras de brânquia das ostras expostas ao tratamento com 12,5% de FAA (Figura 9). Não foi encontrada alteração na atividade da AChE nas amostras de glândula digestiva organismos expostos quando comparados aos organismos do tratamento controle (Figura 9).

Figura 9: Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) na brânquia e na glândula digestiva de ostras *Crassostrea gasar* após 96h de exposição a concentrações crescentes da fração acomodada do do óleo coletado no litoral de Pernambuco.

A: Atividade da AChE na brânquia das ostras (ANOVA, $F = 6,473$, $p \leq 0,05$, seguido de Dunnett $p < 0,05$);

B: Atividade da AChE na glândula digestiva das ostras (Kruskal–Wallis, $p > 0,05$);

(*) Diferença significativa estatisticamente em comparação com o controle. A linha horizontal tracejada do box plot representa os valores médios obtidos, enquanto a linha horizontal contínua do box plot representa a mediana.



6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado que na brânquia das ostras expostas à FAA, comparadas às ostras controle, houve uma queda na concentração de MDA, sugerindo que enzimas do sistema de defesa antioxidante podem estar desempenhando esse papel de proteção do organismo, e diminuindo o nível de peroxidação para valores inferiores aos controles. Por outro lado, não foi verificada alteração no tecido da glândula digestiva das ostras expostas em relação aos controles.

Quando os organismos são expostos a contaminantes ambientais, durante o processo de biotransformação dos mesmos, moléculas de ERO podem ser formadas, moléculas essas que em excesso são instáveis e comprometem a integridade das células ao roubar elétrons de outras moléculas. Para inibir a ação das ERO, geralmente os bivalves tendem a apresentar um aumento da atividade das enzimas antioxidantes, o que caracteriza um estado de estresse oxidativo (Van der Oost et al., 2003; Zanette et al., 2011). O excesso de moléculas de ERO promove a peroxidação lipídica, resultando na formação de MDA, um produto final deste processo. O MDA é considerado um marcador de dano oxidativo, e sua alta concentração no organismo indica que o mesmo está em uma condição de estresse oxidativo (Del Rio et al., 2005).

Neste estudo, a atividade da SOD no tecido da brânquia diminuiu nas ostras expostas à concentração de 12,5% de FAA, com uma tendência de diminuição na diluição 5%, enquanto na glândula digestiva nenhuma alteração foi observada. Num outro estudo envolvendo exposição de *C. brasiliensis* a FAA de óleo diesel foi também verificada inibição da SOD em ostras expostas a maior diluição de 20% da FAA por 96 horas (Lüchmann et al., 2011). A exposição de ostras *C. gasar* a 10 µg criseno L⁻¹ em laboratório também causou a inibição da SOD no tecido branquial, a inibição da

atividade da SOD pode resultar de níveis elevados de ERO nas células, sugerindo um aumento na produção de ânion superóxido no tecido branquial (Bastolla et al., 2023). Neste presente estudo, a concentração de crisenone parental na FAA do óleo diluída a 12,5% foi igual a $2,36 \text{ ng L}^{-1}$, indicando uma inibição da SOD numa concentração significativamente inferior à concentração utilizada por Bastolla et al. (2023).

A atividade da GST auxilia na fase II do processo de biotransformação de xenobióticos para descontaminação do organismo (Sies, 1999), e sua atividade é tipicamente induzida após exposição a poluentes orgânicos (de Campos Guerreiro et al., 2024). Em da Silva et al. (2005), foi verificada indução da GST na glândula digestiva da ostra *C. rhizophorae* após a exposição ao óleo diesel nas concentrações de 0.01, 0.1, e 1 ml L^{-1} em diferentes salinidades. Neste estudo, as amostras de brânquia indicaram uma indução na atividade da GST na diluição com 12,5% de FAA, uma tendência de indução na diluição 5%, e ausência de alteração na glândula digestiva. Em Lüchmann et al. (2011), a exposição de *C. brasiliensis* a FAA de óleo diesel também indicou indução da GST, porém no tecido da glândula digestiva, e ausência de alteração no tecido branquial. Acredita-se também que o GST desempenhe uma atividade peroxidase, exercendo um papel antioxidante suplementar significativo na célula (Bebiano and Barreira, 2009), e também está envolvida no metabolismo de subprodutos do estresse oxidativo, como o derivado reativo da peroxidação lipídica 4-hidroxinonenal (Guerreiro et al., 2024). As brânquias são o primeiro órgão de contato com os contaminantes sendo absorvidos, estando envolvidas nos processos de biotransformação e no sistema de defesa antioxidante (Bastolla et al., 2023). A indução da GST no tecido branquial foi eficaz na prevenção de danos nas membranas lipídicas das ostras expostas, verificado pela redução na concentração de MDA no seu tecido branquial. Esta correlação negativa significativa entre a indução da GST e a redução da peroxidação lipídica também foi observada em *C. brasiliensis* após exposição ao diesel (Lüchmann et al., 2011), reforçando o papel antioxidante da GST.

A AChE é uma enzima muito importante associada a transmissão sináptica, e modificações na sua atividade caracterizam neurotoxicidade por exposição a contaminantes, que pode gerar consequências deletérias para os organismos aquáticos (Johann et al., 2020). A diminuição da atividade na brânquia pode ser explicada pela presença de HPAs de alto peso molecular na FAA, que possuem quatro ou mais anéis aromáticos, e que podem inativar a ação do neurotransmissor ACh, e conseqüentemente

inibir a ação da enzima (Kang and Fang, 1997). A atividade da AChE pode ser inibida principalmente por inseticidas organofosforados e carbamatos, mas recentemente foi constatado que esta enzima também pode ser inibida por outros contaminantes incluindo metais e HPAs (Fu et al., 2018). Neste estudo foi verificada uma inibição da AChE nas brânquias das ostras expostas a diluição com 12,5% da FAA, de forma semelhante ao verificado nas brânquias (Akcha et al., 2000) e na glândula digestiva (Banni et al., 2010) do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* exposto ao benzo(a)pireno.

7 CONCLUSÃO

A exposição de *C. gasar* a FAA do óleo coletado no litoral pernambucano induziu no tecido branquial dos indivíduos um aumento na atividade da GST em associação a uma diminuição da peroxidação lipídica, e uma diminuição da SOD e da AChE nas concentrações de HPAs testadas. A ausência de alterações bioquímicas na glândula digestiva pode estar associada a uma baixa taxa de bioacumulação de HPAs nas concentrações de exposição utilizadas. As respostas bioquímicas verificadas reforçam a importância da utilização de biomarcadores bioquímicos em ostras como modelos biológicos e organismos sentinelas para a avaliação dos efeitos de contaminantes e para o biomonitoramento de áreas propensas a contaminação por petróleo e seus derivados.

8 REFERÊNCIAS

Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo [a] pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 49, 269-287.

Alford, J.B., Peterson, M.S., Green, C.C., 2014. Impacts of oil spill disasters on marine habitats and fisheries in North America. CRC Press.

Altenburger, R., Segner, H., van der Oost, R., 2003. Biomarkers and PAHs—prospects for the assessment of exposure and effects in aquatic systems. PAHs: an ecotoxicological perspective, 297-328.

ALVES, M.K.d.M., 2020. Biomonitoramento da poluição em recifes de coral utilizando o peixe donzelinha *Stegastes fuscus* como organismo sentinela. Universidade Federal de Pernambuco.

ALVES, R.N., 2017. Análise de risco e ecotoxicologia dos efluentes de postos revendedores de combustíveis de Recife. Universidade Federal de Pernambuco.

Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Rainbow, P.S., 2012. Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects. CRC press.

Amorim, L.C.A., 2003. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. *Revista brasileira de epidemiologia* 6, 158-170.

Banni, M., Negri, A., Dagnino, A., Jebali, J., Ameer, S., Boussetta, H., 2010. Acute effects of benzo [a] pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology Environmental Safety* 73, 842-848.

Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R.d.C.G., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J.J.R.d.n., 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. 23, 629-643.

Barletta-Bergan, A., Barletta, M., Saint-Paul, U., 2002. Structure and seasonal dynamics of larval fish in the Caeté River Estuary in North Brazil. *Estuarine, Coastal Shelf Science* 54, 193-206.

Barron, M.G., Vivian, D.N., Heintz, R.A., Yim, U.H., 2020. Long-term ecological impacts from oil spills: comparison of Exxon Valdez, Hebei Spirit, and Deepwater Horizon. *Environmental Science Technology* 54, 6456-6467.

Bastolla, C.L., Lima, D., Mattos, J.J., Dias, V.H., Righetti, B.P., Gomes, C.H., Cella, H., Reis, I.M., Saldaña-Serrano, M., Ferreira, C.P., 2023. Comparative biochemical and molecular responses of biotransformation and antioxidant systems in three species of *Crassostrea* (Sacco, 1897) oysters exposed to chrysene. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology Pharmacology* 270, 109642.

Beasley, V., Levengood, J., 2012. Principles of ecotoxicology, Veterinary Toxicology. Elsevier Inc., pp. 831-855.

Bebianno, M.J., Barreira, L.A., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussatus* transplanted in the Ria Formosa lagoon. *Ecotoxicology Environmental Safety* 72, 1849-1860.

Berthet, B., 2015. Reference species, *Aquatic Ecotoxicology*. Elsevier, pp. 205-227.

Borja, A., Franco, J., Pérez, V., 2000. A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Marine pollution bulletin* 40, 1100-1114.

Brussaard, C.P., Peperzak, L., Beggah, S., Wick, L.Y., Wuerz, B., Weber, J., Samuel Arey, J., Van Der Burg, B., Jonas, A., Huisman, J., 2016. Immediate ecotoxicological effects of short-lived oil spills on marine biota. *Nature communications* 7, 11206.

Burgeot, T., Bocquéné, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R., Pfohl-Leszkowicz, A., Raoux, C., Galgani, F., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine ecology progress series* 131, 125-141.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the total environment* 247, 295-311.

CARVALHO-NETA, R.N.F., 2010. Área de Proteção Ambiental do Maracanã: subsídios ao manejo e à Educação Ambiental. São Luís: Café Lápis/FAPEMA.

CHASIN, A.d.M., Pedrozo, M., 2003. O estudo da toxicologia. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: RiMa, 1-25.

Christo, S., Absher, T., 2006. Reproductive period of *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) and *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819)(*Bivalvia: ostreidae*) in Guaratuba bay, Paraná, Brazil. *Journal of Coastal Research*, 1215-1218.

Christo, S.W., Absher, T.M., 2008. Crescimento da prodissoconcha de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 (*Bivalvia, Ostreidae*). *Boletim do Instituto de Pesca* 34, 71-77.

Costa, P., 1975. *Biologia e tecnologia para o cultivo de ostras*. Brasil. Ministério da Marinha. Instituto Nacional de Estudos do Mar, Manual de Maricultura. Rio de Janeiro, cap. VIII 36.

Council, N.R., Board, T.R., Earth, D.o., Studies, L., Board, M., Board, O.S., Sea, C.o.O.i.t., Fates, 2003. *Oil in the sea III: inputs, fates, and effects*.

da Silva, A.Z., Zanette, J., Ferreira, J.F., Guzinski, J., Marques, M.R.F., Bairy, A.C.D., 2005. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, *Bivalvia*) exposed to diesel oil. *Ecotoxicology Environmental Safety* 62, 376-382.

de Campos Guerreiro, F., Alves, T.C., Saldaña-Serrano, M., de Miranda Gomes, C.H.A., de Lima, D., Bastolla, C.L.V., Ferreira, C.P., Bitschinski, D., Rutkoski, C.F., Grott, S.C., 2024.

Integrating pollutant levels and biochemical biomarkers in oysters (*Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gasar*) indicates anthropic impacts on marine environments along the coast of Santa Catarina state, Brazil. *Marine Environmental Research* 194, 106309.

Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism cardiovascular diseases* 15, 316-328.

DeVito, M.J., 1996. Relationship between CYP1A enzyme activities and protein levels in rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of Toxicology Environmental Health Part A* 47, 379-394.

Di Giulio, R.T., Hinton, D.E., 2008. *The toxicology of fishes*. Crc Press.

Ekino, S., Susa, M., Ninomiya, T., Imamura, K., Kitamura, T., 2007. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of the neurological sciences* 262, 131-144.

Etkin, D.S., 1998. *Financial costs of oil spills in the United States*. Cutter Information Corporation.

Ferreira, C.P., Lima, D., Paiva, R., Vilke, J.M., Mattos, J.J., Almeida, E.A., Grott, S.C., Alves, T.C., Corrêa, J.N., Jorge, M.B., 2019. Metal bioaccumulation, oxidative stress and antioxidant responses in oysters *Crassostrea gasar* transplanted to an estuary in southern Brazil. *Science of the Total Environment* 685, 332-344.

Fu, H., Xia, Y., Chen, Y., Xu, T., Xu, L., Guo, Z., Xu, H., Xie, H.Q., Zhao, B., 2018. Acetylcholinesterase is a potential biomarker for a broad spectrum of organic environmental pollutants. *Environmental science technology* 52, 8065-8074.

Galtsoff, P.S., 1964. *The American oyster, Crassostrea virginica gmelin*. US Government Printing Office.

Guerreiro, F.d.C., Alves, T.C., Saldaña-Serrano, M., Gomes, C.H.A.d.M., Lima, D.d., Bastolla, C.L.V., Ferreira, C.P., Bitschinski, D., Rutkoski, C.F., Grott, S.C., Israel, N.G., Lückmann, K.H., Marques, M.R.F., Melo, C.M.R.d., Bairy, A.C.D., Almeida, E.A.d., 2024. Integrating pollutant levels and biochemical biomarkers in oysters (*Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gasar*) indicates anthropic impacts on marine environments along the coast of Santa Catarina state, Brazil. *Marine Environmental Research* 194, 106309.

Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton Jr, G.A., Cairns Jr, J., 2002. *Handbook of ecotoxicology*. CRC press.

Huber, P.C., Almeida, W.P., Fátima, Â.d., 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova* 31, 1170-1179.

Ignacio, B., Absher, T., Lazoski, C., Solé-Cava, A., 2000. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Marine Biology* 136, 987-991.

Johann, S., Nüßer, L., Goßen, M., Hollert, H., Seiler, T.B., 2020. Differences in biomarker and behavioral responses to native and chemically dispersed crude and refined fossil oils in zebrafish early life stages. *Science of the Total Environment* 709, 136174.

Johnson, L.L., Arkoosh, M.R., Bravo, C.F., Collier, T.K., Krahn, M.M., Meador, J.P., Myers, M.S., Reichert, W.L., Stein, J.E., 2008. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from Puget Sound, Washington. *The toxicology of fishes* 1, 1096.

Joyce, A.S., Pirogovsky, M.S., Adams, R.G., Lao, W., Tsukada, D., Cash, C.L., Haw, J.F., Maruya, K.A., 2015. Using performance reference compound-corrected polyethylene passive samplers and caged bivalves to measure hydrophobic contaminants of concern in urban coastal seawaters. *Chemosphere* 127, 10-17.

Kang, J.-J., Fang, H.-W., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel. *Biochemical Biophysical Research Communications* 238, 367-369.

Kataoka, A., 2001. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "landfarming". Rio Claro, Brasil.

Kennish, M.J., 2019. Ecology of estuaries: anthropogenic effects. CRC press.

León, V.M., Moreno-González, R., González, E., Martínez, F., García, V., Campillo, J.A., 2013. Interspecific comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons and persistent organochlorines bioaccumulation in bivalves from a Mediterranean coastal lagoon. *Science of the Total Environment* 463, 975-987.

Levengood, J.M., Beasley, V.R., 2007. Principles of ecotoxicology, Veterinary toxicology. Elsevier Ltd, pp. 689-708.

Li, J., Li, F., Liu, Q., 2017. PAHs behavior in surface water and groundwater of the Yellow River estuary: evidence from isotopes and hydrochemistry. *Chemosphere* 178, 143-153.

Lima, E., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci* 37, 293-303.

Lüchmann, K.H., Mattos, J.J., Siebert, M.N., Granucci, N., Dorrington, T.S., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Daura-Jorge, F.G., Bairy, A.C., 2011. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. *Aquatic toxicology* 105, 652-660.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology* 101, 13-30.

Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative Comparative Physiology* 280, R100-R107.

Magalhães, K.M., de Souza Barros, K.V., de Lima, M.C.S., de Almeida Rocha-Barreira, C., Rosa Filho, J.S., de Oliveira Soares, M., 2021. Oil spill+ COVID-19: A disastrous year for Brazilian seagrass conservation. *Science of the total environment* 764, 142872.

Magris, R.A., Giarrizzo, T., 2020. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. *Marine pollution bulletin* 153, 110961.

Marchesini, R., da Cruz, R.A., 2013. Turismo de base comunitária em estuário e manguezal: uma alternativa para o pescador artesanal. *Revista Brasileira de Ecoturismo* 6.

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

Martins, A.B.d.Ó., 2019. Bioacumulação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) no bivalve *Crassostrea rhizophorae*: ensaios laboratoriais e aplicação ambiental.

Martins, T.F.G., de Souza Ferreira, K., Rojas, I.E.B., Pompêo, M., 2022. BIOINDICADORES PARA AVALIAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS E OS EFEITOS DOS CONTAMINANTES SOBRE OS ORGANISMOS AQUÁTICOS, Aspectos da ecotoxicidade em ambientes aquáticos, pp. 24-42.

McLachlan, A., Defeo, O., 2017. The ecology of sandy shores. Academic press.

Meador, J.P., 2003. PAHs: An ecotoxicological perspective.

NAHUM, V.J.I., CASTELLO, J.P., Haimovici, M., MARTINS, A.S., ANDRIGUETTO FILHO, J.M., 2006. Síntese do estado de conhecimento sobre a pesca marinha e estuarina do Brasil. A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais.

Nascimento, I.A., 1991. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *C. brasiliensis* (Lamarck) in South and Central America. *Estuarine marine bivalve mollusk culture* 1, 125-134.

Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A., 2001. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *Science of the total environment* 281, 237-246.

Oliveira, M.C.R.M.d., 2012. Moluscos bivalves em Portugal: composição química e metais contaminantes. Faculdade de Ciências e Tecnologia.

Payne, J.F., Mathieu, A., Collier, T.K., 2003. Ecotoxicological studies focusing on marine and freshwater fish. PAHs: an ecotoxicological perspective, 191-224.

Perpétuo, N.C., da Graça Campos, M., Trincão, P.R., Coutinho, A.P.J.H.d.C.e.E.c.i., 2019. Breve história da toxicologia vegetal: alguns usos das plantas tóxicas ao longo do tempo. 20, 248-264.

Perrichon, P., Le Menach, K., Akcha, F., Cachot, J., Budzinski, H., Bustamante, P., 2016. Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach. *Science of the Total Environment* 568, 952-966.

Picciotto, M.R., Higley, M.J., Mineur, Y.S., 2012. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76, 116-129.

Reddy, C.M., Nelson, R.K., Hanke, U.M., Cui, X., Summons, R.E., Valentine, D.L., Rodgers, R.P., Chacón-Patiño, M.L., Niles, S.F., Teixeira, C.E., 2022. Synergy of analytical approaches enables a robust assessment of the Brazil mystery oil spill. *Energy Fuels* 36, 13688-13704.

Rizzi, J., Machado, E.d.C., 2007. Composto organoclorados em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) do complexo estuarino de Paranaguá-PR.

Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., Sarker, S., 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 333-340.

Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free radical Biology medicine* 27, 916-921.

Singer, M., Aurand, D., Bragin, G., Clark, J., Coelho, G., Sowby, M., Tjeerdema, R., 2000. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. *Marine Pollution Bulletin* 40, 1007-1016.

Soares, M.O., Teixeira, C.E.P., Bezerra, L.E.A., Rabelo, E.F., Castro, I.B., Cavalcante, R.M., Research, P., 2022. The most extensive oil spill registered in tropical oceans (Brazil): the balance sheet of a disaster. *Environmental science technology* 29, 19869-19877.

Souza, A.C.D., de Souza, Y.G., de Souza, J.L., da Silva Costa, D.F., de Souza Pinheiro, L., 2023. A produção científica do serviço ecossistêmico de proteção costeira por manguezais. *Meio Ambiente* 5.

Steinwandter, E., Haverroth, C., Teixeira, G.C., Neto, H.B., Portes, V.M., Governador do Estado Carlos Moisés da Silva Secretário de Estado da Agricultura, da Pesca e do Desenvolvimento Rural Altair Silva.

Thurman, H., TRUJILLO, A., 1996. *Essentials of Oceanography*, PrenticeHall. Inc.

- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology environmental safety* 64, 178-189.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology pharmacology* 13, 57-149.
- Van der Oost, R., Iero, A., Satumalay, K., Vermeulen, N., 2000. Validation of inland water pollution assessment using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Marine environmental research* 50, 431-432.
- Varela, E.S., Beasley, C.R., Schneider, H., Sampaio, I., Marques-Silva, N.D.S., Tagliaro, C.H., 2007. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. *Journal of molluscan studies* 73, 229-234.
- Wakamatsu, T., 1975. A ostra de Cananéia e seu cultivo. Superintendência do Desenvolvimento do Litoral Paulista.
- Whyte, J., Jung, R., Schmitt, C., Tillitt, D., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology* 30, 347-570.
- Zanette, J., de Almeida, E.A., da Silva, A.Z., Guzinski, J., Ferreira, J.F., Di Mascio, P., Marques, M.R.F., Bairy, A.C.D., 2011. Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. *Science of the total environment* 409, 1976-1983.
- Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: from bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201-208.