



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA- REDE BIONORTE**

**BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS, ENZIMÁTICOS E
EXPRESSÃO GÊNICA DE *GLUTATIONA S-TRANSFERASE E
CATALASE* EM *Sciades herzbergii* (BLOCH, 1794, PISCES, ARIIDAE)
PARA O MONITORAMENTO DE IMPACTOS ANTRÓPICOS NA BAÍA
DE SÃO MARCOS-MA**

HETTY SALVINO TORRES

São Luís – MA

2024

HETTY SALVINO TORRES

**BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS, ENZIMÁTICOS E
EXPRESSÃO GÊNICA DE *GLUTATIONA S-TRANSFERASE E
CATALASE* EM *Sciades herzbergii* (BLOCH, 1794, PISCES, ARIIDAE)
PARA O MONITORAMENTO DE IMPACTOS ANTRÓPICOS NA BAÍA
DE SÃO MARCOS-MA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - REDE BIONORTE, da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta.

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Alcina Vieira de Carvalho Neta.

São Luís – MA

2024

Torres, Hetty Salvino

Biomarcadores histológicos, enzimáticos e expressão gênica de *glutathione S-transferase e catalase* em *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794, Pisces, Ariidae) para o monitoramento de impactos antrópicos na Baía de São Marcos-MA / Hetty Salvino Torres. – São Luis, MA, 2024.

97 f

Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia- Rede Bionorte) - Universidade Estadual do Maranhão, 2024.

Orientador: Prof. Dr^a. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta.

HETTY SALVINO TORRES

BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS, ENZIMÁTICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE *GLUTATIONA S-TRANSFERASE E CATALASE* EM *Sciades herzbergii* (BLOCH,1794, PISCES, ARIIDAE) PARA O MONITORAMENTO DE IMPACTOS ANTRÓPICOS NA BAÍA DE SÃO MARCOS-MA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - REDE BIONORTE, da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em ___/___/___

Banca examinadora

Prof^a Dr^a Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Prof^a Dr^a Débora Batista Pinheira Sousa
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof^a Dr^a Débora Martins Silva Santos
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Prof. Dr. Jadson Pinheiro Santos
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Prof^a Dr^a Sildiane Martins Cantanhêde (UFPA)
Universidade Federal do Pará

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, **Hetty Salvino Torres**, () autorizo () não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada **BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS, ENZIMÁTICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE *GLUTATIONA S-TRANSFERASE E CATALASE* EM *Sciades herzbergii* (BLOCH, 1794, PISCES, ARIIDAE) PARA O MONITORAMENTO DE IMPACTOS ANTRÓPICOS NA BAÍA DE SÃO MARCOS-MA**” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

São Luís-MA: 26 de agosto de 2024.

(Hetty Salvino Torres)

CPF: 753529823-00

RG: 0485919958

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê” (Arthur Schopenhauer).

Aos meus pais, Benta Silva Salvino (in memoriam) e Espedito Rodrigues Salvino (in memoria), a Jose Fernando Torres (in memoria), aos Meus filhos, Mattheus Salvino Torres, Sarah Salvino Torres e Alice Fernanda Salvino Torres, e aos meus maiores incentivadores e mestres que nunca me deixaram desistir, Raimunda Fortes, Zafira De Almeida, Debora Batista, Wanda Batista, Fabiene Barros e Karla Bitencourt, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma etapa concretizada e, especialmente, pelo amadurecimento profissional, pessoal e espiritual.

Agradeço a toda minha família, em especial, meu esposo José Fernando Torres (in memoriam), meus filhos amados, Matthéüs Salvino Torres, Sarah Salvino Torres e Alice Fernanda Salvino Torres.

Agradeço as minhas irmãs Cidia Salvino, Joelma Salvino, as minhas sobrinhas Aparecida Barbosa e Vanessa, obrigada pelo apoio e compreensão todas as vezes que tive de me ausentar durante a realização do trabalho e vocês de maneira muito generosa assumiram minha casa e família. Amo vocês!

Agradeço a todos os meus amigos/as, que de maneira direta, contribuíram nesta caminhada: Débora Batista, Wanda Batista, Fabiene, Lorena, Karla Bittencourt, em muitos momentos o apoio de vocês foi indispensável. Obrigada!

Agradeço a minha orientadora, professora Raimunda Fortes e a minha co-orientadora, Professora Alcina Vieira, pela confiança depositada ao longo desse trabalho. Seguramente, a percepção e ensinamentos de vocês, me ajudaram a enfrentar todos os desafios durante a caminhada e a apurar as ideias para esta Tese.

Agradeço aos Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos – LABOAQ, Laboratório de Pesca e Ecologia Aquática – LABPEA e Laboratório de Patologia Molecular – LAMP, pelo suporte e ao grupo de pesquisa em Ecotoxicologia e Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos – GEPEMAAq pelos momentos de estudos.

Agradeço a todo corpo administrativo e técnico do PPG-BIONORTE. Aos professores da Rede Bionorte. Obrigada pela paciência e incentivo nessa jornada tão árdua.

Agradeço a Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, pela minha formação acadêmica.

Agradeço a FAPEMA pelo financiamento desta pesquisa através de bolsa concedida.

SALVINO-TORRES, Hetty. **Biomarcadores histológicos, enzimáticos e expressão gênica de *glutathione s-transferase* e *catalase* em *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794, Pisces, Ariidae) para o monitoramento de impactos antrópicos na baía de São Marcos-MA.** 2023. Defesa de Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – REDE BIONORTE) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2023.

RESUMO

No presente estudo, objetivou-se avaliar biomarcadores histológicos, enzimáticos e de expressão gênica de *glutathione S-transferase* (*GST*) e *catalase* (*CAT*) em peixes da espécie *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794), coletados sob a área de influência industrial e portuária e uma área de preservação ambiental na Baía de São Marcos, Maranhão. Exemplares *S. herzbergii* (Bloch, 1794), foram coletados semestralmente entre os anos de 2019 e 2021 (março e julho) em duas épocas do ano (chuvoso e estiagem) na Baía de São Marcos: Porto Grande (PG), região potencialmente impactada; e Ilha dos Caranguejos (IC), área de menor impacto. As amostras de sedimento foram coletadas para análise química de metais traços e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Foram feitas as análises de morfometria, atividade enzimática de *GST* e *CAT* e alterações branquiais e hepáticas (para os dois anos de estudo) e expressão gênica de *GST* e *CAT* (para ano de 2021) de cada exemplar. Os resultados das análises de HPAs dos sedimentos apresentaram que na região de PG as concentrações foram significativamente ($p < 0,05$) superiores em comparação com IC. A maioria dos oligoelementos presentes nos sedimentos estavam de acordo com os níveis recomendados pelas normas regulamentadoras brasileiras. Al, Fe, Mn e Sr apresentaram diferenças entre os locais amostrados com maiores valores. Os dados morfométricos dos peixes de IC no período chuvoso apresentou média alta do peso e tamanho em comparação a PG para os dois anos de coletas. As alterações nas brânquias dos peixes identificadas em IC foram: fusão lamelar, deslocamento do epitélio e degeneração tecidual. Em PG foram: deslocamento epitelial, fusão lamelar, necrose e hiperplasia. As alterações no fígado observadas foram: fibrose, necrose e centros melanomacrófagos nas duas áreas. As atividades de *GST* e *CAT*, em brânquias e fígados de peixes oriundos de IC, apresentou médias altas na estação chuvosa em 2019. Em 2021 *GST* e *CAT* em brânquias e fígado de peixes também apresentou médias maiores na estação chuvosa em PG. A expressão gênica de *GST* e *CAT* não expressaram em brânquias e fígados de peixes em PG e IC para esse estudo. No entanto, identificou-se neste estudo pela primeira vez a expressão dos genes endógenos *Beta-actina*, *18S RNA ribossômico*, *28S RNA ribossômico* em brânquias e fígados de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) indicando a qualidade do material biológico.

Os resultados dos biomarcadores (enzimáticos e histológicos) selecionados sugerem que os peixes nas duas áreas estão respondendo de forma negativa aos impactos no ambiente com destaque aos peixes capturados em PG, que demonstram alterações mais significativas. Genes endógenos (*Beta-actina*, *18S RNA ribossômico*, *28S RNA ribossômico*) apresentaram respostas positivas indicando a confiabilidade do método aplicado para *S. herzbergii* (Bloch, 1794). Os biomarcadores histológicos, enzimáticos e de expressão gênica de *GST* e *CAT* em *S. herzbergii* (Bloch, 1794), foram capazes de diferenciar a qualidade e os impactos provenientes de duas áreas da Baía de São Marcos, Maranhão.

Palavras-chave: Bagre. Biologia molecular. Bioquímica. Costa Amazônica. Contaminação ambiental. Histologia. Região portuária.

SALVINO-TORRES, Hetty. **Biomarcadores histológicos, enzimáticos e expressão gênica de *glutathione S-transferase* e *catalase* em *Sciades herzbergii* (Bloch,1794, Pisces, Ariidae) para o monitoramento de impactos antrópicos na baía de São Marcos-MA.** 2023. Defesa de Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – REDE BIONORTE) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2023.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate histological, enzymatic and gene expression biomarkers of *glutathione S-transferase* (GST) and *catalase* (CAT) in fish of the species *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794), collected under the area of industrial and port influence and an area of environmental preservation in the Bay of São Marcos, Maranhão. Specimens of *S. herzbergii* (Bloch, 1794), were collected every six months between 2019 and 2021 (March and July) at two times of the year (rainy and dry) in São Marcos Bay: Porto Grande (PG), a potentially impacted region; and Ilha dos Caranguejos (IC), an area with the lowest impact. Sediment samples were collected for chemical analysis of trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Morphometry, GST and CAT enzyme activity, and branchial and hepatic alterations (for the two years of the study) and *GST* and *CAT* gene expression (for 2021) were analyzed for each specimen. The results of the HPA analyses of the sediments showed that in the PG region the concentrations were significantly ($p < 0.05$) higher compared to IC. Most of the trace elements present in the sediments were in accordance with the levels recommended by the Brazilian regulatory standards. Al, Fe, Mn and Sr showed differences between the sampled sites with higher values. The morphometric data of CI fish in the rainy season showed a high average of weight and size compared to PG for the two years of collections. The alterations in the gills of the fish identified in HF were: lamellar fusion, epithelial displacement and tissue degeneration. In PG, the following parameters were: epithelial displacement, lamellar fusion, necrosis and hyperplasia. The changes in the liver observed were: fibrosis, necrosis and melanomacrophage centers in both areas. GST and CAT activities in gills and livers of fish from HF showed high averages in the rainy season in 2019. In 2021, GST and CAT in gills and liver of fish also showed higher averages in the rainy season in PG. The gene expression of *GST* and *CAT* were not expressed in gills and livers of fish in PG and IC for this study. However, in this study, the expression of the endogenous genes *Beta-actin*, *18S ribosomal RNA*, *28S ribosomal RNA* in gills and livers of *S. herzbergii* (Bloch, 1794) was identified for the first time, indicating the quality of the biological material. The results of the selected biomarkers (enzymatic and histological) suggest that the fish in both areas are

responding negatively to the impacts on the environment, especially the fish caught in PG, which demonstrate more significant changes. Endogenous genes (*Beta-actin*, *18S ribosomal RNA*, *28S ribosomal RNA*) showed positive responses indicating the reliability of the method applied to *S. herzbergii* (Bloch, 1794). The histological, enzymatic and gene expression biomarkers of *GST* and *CAT* in *S. herzbergii* (Bloch, 1794) were able to differentiate the quality and impacts from two areas of São Marcos Bay, Maranhão.

Keywords: Amazon Coast. Biochemistry. Catfish. Environmental contamination. Histology. Molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização dos pontos de coleta na região portuária e na Ilha dos Caranguejos, Baía de São Marcos, Maranhão. **36**
- Figura 2.** Imagens das áreas de estudo. A. Região de Porto Grande próximo ao Terminal da Alumar. B. Ilha dos Caranguejos (Área de Proteção Ambiental). **36**
- Figura 3.** Exemplar da espécie de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) coletada nas áreas de estudo. **37**
- Figura 4:** Esquema que demonstra os passos fundamentais para processamento da expressão das isoformas *GST* e *CAT* a partir de tecidos de fígado e brânquias de peixes *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794). **40**
- Figura 5.** Alterações branquiais e hepáticas em *S. herzbergii* (Bloch, 1794) capturados nas duas áreas de estudos. **50**
- Figura 6.** Atividade de *GST* em brânquias e fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) coletados em duas áreas na Baía de São Marcos (PG e IC) em dois anos 2019 e 2021 em duas épocas do ano (chuvoso e estiagem). **51**
- Figura 7.** Atividade de *CAT* em brânquias e fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) coletados em duas áreas na Baía de São Marcos (PG e IC) em dois anos 2019 e 2021 em duas épocas do ano (chuvoso e estiagem). **52**
- Figura 8.** Análise de componentes principais (PCAs) das alterações enzimáticas *GST* e *CAT* com as alterações histológicas em brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) capturados em dois períodos (chuvoso e estiagem) dos anos de 2019 e 2021. **54**
- Figura 9.** Análise de componentes principais (PCAs) das alterações enzimáticas *GST* e *CAT* com as alterações histológicas em fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) capturados em dois períodos (chuvoso e estiagem) dos anos de 2019 e 2021. **55**
- Figura 10.** Gel de eletroforese em agarose a 1,5%, corado com Sybr Safe, representativo da amplificação dos genes *CAT* e *GST* e os genes endógenos β -*actina*, *Cyt b*, *28S rRNA* e *18S rRNA*. PM= Peso Molecular; F=fígado e B=brânquia. **57**
- Figura 11.** Análise de componentes principais (PCAs) das alterações enzimáticas *GST* e *CAT* com o valor médio de CTs dos genes endógenos em brânquias e fígados de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) capturados em dois períodos (chuvoso e estiagem) dos anos de 2021. **60**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Lista de oligonucleotídeos utilizados para realização do teste de eficiência pela RT-qPCR. **42**
- Tabela 2.** Variáveis físico-químicas da água nas duas áreas de estudo Porto Grande e Ilha dos Caranguejos em 2019 e 2021 em épocas diferentes do ano (Estiagem e chuvoso). **44**
- Tabela 3.** Variáveis de oligoelementos e níveis de HPAs em amostras de sedimentos coletados em duas épocas (estiagem e chuvoso) do ano de 2019. **45**
- Tabela 4.** Dados biométricos de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) de duas áreas de estudo Ilha dos Caranguejos (IC) e Porto Grande (PG) em duas épocas (chuvosos e estiagem) dos anos de 2019 e 2021. **47**
- Tabela 5.** Índice do órgão de brânquias e fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) de duas áreas de estudo Ilha dos Caranguejos (IC) e Porto Grande (PG) em duas épocas (chuvosos e estiagem) dos anos de 2019 e 2021. **48**
- Tabela 6.** Média e Desvio-Padrão de Cts de genes endógenos β -actina, 28S rRNA e 18S rRNA em fígado e brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794). **58**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALUMAR	Consórcio de Alumínio do Maranhão
AHR	Receptor de Hidrocarboneto aromáticos
ANR	Aneurisma
APA	Área de Proteção Ambiental
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool)
BLE	Hemorragia
β -ACTIN	<i>Beta-actina</i>
CAT	Catalase
CDNB	1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEEA	Comitê de Ética de Experimentação Animal
Ct	do Inglês threshold cycle (ciclo limite)
Cq	do Inglês quantization cycle (Cq) (ciclo de quantificação)
CT	Comprimento Total
CG	Congestão
CytB	<i>Cytocromo B</i>
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DC	Células em Diferenciação
EAM	Material Amorfo Encapsulado
FB	Fibrose
GPS	Global Position System
GSH	Glutationa Reduzida
GST	Glutationa S-Tranferase (s)
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HI	Infiltração Leucocitária
HYP	Hiperplasia
LC	Ilha dos Caranguejos
LOD	do inglês <i>Limit of Detection</i> (Limite de Detecção)
LOQ	do inglês <i>Limit of Quantification</i> (Limite de Quantificação)
LF	Fusão Lamelar

LD	Deslocamento do Epitélio
LN	Estreitamento Lamelar
MET	Metiltransferase
MC	Centro de Melanomacrofágos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH₄OH	Hidróxido de Amônio
NRF2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
NC	Necrose
OXI-HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático Oxigenado
PAHs	do inglês Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
Ph	Fosfato de potássio
POP's	Poluentes Orgânicos Persistentes
PPIA	Peptidilprolyl Isomerase A
PT	Peso Total
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real
R₂	Correlation Coefficient
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase por transcriptase reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da Polimerase por transcriptase reversa em tempo
rRNA	real
RNA	<i>RNA ribossômico</i>
SBCAL	Ácido Ribonucléico
SEMA	Sociedade Brasileira da Ciencia em Animais de Laboratório Secretaria Estadual de Meio Ambiente e Recursos Naturais
SOD	Superóxido Dismutase(s)
ST	Esteatose
TBT	Tributilestanho
TD	Degeneração Tecidual
TEOS	Ortossilicato de Tetraetilo
VALE	Companhia do Vale do Rio Doce
VH	Vacuolização dos Hepatócitos
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	vii
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS	23
<i>1.1.1 Geral</i>	23
<i>1.1.2 Específicos</i>	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1. MONITORAMENTO AMBIENTAL	24
2.2 MONITORAMENTO AMBIENTAL EM REGIÕES ESTUARINAS	25
2.3. MONITORAMENTO AMBIENTAL EM REGIÕES PORTUÁRIAS	26
2.4 OS PEIXES COMO BIOMONITORES PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL	28
2.5 <i>S. herzbergii</i> (BLOCH, 1794) COMO ESPÉCIE BIOMONITORA.....	29
2.6 BIOMARCADORES EM ORGANISMOS AQUÁTICOS	30
2.7. BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM <i>S. herzbergii</i> (BLOCH, 1794).....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 LICENÇA E DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	35
3.2 ÁREA DE ESTUDO	35
3.3 AMOSTRAGEM DOS EXEMPLARES DE <i>S. herzbergii</i> (BLOCH, 1794).....	36
3.4 AMOSTRAGEM DAS VARIÁVEIS ABIÓTICAS E COLETA DE SEDIMENTOS .	37
3.5 DADOS BIOMÉTRICOS DE <i>S. herzbergii</i> (BLOCH, 1794).....	38
3.6 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE <i>S. herzbergii</i> (Bloch, 1794)	39

3.7 PROCESSAMENTO DE TECIDOS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS	39
3.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES ENDÓGENOS (<i>B-ACTINA</i> , <i>PPIA</i> , <i>CITOCROMO B</i> , <i>18S RRNA E 28S RRNA</i>) E GENES INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO (<i>GST E CAT</i>).	39
3.8.1 <i>Extração de RNA</i>	40
3.8.2 <i>Seleção dos genes e design de primers</i>	40
3.8.3 <i>PCR quantitativo em tempo real - RT-qPCR</i>	41
3.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	43
4 RESULTADOS	44
4.1 VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA E OLIGOELEMENTOS E NÍVEIS DE HPAS EM AMOSTRAS DE SEDIMENTOS	44
4.2 DADOS BIOMÉTRICOS.....	46
4.3 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE <i>S. herzbergii</i> (BLOCH, 1794).	47
4.4. BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE <i>S. herzbergii</i> (BLOCH, 1794).	50
4.5 RELAÇÃO DOS MULTIBIOMARCADORES <i>GST E CAT</i> COM AS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS E BRANQUIAIS EM <i>S. herzbergii</i> (BLOCH, 1794).....	52
4.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>GST E CAT</i> EM FÍGADO E BRÂNQUIAS DE <i>S. herzbergii</i> (BLOCH, 1794)	56
4.6.1 <i>Análise de expressão gênica de Citocromo b, 28S rRNA e 18S rRNA, β-actina e PPIA em fígado e brânquias de S. herzbergii (Bloch, 1794)</i>	56
4.6.1 <i>Análise de expressão gênica de GST e CAT em fígado e brânquias de S. herzbergii (Bloch, 1794)</i>	56
4.6.2 <i>Dados estatístico das médias e desvios padrão de Ct – Threshold cycles dos genes endógenos β-actina, 28S rRNA e 18S rRNA em fígado e brânquias de S. herzbergii (Bloch, 1794)</i>	57
4.6.2 <i>Correlação dos valores médios de Cts – Threshold cycles dos genes endógenos β- actina, 28S rRNA e 18S rRNA com as atividades enzimáticas de GST e CAT em fígado e brânquias de S. herzbergii (Bloch, 1794)</i>	59
5. DISCUSSÃO	61

6 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A	85
APÊNDICE B.....	86

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos estão constantemente expostos a diversas fontes de contaminação, como por exemplo, as substâncias que são geradas de efluentes industriais, portuários, domésticos, dos processos agrícolas e também de descartes dos contaminantes orgânicos, como o petróleo e gasolina (PINHEIRO SOUSA *et al.*, 2021).

Nas últimas décadas observou-se que a industrialização de países em desenvolvimento e o aumento considerável da população vem contribuindo de maneira significativa para a utilização de muitos compostos químicos (HOJAT; RAHIM, 2012) que podem, acidentalmente, impactar os corpos d'água. Os contaminantes que são mais persistentes têm a característica de sofrer biomagnificação nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, podendo assim atingir diferentes sistemas (SARKAR *et al.*, 2006). Dentre os principais contaminantes de origem antrópica, podemos mencionar os metais, os poluentes orgânicos persistentes (POPs), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e uma infinidade de agrotóxicos (NDIAYE *et al.*, 2012).

No Maranhão estudos revelam que os estuários estão apresentando níveis de contaminação química por oligoelementos e HPAs presentes no meio aquático (MACEDO *et al.*, 2023; TORRES *et al.*, 2024). Dentre os ambientes mais estudados a Baía de São Marcos é a mais citada uma vez que comporta o segundo maior complexo portuário da América Latina (CARVALHO NETA *et al.*, 2014). Em contrapartida, levando-se em conta a importância econômica, a Baía de São Marcos é classificada como uma das mais importantes do litoral brasileiro, devido à instalação do complexo portuário do Estado do Maranhão (1960), o qual é responsável pela movimentação de cargas para o Brasil e todo o mundo (ALCÂNTARA; SANTOS 2005; ANTAQ, 2018), com evidente potencial de impacto ambiental na área portuária e estuarina.

Um método tradicional de verificar os contaminantes químicos em ambientes estuarinos são as análises físico-químicas d'água (VAN DER OOST *et al.*, 2003), pois atuam como indicadores de contaminação aquática (WHITE; RASMUSSEN, 1998; VAN DER OOST *et al.*, 2003), podendo auxiliar em programas de monitoramento ambiental. No entanto, estudos baseados unicamente na utilização destes parâmetros não são capazes de determinar as reais problemáticas do ecossistema, especialmente se a avaliação for distante da fonte de emissão, necessitando de métodos mais sofisticados para verificar os efeitos dos contaminantes na comunidade biótica.

Nesse cenário, é crescente nos últimos anos, estudos utilizando como metodologia sofisticada os biomarcadores (moleculares, enzimáticos, morfológicos e comportamentais) de contaminação aquática, e uso de organismos biomonitores de ecossistemas aquáticos (CARVALHO NETA *et al.*, 2019; JESUS *et al.*, 2021; MACEDO *et al.*, 2024) sendo uma metodologia rápida e segura para a monitorização de impactos ambientais de regiões costeiras do país.

Alguns organismos aquáticos mais utilizados em estudos de monitoramento como biomonitores são os macroinvertebrados bentônicos, crustáceos (JESUS *et al.*, 2021) moluscos (RIBEIRO *et al.*, 2021) e peixes (TORRES *et al.*, 2023 e 2024; PINHEIRO SOUSA *et al.*, 2021). Dentre esses, destacamos os peixes, pois têm ampla distribuição geográfica, capacidade de metabolizar contaminantes presentes na água e podem ocupar o topo da cadeia alimentar, inferindo deste modo, efeitos crônicos e acumulativos ao longo da cadeia trófica (GOKSOYR *et al.*, 1991; ARAÚJO *et al.*, 2003).

No Maranhão estudos de biomonitoramento vem contribuindo para a identificação de áreas potencialmente impactadas por contaminantes industriais e portuários utilizando peixes estuarinos, dentre eles a espécie *S. herzbergii*, Bloch, 1794 (TORRES *et al.*, 2023 e 2024; PINHEIRO SOUSA *et al.*, 2021).

Sciades herzbergii (Bloch, 1794) conhecido popularmente como “bagre guribu” é comumente encontrado nos estuários distribuídos na costa estuarina do Maranhão (CASTRO *et al.*, 2018; PINHEIRO SOUSA *et al.*, 2021). Esta espécie é capturada nas pescarias artesanais e valorizada economicamente pela população maranhense (MACEDO *et al.*, 2024). Além disso, é utilizada em estudos de biomonitoramento por ser uma espécie biomonitora, apresentando diferentes biomarcadores em seus órgãos tais como alterações, branquiais, hepáticas, genotóxicas e enzimáticas (CARVALHO NETA *et al.*, 2014; PINHEIRO SOUSA *et al.*, 2013 e 2021; TORRES *et al.*, 2023).

Os biomarcadores bioquímicos como a glutathione s-transferase (GST) e catalase (CAT) e os biomarcadores histológicos (alterações histológicas branquiais e hepáticas), bem como os biomarcadores moleculares têm demonstrado eficácia nos estudos de biomonitoramento de ambientes aquáticos (CARVALHO NETA *et al.*, 2019; MACEDO *et al.*, 2024; RIBEIRO *et al.*, 2020). Nessa perspectiva, a utilização de biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica e o uso de espécies biomonitoras podem servir como metodologia sensível de avaliação prévia de efeitos biológicos e da avaliação na qualidade do ambiente (CAJARAVILLE *et al.*, 2000). Dessa forma, protocolos e processos utilizando biomarcadores histológicos, enzimáticos e de expressão gênica, são ferramentas que possibilitam combinar

técnicas de medição direta de impactos específicos nos ambientes monitorados (CAJARAVILLE *et al.*, 2000; NIGRO *et al.*, 2006; ROSS *et al.*, 2002).

A GST é considerada uma enzima de desintoxicação e biotransformação de fase II que está diretamente envolvida na conjugação de substâncias eletrofílicas com glutathione reduzida –GSH (SAMARAWEEERA *et al.*, 2019); a CAT é uma enzima antioxidante envolvida na decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzidos em quantidades elevadas no processo de biotransformação nos organismos submetidos ao estresse ambiental (VENTURA *et al.*, 2002). Os biomarcadores histológicos (como as alterações branquiais e hepáticas) podem ser reversíveis ou irreversíveis dependendo do tipo e grau de exposição do órgão ao agente poluidor (BERNET *et al.*, 1999). Por outro lado, alterações no nível de transcrição são os primeiros bioindicadores sensíveis para respostas biológicas ao estresse. Assim, genes com níveis de expressão, que são alterados em resposta a estresses ambientais podem ser usados para diagnóstico e quantificação dos efeitos desses estresses nos organismos (DONDERO *et al.*, 2006). Análises quantitativas de expressão gênica são relevantes em estudos que avaliem os danos a níveis moleculares em tecidos de organismos aquáticos expostos a oligoelementos. Todavia, ao realizar estudos de expressão gênica é necessário observar alguns critérios importantes de avaliação tais como: a quantidade e a qualidade do material analisado, eficiências enzimáticas das ferramentas analíticas usadas nos ensaios e diferenças significativas na expressão gênica entre tecidos ou células (JOHANSSON, *et al.*, 2007).

A integração dos biomarcadores em programas de biomonitoramento, é relevante na implementação de políticas públicas para o monitoramento de regiões que concentram empreendimentos industriais e portuários. Contudo, para a espécie *S. herzbergii* (Bloch, 1794) ainda não existem trabalhos com biomarcadores moleculares utilizando expressão genica de *GST* e *CAT*, necessitando, portanto, aprofundar essas análises para a espécie. Assim, neste trabalho, propomos a seguinte hipótese: peixes da espécie *S. herzbergii* (Bloch, 1794) de regiões com concentrações de HPAs, metais e agrotóxicos podem apresentar respostas histológicas (alterações branquiais e hepáticas), alterações nas atividades enzimáticas (catalase e glutathione S-transferase) e alterações na expressão gênica como biomarcador de poluição ambiental.

O presente documento de tese está estruturado das seguintes partes: primeiro uma introdução geral contendo uma abordagem geral dos biomarcadores histológicos, enzimáticos e de expressão gênica de *GST* e *CAT* seguida dos objetivos geral e específicos dessa pesquisa. A segunda parte apresenta um referencial teórico com conceitos gerais e trabalhos relacionados com o monitoramento ambiental com espécies aquáticas, conceitos e abordagem referentes aos biomarcadores analisados neste estudo, conceitos e abordagens sobre espécies bioindicadoras

e biomonitoras. Na terceira parte a metodologia e materiais utilizados nesta pesquisa são apresentados e relatados e na quarta parte apresentamos os resultados dos dados abióticos, oligoelementos, dados morfométricos, alterações histológicas em brânquias e fígados de peixes, biomarcadores enzimáticos de GST e CAT e biomarcadores moleculares de expressão gênica de *GST* e *CAT*; seguidos de uma discussão geral dos resultados encontrados nesta pesquisa, A tese finaliza com uma conclusão geral, seguido das referências e dos anexos com os artigos já publicados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar biomarcadores histológicos, enzimáticos e de expressão gênica de *glutathione S-transferase (GST)* e *catalase (CAT)* em peixes da espécie *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794), coletados em a área de influência industrial e portuária e em área de proteção ambiental na Baía de São Marcos, Maranhão.

1.1.2 Específicos

- Identificar alterações histológicas em brânquias e fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794);
- Quantificar as atividades enzimáticas de glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) em *S. herzbergii* (Bloch, 1794) em brânquias e fígado;
- Analisar as variáveis físico-químicas da água e oligoelementos (orgânicos e inorgânicos) em sedimento dos locais de captura de *S. herzbergii* (Bloch, 1794);
- Quantificar a expressão gênica de *GST* e *CAT* em brânquias e fígados de *S. herzbergii* (Bloch, 1794);
- Comparar a sanidade das populações de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) da área influenciada pelo complexo industrial e portuário de São Luís-MA e da Ilha dos Caranguejos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MONITORAMENTO AMBIENTAL

O monitoramento ambiental é compreendido como o uso e aperfeiçoamento de informações adquiridas sobre os principais eventos, interações, tendências e transformações que ocorrem no meio ambiente (ALBINATI *et al.*, 2007). Tem papel de fornecer informações que serão importantes para a gestão dos recursos do meio ambiente ou atividades realizadas pelo ser humano que possam causar impactos ambientais (DA SILVA *et al.*, 2022).

Como ferramenta relevante, o monitoramento serve para controlar e avaliar ambientalmente os espaços, podendo ser utilizada pelo poder público ou privado. Os resultados obtidos desse monitoramento são de suma importância para se definir políticas públicas que regulamentem ações de recuperação ambiental, bem como de projetos ambientais (CAMPOS e MARQUES, 2017).

Ambientalmente, o monitoramento foi sempre entendido como prevenção, sendo uma importante ferramenta para a administração dos recursos naturais. É desenvolvido para identificar ou medir possíveis riscos, e fornecer subsídios para uma análise mais detalhada sobre a situação dos ambientes (MIGNANI *et al.*, 2019).

O controle dos ambientes aquáticos (mares, rios e estuários) são regularmente feitos através de medidas de variáveis físico-químicas e bacteriológicas de seus cursos d'água, contudo, mesmo sendo métodos de avaliação confiáveis para o estabelecimento de indicadores de qualidade para os diversos usos humanos (RODRIGUES; CASTRO, 2008), quando se estuda isoladamente estes parâmetros, pode-se subestimar a real magnitude dos danos que estão sendo causados nesses ambientes (KARR; CHU, 1999).

O acompanhamento de ambientes costeiros, realizados pelos grandes centros de pesquisa dos Estados Unidos da América - EUA e Europa, têm revelado resultados satisfatórios com a utilização de respostas biológicas em organismos para a avaliação de impactos ecológicos nesses ambientes (NIETO *et al.*, 2010; AGUNWAMBA; ONUOHA; OKOYE, 2012; BRÁZOVÁ *et al.*, 2011).

As perturbações causadas pelas atividades humanas que impactam o ambiente e conseqüentemente a biota aquática são apresentadas de maneira recorrente em pesquisas de monitoramento ambiental em todo o mundo (CARVALHO NETA *et al.*, 2019; DA SILVA AIRES *et al.*, 2018; DAVANSO *et al.*, 2013; DUARTE *et al.*, 2016). Dessa forma, o monitoramento de atividades antrópicas no ambiente é importante para se entender a extensão dos danos ocasionados a biodiversidade e ao ambiente, sendo importantes ainda para a

identificação dos impactos sobre as espécies avaliando as alterações que podem ocorrer nos organismos (OLIVEIRA *et al.*, 2002; LEON *et al.*, 2020).

2.2 MONITORAMENTO AMBIENTAL EM REGIÕES ESTUARINAS

Os estuários são conhecidos como zonas de transição onde a água do mar encontra-se com a água doce oriunda da drenagem continental (KENNISH, 2002; McLUSKY; ELLIOT, 2004; KAISER *et al.*, 2005). São corpos d'água semifechados que se estendem até o limite efetivo de influência da maré (PERILLO, 1995). São ambientes que reúnem a interação entre água doce e marinha, englobando assim, tanto ecossistema fluvial como marinho, garantindo uma renovação periódica e transformação intensa de matéria orgânica (BERTHELSEN *et al.*, 2020).

São considerados verdadeiros viveiros de espécies, recebem e concentram material originário de toda sua bacia de drenagem, constituindo um grande aporte de produção primária de biomassa e ciclagem de nutrientes (PEREIRA FILHO *et al.*, 2003). Esses sistemas estuarinos representam um dos ambientes mais importantes da zona costeira, sendo uma das áreas mais produtivas do planeta; além disso, serve de berçário para muitas espécies e como hábitat para diversas outras (KAISER *et al.*, 2005).

Nessa perspectiva, o monitoramento ambiental em regiões estuarinas contribui para o diagnóstico prévio da situação dos impactos antrópicos e/ou naturais no ambiente (WANG; SINGHASEMANON; GOH, 2016), tendo em vista que as regiões costeiras são intensamente ocupadas pela expansão urbana em todo o mundo (BONETTI, 2011). Consiste em um processo importante para a administração dos recursos naturais (ADAMS; FLORES, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2023), como as encontradas na Baía de São Marcos (Maranhão), que abriga várias espécies de peixes que estão ameaçadas pelos impactos causados por poluentes, oriundos das diversas atividades do complexo portuário de São Luís (CARVALHO NETA *et al.*, 2019).

Assim, o monitoramento ambiental e acompanhamento da situação dos recursos ambientais nessas regiões costeiras auxiliam para o planejamento de ações visando a recuperação, melhoria ou manutenção da qualidade ambiental (Ministério do Meio Ambiente - MMA, 2009). Portanto, monitorar os ambientes estuarinos auxilia para a elucidação dos mecanismos iniciais de degradação, podendo garantir uma compreensão mais rápida sobre a situação do meio ambiente (SOUZA e FONTANETTI, 2007).

Estudos que esclareçam o potencial e a dinâmica dos xenobióticos (substâncias químicas no ambiente) nas populações ícticas de importância econômica para o estado do Maranhão são de grande relevância, uma vez que a pesca artesanal ainda é realizada próximo ao complexo

portuário de São Luís, MA, onde esses organismos podem estar sujeitos a condições fisiológicas desestabilizadoras em função dos contaminantes oriundos da carga e descarga de navios (SOUSA *et al.*, 2013).

2.3. MONITORAMENTO AMBIENTAL EM REGIÕES PORTUÁRIAS

O desenvolvimento dos grandes centros urbanos e instalações de amplos complexos industriais e portuários ocorrem geralmente nas regiões costeiras (FREITAS *et al.*, 2012). Dessa maneira, essas áreas por serem formadas por diferentes ambientes, (baías, praias, manguezais, estuários e igarapés), sofrem constantemente com impactos ocasionados por poluentes químicos, que geralmente são provenientes de fontes pontuais e difusas, como por exemplo, as atividades agrícolas, domésticas, industriais e portuárias, que acabam sendo direcionados para esses diferentes ambientes (CAPPARELLI; MCNAMARA; GROSELL, 2017; RAGUNATHAN *et al.*, 2017).

Esses poluentes geralmente apresentam uma baixa taxa de degradação e uma alta persistência, tendo também uma grande capacidade de bioacumulação e biomagnificação nos mais variados níveis da cadeia trófica, apresentando desta forma, um potencial tóxico (SANTANA; COSTA-LOTUFO; ABESSA, 2015).

É de conhecimento que as regiões portuárias, são responsáveis por grande parte da movimentação econômica local e entre nações, contudo estão localizadas em áreas costeiras, e trazem ameaças a esses ecossistemas (LU *et al.*, 2018). Regiões portuárias causam constantemente perturbações nos ambientes marinhos e nas áreas costeiras próximas, essas perturbações geralmente são ocasionadas pela ação antrópica gerando vários problemas ambientais, (dragagens, instalações de polos industriais, águas residuais sem tratamento, vazamentos de óleo, e as vezes inserção de espécies invasoras) (CHATZINIKOLAOU *et al.*, 2018).

A Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente N° 454, de 1° de novembro de 2012, apresenta como os principais contaminantes introduzidos nas regiões estuarinas (sejam por aporte fluvial, deposição atmosférica ou diretamente), os seguintes elementos: Metais e Semimetais, Tributilestanho (TBT), Agrotóxicos Organoclorados; e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). Esses poluentes estão como prioritários para o monitoramento ambiental nas regiões industriais e portuárias brasileiras conforme a CONAMA (2012).

No que se refere ao Brasil, as estruturas portuárias geram resíduos químicos que são maléficis aos organismos destes ecossistemas; estudos sinalizam alguns impactos

representativos nos animais que foram submetidos ao estresse destes ambientes devido a exposição a elementos químicos (metais pesados, benzeno, fenóis totais, tributilestano - TBT e bifenilas policlorados - PCB) resultantes das atividades portuárias (CARVALHO NETA; ABREU SILVA, 2010; DUARTE *et al.*, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2012; SOUSA; ALMEIDA; CARVALHO NETA, 2013).

A região da costa maranhense apresenta-se como ideal para grandes projetos de empreendimentos portuários e industriais, devido sua grande extensão de áreas navegáveis para os navios de grande porte (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Além desses empreendimentos portuários e industriais, o crescimento da área urbana nessas regiões colabora para um aumento significativo na produção dos mais variados resíduos que acabam sendo despejados no meio aquático (JESUS *et al.*, 2021).

No Maranhão, a Baía de São Marcos apresenta-se como uma área portuária de grande movimentação, sendo o segundo maior e importante complexo portuário da América Latina (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Alguns estudos, como os de Carvalho Neta e Abreu Silva (2010), apontam o complexo portuário de São Luís-MA como importante para a comercialização em nível internacional, nacional e local, onde possibilita o embarque e desembarque de produtos que estimulam rendas importante para o aumento da economia global. Contudo, essas atividades portuárias que acontecem nessa região, causam grandes impactos para os ecossistemas e biota aquáticas na região portuária de São Luís-MA (CARVALHO NETA *et al.*, 2019).

Nesta perspectiva, a região portuária na Baía de São Marcos no Maranhão apresenta uma vasta área de movimentação de navios, responsáveis pelo transporte de diferentes produtos químicos (ferro, manganês, bauxita, soda cáustica, alumina) que são importantes comercialmente no Estado do Maranhão e para o Brasil (CARVALHO NETA; TORRES; ABREU SILVA, 2012; CASTRO *et al.*, 2018; SOUSA; ALMEIDA; CARVALHO NETA, 2013). Entretanto, alguns desses produtos (resíduos) que são depositados na água e nos sedimentos dessas áreas portuárias são muitas vezes prejudiciais a esses ecossistemas aquáticos e também à sanidade dos organismos da área (ANDRADE, 2016; BATISTA, 2017).

Dessa forma se faz necessário analisar de maneira integrada diferentes metodologias para identificar tais poluentes em regiões portuárias e a utilização de biomarcadores vem se tornando uma importante ferramenta de avaliação dos efeitos tóxicos de substâncias poluentes em ecossistemas aquáticos, e que por meio do desenvolvimento e a aplicação de técnicas de exposição ou efeito em três níveis de complexidade (individual, celular e molecular), torna-se possível à elucidação da relação causa-efeito na avaliação de risco à qualidade desses ambientes

(JESUS *et al.*, 2020). Percebe-se assim, que o uso dessas técnicas de avaliação da saúde ambiental, pode trazer resultados satisfatórios no monitoramento das regiões portuárias.

2.4 OS PEIXES COMO BIOMONITORES PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL

O uso de peixes, já vem sendo amplamente documentada como indicadores importantes de qualidade da água e do meio ambiente, principalmente devido a sua ampla dispersão, longa vida útil, e utilização para consumo humano (ANGELI *et al.*, 2013; AZEVEDO *et al.*, 2009; DURAL; GÖKSU; ÖZAK, 2007; KERAMBRUN *et al.*, 2012). São organismos que ocupam os mais diversos ambientes aquáticos (VAZZOLER, 1996; LOWE-MC CONNELL, 1999) e são de grande importância comercial, já que fazem parte da dieta em muitos países e, em vários outros, são a principal fonte de proteínas da população (SILVA FILHO *et al.*, 2000).

Vários trabalhos fazem uso destes animais para avaliar o efeito do estresse causado por variações no ambiente aquático (GUNDERSEN *et al.*, 2000; SCHWAIGER, 2001), entretanto, ainda são poucos trabalhos com espécies neotropicais (ALMEIDA, 2001; SILVA, 2001; BARCAROLLI; MARTINEZ, 2004; CASTRO *et al.*, 2018; CARVALHO NETA *et al.*, 2019; MARTINEZ; CÓLUS, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2019 WINKALER, 2001;). Os peixes são comumente utilizados como modelos em programas de biomonitoramento do meio aquático (ZHOU *et al.*, 2008). Uma vez que esses organismos estão presentes em todos os sistemas aquáticos, sendo considerados suscetíveis à contaminação ambiental, pois, normalmente, possuem posição elevada na cadeia trófica, refletindo processo de biomagnificação (CARDOSO *et al.*, 2019), e seu metabolismo permite acumular metais a partir de alimentos, água ou sedimento (YILMAZ *et al.*, 2010).

Nos peixes os efeitos dos contaminantes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos, tecidos e modificações comportamentais que levam ao prejuízo do crescimento e da reprodução (ADAMS, 1990).

É muito comum a utilização de invertebrados nos estudos de biomonitoramento por apresentarem abundância populacional (MARTINEZ *et al.*, 1992; PÉQUEUX, 1995; ANDRADE, 2016; JESUS *et al.*, 2021; BATISTA, 2017). Entretanto, é crescente o número de trabalhos onde peixes vêm sendo utilizados como bioindicadores e biomonitores da qualidade dos ecossistemas aquáticos (OVERSTREET, 1988; TEH; ADAMS; HINTON, 1997; SCHWAIGER *et al.*, 1997; GUNDERSEN *et al.*, 2000; PACHECO; SANTOS, 2002; THOPHON *et al.*, 2003; BARCAROLLI; MARTINEZ, 2004; CASTRO *et al.*, 2018; CARVALHO NETA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2013; SOARES,

2020). Os peixes demonstram os impactos que um ecossistema vem sofrendo, a médio ou a longo prazo, através de suas funções vitais normais e também da sua formação orgânica (COLOMBI, 2009).

Alguns peixes vêm sendo utilizados frequentemente como bioindicadores de contaminação aquática em regiões que vem sofrendo impactos ambientais, tais como: *S. herzbergii* (Bloch, 1794), bagre da costa norte/nordeste do Brasil (CARVALHO-NETA *et al.*, 2012; PINHEIRO-SOUSA *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2020); *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) (MONTES; FERREIRA; SANTOS, 2010); *Cathorops spixii* (Agassiz, 1829), bagre amarelo (AZEVEDO *et al.*, 2009).

Esses organismos são capazes de armazenar quantidades de substâncias nocivas, sem sofrer danos e servem como indicadores de contaminação para avaliar a qualidade da água em ambientes aquáticos (REPULA *et al.*, 2012), por várias razões os peixes têm atraído interesse em estudos que avaliam respostas biológicas decorrentes à exposição de contaminantes ambientais (SOARES *et al.*, 2020).

2.5 *S. herzbergii* (BLOCH, 1794) COMO ESPÉCIE BIOMONITORA

S. herzbergii (Bloch, 1794) tem se destacado em estudos de biomonitoramento na costa norte do Brasil, principalmente por sua abundância, por ser de fácil amostragem, por apresentar motilidade lenta e ser uma espécie sensível diante à poluição nos estuários (MACEDO *et al.*, 2024a e 2024b; PINHEIRO-SOUSA *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2020; TORRES *et al.*, 2023).

O peixe conhecido como bagre “guribu” (*S. herzbergii*, Bloch, 1794) é uma espécie comumente encontrada nos corpos hídricos do Maranhão, é capturada nas pescarias artesanais e muito consumida entre os maranhenses, e por isso, esta espécie apresenta um alto valor nas feiras do Estado (CARVALHO-NETA; TORRES JR; ABREU-SILVA, 2012; CARVALHO-NETA; NUNES; PIORSKI, 2011; PINHEIRO-SOUSA *et al.*, 2013). O bagre “guribu” (*S. herzbergii*, Bloch, 1794) pertence à família Ariidae e se distribui nas zonas litorâneas tropicais e subtropicais, em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce, apresentando-se abundantes em águas costeiras com fundo lodoso e pouco profundo (ARAÚJO, 1988; ARAÚJO; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2004), essa espécie busca as embocaduras dos rios e regiões lagunares na época da sua desova (FIGUEIREDO; MENEZES, 1978). Os pescadores que capturam essa espécie ao redor de áreas potencialmente contaminadas (portos e das mais variadas indústrias), comercializam o pescado em mercados de várias regiões do Estado (TORRES, 2015).

A espécie *S. herzbergii* (Bloch, 1794), é uma das poucas que possui todo o seu ciclo de vida nos estuários maranhenses, sendo considerado como uma espécie “estuário-residente”

(CARVALHO NETA, 2010). Diferente dos demais bagres apresenta maxila superior com um par de barbilhões, maxila inferior com um ou dois pares, narinas anteriores muito próximas das posteriores e nadadeiras peitoral e dorsal com um espinho poderoso anteriormente de margens serradas (FIGUEIREDO; MENEZES, 1978).

Estudos aplicados a espécies aquáticas resistentes como *S. herzbergii* são considerados de grande importância, uma vez que as alterações encontradas em qualquer nível de organização biológica (molecular, bioquímico, celular), podem ser indicativos de impacto de um determinado ecossistema (GUILOSKI, 2009). O monitoramento de uma década, realizadas com *S. herzbergii* (Bloch, 1794) em pontos distintos da Baía de São Marcos-MA, vem revelando que alterações histológicas encontradas nas brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) desta espécie têm se mostrado como importante biomarcador de exposição para a avaliação de impactos antrópicos no complexo portuário da Ilha de São Luís (SOUSA, 2021).

2.6 BIOMARCADORES EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

Os biomarcadores são respostas biológicas detectadas precocemente nos níveis, histológicos, bioquímicos e moleculares, com a ativação do sistema de defesa celular e de biotransformação, fornecendo dados sensitivos sobre o estresse dos organismos aquáticos (ATLI *et al.*, 2016; ADEOGUN *et al.*, 2016). Através desses sinais, os organismos revelam o estágio em que se encontram, depois da exposição à contaminação da biota aquática (GUPTA, 2014). Os biomarcadores podem ser detectados precocemente, e assim permitir a aplicação de medidas preventivas possibilitando a reversão da degradação do ambiente em alguns casos (SOGORB *et al.*, 2014).

Para Jesus; Carvalho, (2008) os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: de exposição, efeito e suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição são alterações biológicas mensuráveis que evidenciam a exposição dos organismos a um poluente, podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna (RUDIGER, 1999; WHO, 1993).

Os biomarcadores de efeito estão relacionados com variáveis biológicas mensuráveis que, em sua maioria, não são específicos em relação aos contaminantes (PIVETTA *et al.*, 2001). Nesse caso, tem-se as alterações bioquímicas, fisiológicas e aquelas quantificadas nos tecidos ou fluidos corporais que estão associadas a um possível comprometimento da sanidade do organismo (KROON; STRETEN; HARRIES, 2017).

Os Biomarcadores de suscetibilidade podem ser definidos como indicadores de processos que causam variações de repostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (BARRETT *et al.*, 1997). São predominantemente genéticos, embora a patologia, alterações fisiológicas, medicamentos e exposição a outros agentes ambientais também possam alterar a suscetibilidade individual (RUDIGER, 1999).

Neste trabalho, utilizaram-se biomarcadores de efeito, as alterações branquiais, hepáticas e enzimáticas e de suscetibilidade expressão gênicas de *GST* e *CAT*. Portanto, a utilização de biomarcadores histológicos, enzimáticos e moleculares em peixes em áreas portuárias poderá auxiliar em programas de monitoramento ambiental, uma vez que metodologias baseadas em parâmetros biológicos apresentam muitas vantagens, tais como alta sensibilidade e rapidez.

2.7. BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM *S. herzbergii* (BLOCH, 1794)

Os seres vivos possuem uma capacidade intrínseca de resistir a perturbações no meio ambiente, que é mediada por uma série de alterações fisiológicas, a sequência dessas alterações representa a sua capacidade de adaptação no meio e são estas as respostas de estresse à exposição aos agentes tóxicos (SILVA, 2008). As respostas biológicas medidas em células, tecidos, fluidos corporais dos organismos e respostas fisiológicas e morfológicas são chamadas de biomarcadores (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) e estes podem ser histológicos (branquiais, hepáticas), bioquímico (enzimáticas) e moleculares.

O método de avaliação das alterações histológicas é reconhecido como uma metodologia rápida e eficaz para a determinação dos danos nos tecidos causados pela exposição a diferentes poluentes nos peixes (ARELLANO *et al.*, 1999). Comumente as alterações em tecidos são estudadas em órgãos específicos como as brânquias, fígado, rins e músculos de peixes (CASTRO *et al.*, 2018, SOARES *et al.*, 2020). As alterações nos tecidos podem ser reversíveis ou irreversíveis dependendo do grau de severidade da lesão (Bernet *et al.*, 1999). As alterações reversíveis podem diminuir ou reverter o grau de severidade quando o animal deixa de ser exposto ao agente estressor (contaminante, por exemplo) enquanto a irreversível a alteração não tem mais solução mesmo se o animal não for mais exposto ao contaminante específico (Bernet *et al.*, 1999).

Os biomarcadores bioquímicos são respostas de baixo nível de organização biológica. As enzimas por exemplo, *GST* é uma enzima de desintoxicação e biotransformação da fase II

que está diretamente envolvida na conjugação de substâncias eletrofílicas com glutathione reduzida –GSH (SAMARAWEEERA *et al.*, 2019), e vários estudos apontam alterações na atividade de GST em brânquias e fígados de peixes (PINHEIRO-SOUSA *et al.*, 2021; TORRES *et al.*, 2023) e também em brânquias e hepatopâncreas de caranguejos (JESUS *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2019). A CAT também vem sendo utilizada em estudos de biomonitoramento utilizando organismos aquáticos (JESUS *et al.*, 2021; TORRES *et al.*, 2023) é uma enzima antioxidante envolvida na decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzidos em quantidades elevadas no processo de biotransformação nos organismos submetidos ao estresse ambiental (VENTURA *et al.*, 2002). As alterações bioquímicas se observadas com uma certa antecedência, pode ser possível a identificação de problemas ambientais antes que o ecossistema aquático seja afetado e são apontados como sistemas de “sinal de alerta” na avaliação da saúde ambiental (HENDERSON, 1995; JIMENEZ; STEGEMAN, 1990; PAYNE *et al.*, 1987).

A contribuição das análises de expressão gênica tem aumentado significativamente nos estudos comportamentais de algumas espécies, sendo a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR, do inglês Reverse Transcription), a ferramenta mais utilizada para investigar a expressão gênica de alvos específicos ou genes de referência (“housekeeping” genes normalizadores), devido a sua grande eficiência e precisão (BUSTIN *et al.*, 2010; JULIAN *et al.*, 2016). A PCR quantitativa (qPCR) possibilita a aferição síncrona da expressão gênica em muitas amostras diferentes para um número limitado de genes (NOLAN *et al.*, 2006). qRT-PCR é uma evolução na quantificação de ácido nucleico que foi aperfeiçoada de acordo com a tecnologia convencional de PCR (WONG e MEDRANO, 2005). É descrita por uma elevada sensibilidade, uma repetibilidade e especificidade adequada, além de ter capacidade de alto rendimento, e com isso, tem sido largamente usada em análises de expressão gênica e diagnósticos clínicos (ESPÍNOLA *et al.*, 2014). A exatidão e confiança da qRT-PCR são dependentes de muitos fatores (KLATTE e BAUER, 2009), como por exemplo, a qualidade do RNA, a eficiência de transcrição reversa e a escolha apropriada de genes de referência ou endógenos. Em uma investigação de expressão gênica, a escolha de um gene de referência apropriado é uma questão crucial para quantificar com exatidão os níveis de expressão usando qRT-PCR (KONG *et al.*, 2015).

As respostas moleculares são geralmente consideradas efeitos similares paralelos a níveis funcionais, e as variações nos níveis de mRNA são frequentemente discutidos em termos de regulação (aumento ou diminuição) gênica de complexos bioquímicos ou mesmo vias metabólicas (REGOLI *et al.*, 2011).

O uso das análises de expressão gênica aponta para o entendimento dos processos biológicos relacionados as mais variadas condições em organismos vivos, permitindo a identificação de marcadores diagnósticos como alvos terapêuticos no tratamento de possíveis distúrbios. A utilização de genes de referência é indispensável para a quantificação relativa das análises da expressão gênica e como esses genes vão se comportar, (sua estabilidade), pode variar dependendo do desenho experimental, por isso é necessário teste de confiabilidade dos genes endógenos (HUL *et al.*, 2020).

A maior parte das pesquisas sobre estresse oxidativo se concentrou na resposta das atividades enzimáticas antioxidantes sozinhos, e pouco se investigou sobre os efeitos causados nos genes de enzimas antioxidantes em nível transcricional, especialmente em organismos aquáticos. Estudos investigatórios para a compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos na defesa e na toxicidade de algumas substâncias comuns nos ambientes aquáticos é fundamental para entender o destino crônico e agudo desses organismos no meio ambiente (GONÇALVES-SOARES *et al.*, 2012). Alguns estudos sobre a CAT em organismos aquáticos nos mostram algo especial, uma vez que alterações nas atividades catalítica e na expressão gênica foram apontadas como um efeito causado pela exposição a microcistinas (MCs) em vertebrados (XIONG *et al.*, 2010). Com estes resultados foi proposta a hipótese de que as mudanças na atividade da CAT podem ser devidas ao aumento de radical ânion superóxido causado pelos MCs e podem aparecer junto com uma expressão diminuída do mRNA da CAT (XIONG *et al.*, 2010).

A união de MCs com glutathione (GSH) é estimulada por glutathione *S*-transferases (GSTs) nos mais variados organismos aquáticos, (plantas, moluscos, crustáceos e peixes (PFLUGMACHER *et al.*, 2004). Essa relação é comumente considerada a principal via para desintoxicação de MC desses organismos, elaborando a partir daí compostos mais polares e tornando possível a excreção dessas toxinas (PFLUGMACHER *et al.*, 2004, BEATTIE *et al.*, 2003). A GST, representa uma família de enzimas citosólicas, mitocondriais multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico de GSH a substâncias que contenham átomo de carbono, nitrogênio ou enxofre eletrofílico (HAYES *et al.*, 2005, HUBER *et al.*, 2008). Essas isoformas enzimáticas, foram categorizadas em classes e apresentam distribuição específica de órgãos (SATO *et al.*, 1984, HAYES e MANTLE, 1986, HAYES *et al.*, 2005). A análise das etapas transcricionais e atividade enzimática dessas proteínas vem ajudar na compreensão dos mecanismos metabólicos e eliminação da toxina em organismos aquáticos (GONÇALVES-SOARES *et al.*, 2012). Nos últimos anos, mais estudos sobre GST e CAT em organismos aquáticos se concentram nas características biomarcadoras das enzimas. Uma melhor caracterização da expressão gênica *GST* e *CAT* devem ser abordadas para complementar os

mecanismos bioquímicos envolvidos na eliminação de toxinas dos organismos (BLANCHETTE *et al.*, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LICENÇA E DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

A coleta dos peixes de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) foi autorizada junto à Secretaria Estadual de Meio Ambiente e Recursos Naturais – SEMA (015/2019) e todos os procedimentos metodológicos para a manipulação dos peixes foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Estadual do Maranhão - CEEA (número 01/2018 CRMV-MA), cumprindo as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/ Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL/COBEA (SBCAL/COBEA, <http://www.sbcal.org.br>).

3.2 ÁREA DE ESTUDO

Os espécimes de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) foram capturados em dois locais na Baía de São Marcos (Figura 1). O primeiro em Porto Grande que está localizado perto do porto ALUMAR/ALCOA (sob coordenadas, 02°43'14''S e 044° 23'35''W), área caracterizada como potencialmente contaminada (Figura 2A) por abrigar em seu entorno o complexo portuário de São Luís e também o complexo industrial gerando contaminantes químicos para o meio ambiente através de suas atividades constante de extração de minério, transporte de cargas com produtos nocivos como minério de ferro por exemplo, por navios de grande porte na Baía de São Marcos.

O segundo local denominado de Ilha dos Caranguejos (sob coordenadas, 02° 49' 33,6'' S e 44° 28' 51,1'' W) está localizado a oeste da Baía de São Marcos a 30 km da ilha de São Luís. Em associação com vários municípios da Baixada Maranhense, a Ilha dos Caranguejos faz parte da Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense, criada pelo Governo do Estado do Maranhão, através do decreto de nº 11.900 de 11 de junho de 1991 e reeditado em 05 de outubro de 1991. Essa APA enquadra-se no setor norte da plataforma continental brasileira e recebe águas do rio Mearim (PINHEIRO-SOUSA *et al.*, 2021). Foi usado como uma área de referência com base no pressuposto que estaria “livre” de contaminação direta (Figura 2B).

Figura 1. Localização dos pontos de coleta na região portuária e na Ilha dos Caranguejos, Baía de São Marcos, Maranhão.

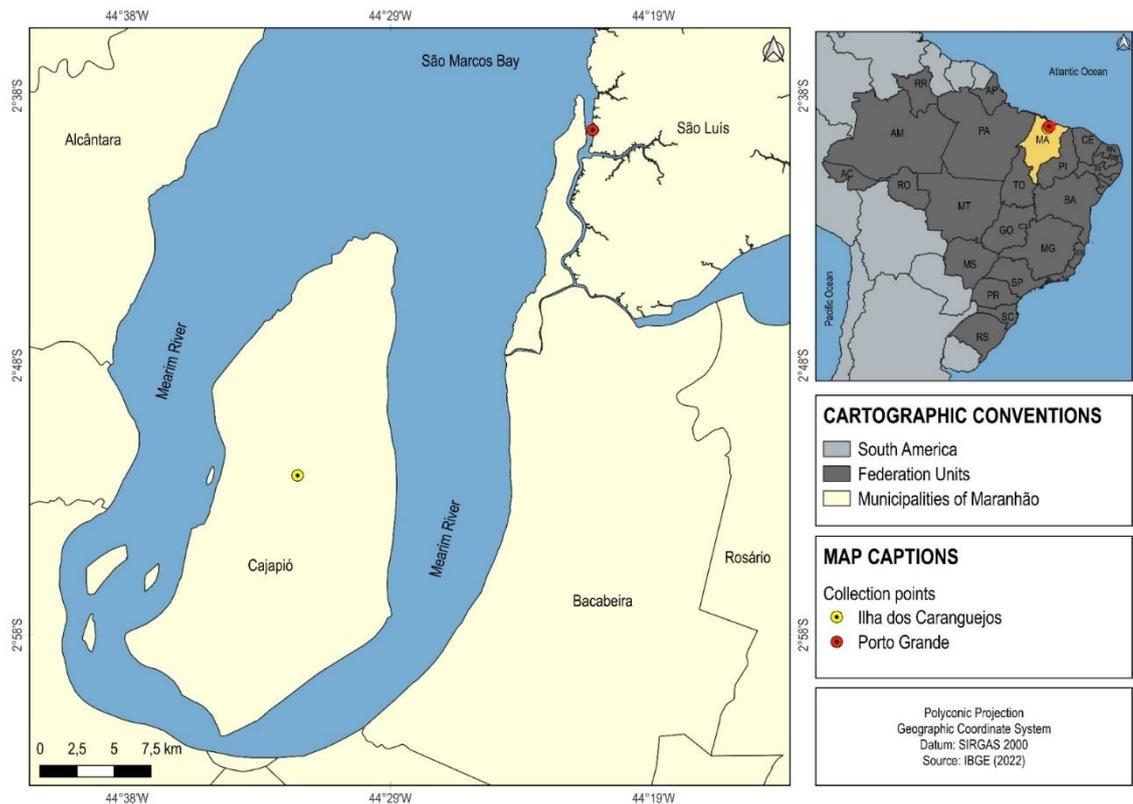
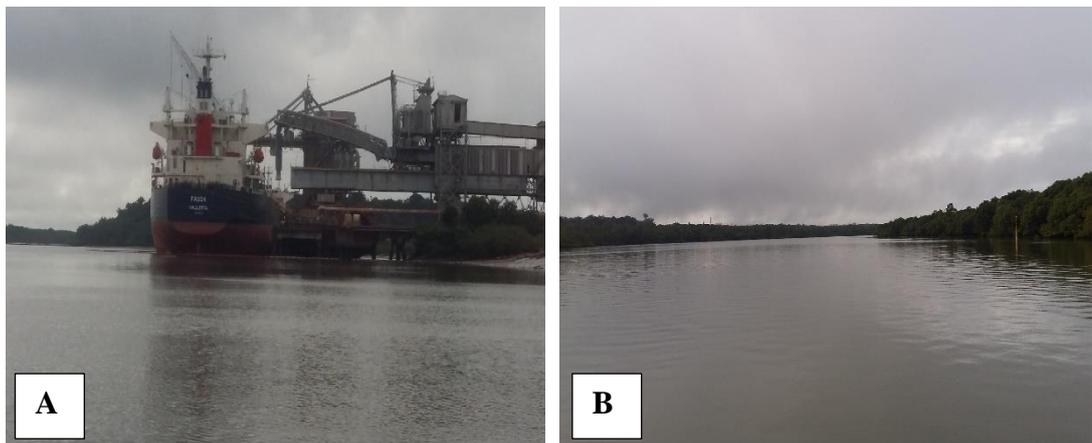


Figura 2. Imagens das áreas de estudo. A. Região de Porto Grande próximo ao Terminal da Alumar. B. Ilha dos Caranguejos (Área de Proteção Ambiental).



3.3 AMOSTRAGEM DOS EXEMPLARES DE *S. herzbergii* (BLOCH, 1794)

A amostragem de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) (Figura 3) ocorreu semestralmente em dois anos de coletas com um total de 20 exemplares por coleta nos meses de março (2019 e 2021), representando o período chuvoso, e julho representando o período de estiagem para a região (como o ano de 2020 foi o ano da Pandemia, não foi possível realizar as coletas previstas

para essa época). Os exemplares capturados com auxílio de redes de emalhar nas duas áreas de estudo (IC e PG) foram divididos para análises biométricas, histológicas, enzimáticas e moleculares, foram utilizados o total de 80 exemplares de peixes dos dois anos de coletas, sendo que dessa amostragem somente 20 fragmentos de brânquias e 20 fragmentos de fígados de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) do ano de 2021 (chuvoso e estiagem) foram utilizadas para as análises da expressão gênica dos genes endógenos (β -actina, PPIA, Citocromo b, 18S rRNA e 28S rRNA) e alvos (GST e CAT).

Figura 3. Exemplar da espécie de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) coletada nas áreas de estudo.



3.4 AMOSTRAGEM DAS VARIÁVEIS ABIÓTICAS E COLETA DE SEDIMENTOS

Parâmetros físicos e químicos, como temperatura (°C), pH (ppm), salinidade (ppm) e oxigênio dissolvido (mg/L), foram medidos nos locais estudados durante as estações seca e chuvosa usando um multiparâmetro HI 9829 m (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EUA).

As amostras de sedimento foram padronizadas granulometricamente em uma malha de 200 (74 μ m), secas em estufas a 40 °C, maceradas e armazenadas em frascos de propileno. Cerca de 1,0 g (peso seco) do sedimento foi utilizado em duplicata para determinar os elementos traço e HPAs após digestão ácida com HNO₃ (65%, Merck) e HCl (37%, Merck) aquecidos a 80 °C em um bloco de digestão, e subsequentemente homogeneizados com 15 mL de HCl. Os elementos traço (Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr, V e Zn) foram determinados por espectrofotometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES Optima 8300, Perkin Elmer). Para a determinação do mercúrio total (HgT) foram utilizados os métodos descritos por Malm *et al.* (1989), Bastos *et al.* (1998) e Bastos *et al.* (2015). Todas as

amostras foram tratadas com H₂SO₄: HNO₃ (1:1, Tédia, Brasil) e KMnO₄ (5% p/v - Merck). Após a digestão da amostra, 4,0 mL de solução de KMnO₄ (5% p/v) foram adicionados e deixados por mais 30 min no bloco de digestão (Tecnal-Mod.007A, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 60°C por 1h; seguido de resfriamento em temperatura ambiente (± 25 °C) e adição de gotas de cloridrato de hidroxilamina (solução a 12%, p/v - Merck).

As amostras digeridas foram diluídas com 10,0 mL de água ultrapura (Milli-Q Plus, Millipore, Bedford, MA, EUA). As medições totais de HgT foram avaliadas por espectrofotometria de absorção atômica em vapor frio (Flow Injection Mercury System- FIMS -400- Perkin Elmer, Ueberlingen, Alemanha). Para controle analítico da qualidade, foram utilizados reagentes com alto grau de pureza analítica (PA, Merck) e amostras de referência certificada (Sedimento: SS2 SSP-SCIENCE; peixe: Dorm-4, NCR). As soluções foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q Plus, Millipore). Todas as vidrarias utilizadas foram primeiro descontaminadas com 5% de HNO₃ (v/v, Merck) por 24h e lavadas com água ultrapura. As porcentagens médias de recuperação em precisão foram de 80% a 120% para todos os elementos traço analisados.

As amostras dos sedimentos foram armazenadas a -80°C e após digestão ácida foram utilizados protocolos da Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA 3550C/8270D para HPA). A análise foi realizada utilizando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES Optima 8300, Perkin Elmer).

3.5 DADOS BIOMÉTRICOS DE *S. herzbergii* (BLOCH, 1794)

Os peixes foram anestesiados com óleo de cravo (eugenol) e eutanasiados por imersão em água com gelo (0°C a 4°C). Os espécimes foram submetidos à biometria e registrados os dados de comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), comprimento furcal (CF) em cm e peso total (PT) em grama. Em seguida foram abertos por incisão vertical para observação e classificação macroscópica das gônadas (machos e fêmeas) de acordo com Lowerre-Barbieri *et al.* (2011): ciclo 1 (em desenvolvimento), ciclo 2 (em desova), ciclo 3 (em regressão) e ciclo 4 (em regeneração). As amostras de fígado e brânquia foram preservadas em formalina a 10% por 24 horas para análises histológicas.

3.6 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE *S. herzbergii* (BLOCH, 1794)

Os arcos branquiais e o fígado dos bagres foram descalcificados por 24 horas em solução de ácido nítrico a 10%; em seguida foram desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Cortes transversais, de aproximadamente 5 μm de espessura, foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A leitura foi realizada com auxílio do microscópio óptico Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e fotomicrografadas usando um Olympus BX51 microscópio. As alterações histológicas branquiais e hepáticas foram avaliadas de forma semiquantitativas de acordo com o sistema de pontuação de Bernet *et al.* (1999) que avaliam a extensão e gravidade de severidade das alterações através de um sistema de pontuação e índices matemáticos.

3.7 PROCESSAMENTO DE TECIDOS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Amostras de fígado e brânquias dos peixes foram homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas, sendo o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática da glutatona-S-transferase (GST), catalase (CAT). A atividade da GST foi quantificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm a 25° C, conforme Camargo; Martinez (2006), utilizando-se glutatona reduzida (GSH) e 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) como substrato, em tampão fosfato de potássio (0,1M), pH 7,0. Já a atividade da CAT foi estimada, a 240 nm, pela taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de acordo com Ventura *et al.* (2002).

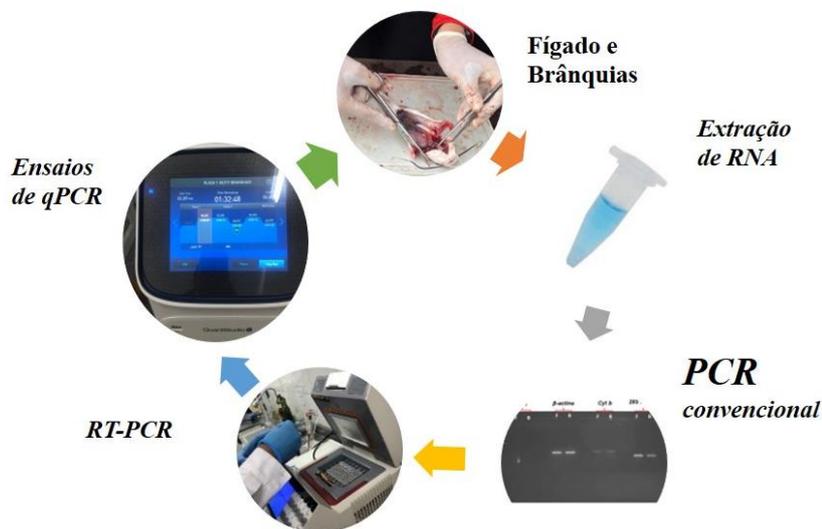
3.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES ENDÓGENOS (*B-ACTINA*, *PPIA*, *CITOCROMO B*, *18S RRNA* E *28S RRNA*) E GENES INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO (*GST* E *CAT*).

Para avaliação da expressão gênica diferencial foi estabelecida uma amostragem de 20 fragmentos de brânquias e 20 fragmentos de fígados de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) coletados nas duas áreas de estudo e período sazonal (chuvoso e estiagem) para o ano de 2021. As amostras foram armazenadas em solução de RNAlater™ (ThermoFisher Scientific, Inc.), para estabilização e proteção do RNA celular por 24h e em seguida, acondicionadas a -20 °C até a realização das análises moleculares.

3.8.1 Extração de RNA

Para extração do RNA, foi utilizado aproximadamente 100 mg dos tecidos de cada animal, de acordo com o protocolo do reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e qualidade da extração do RNA extraído foi analisado em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). As amostras foram padronizadas na concentração de 500 ng/μl de RNA para realização da RT-PCR (Figura 4).

Figura 4: Esquema que demonstra os passos fundamentais para processamento da expressão das isoformas *GST* e *CAT* a partir de tecidos de fígado e brânquias de peixes *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794).



3.8.2 Seleção dos genes e design de primers

Para determinar e otimizar a concentração dos genes utilizados para analisar o perfil de expressão gênica, foram testados sete genes: endógenos - β -actina, PPIA, Citocromo b, 18S rRNA e 28S rRNA e dois genes alvos *CAT* e *GST* associados ao estresse oxidativo em amostras de tecidos de brânquias e fígados de peixes (Tabela 1). Devido à ausência de estudos genéticos com esses marcadores na espécie *S. herzbergii* (Bloch, 1794), os oligonucleotídeos escolhidos foram referentes a sequências previamente depositadas no Genbank, com outras espécies de peixes (Tabela 1). Por outro lado, três genes endógenos de espécies de peixes pertencentes a família Ariidae foram desenhados para esta pesquisa, utilizando a ferramenta Primer BLAST (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), com base em sequências parciais

previamente depositadas no banco de dados genético dos genes *Citocromo b*, *18S rRNA* (KJ774714.1) e *28S rRNA* (AF056012). Em seguida, as sequências dos genes foram alinhadas com outras depositadas, usando uma pesquisa *nucleotídeo BLAST* (NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar especificidades. Os primers foram sintetizados por *Custom DNA oligos Synthesis Services* (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

3.8.3 PCR quantitativo em tempo real - RT-qPCR

A conversão enzimática do RNA extraído em um DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit comercial SuperScript® III First-Strand Synthesis System para RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Inc.). As reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando o termociclador SimpliAmp™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) para detecção dos genes escolhidos.

A eficiência da amplificação de sequências foi calculada a partir da construção de uma curva padrão usando diluições em série de quantidades conhecidas de cDNA (1000, 100, 10, 1 e 0,1 µg/µL) para todos os genes testados, todos realizados em duplicatas. O protocolo de amplificação utilizou mix de reação contendo 10 µL de cada primer (2,5pmol), 5µL de PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) e 2 µL de nuclease-free water (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). 2µL de cDNA sintetizado de acordo com o protocolo de transcrição reversa, foi adicionado a cada reação.

Antes que os níveis de expressão dos sete genes candidatos fossem detectados usando qRT-PCR, a eficiência dos primers foi confirmada usando PCR convencional. Cada reação teve um volume final de 25 µL, sendo 12,5 µL de PCR Master Mix Promega© (TaqPolymerase, dNTPs, MgCl₂, buffer), 1 µL de cada primer (2,5 pmol), 8,5 µL de água nuclease free (Promega ©) e 2 µL de cDNA confeccionado e padronizado na concentração de 250 ng/µL. As condições de ciclo e temperatura foram as seguintes: 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos, 60 °C por 20 segundos e 72 °C por 20 segundos.

Os genes endógenos com amplificação positiva no ensaio convencional usando eletroforese em gel de agarose a 1,5% e também os genes alvos (*GST* e *CAT*) foram submetidas a PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica nas amostras de brânquias e fígados de peixe das áreas de estudos (Tabela 1). O ensaio foi conduzido utilizando o mesmo equipamento e concentração de reagentes utilizados para o teste de eficiência. Todas as

amostras foram diluídas para a concentração 1:9 e realizadas em duplicatas para os genes testados.

Os dados de expressão gênica foram obtidos a partir da amplificação das amostras de brânquias e fígados de peixe pela metodologia da RT-qPCR com o corante fluorescente SYBR Green. O equipamento utilizado foi o QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Os níveis de expressão relativa dos genes testados foram calculados usando valores de Ct (threshold cycle) e eficiências médias de amplificação do amplicon. Os valores de Ct gerados foram exportados para posterior análise dos dados (determinação da expressão gênica).

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos utilizados para realização do teste de eficiência pela RT-qPCR.

Genes	Sequência (5'-3')	Espécie	Referência
<i>Catalase (CAT)</i>	F:GCAGTGCCTTTTTGGGTTAGT R:ACCAAACCACAACCTCTTCAGTG	<i>Oncorhynchus mykiss/ "Truta-arco-íris"</i>	García-Meilán et al., 2022
	F:TGATGTCACACAGGTGCGTA R:GTGGGCTCAGTGTGTTGAG	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fontagné et al., 2008
<i>Glutathione S-transferase (GST)/159pb</i>	F:TATTGTGGGCTAATGTGTAAGAT R: CCCTGAAGAGCTTTGTGCG	<i>Oncorhynchus mykiss/ "Truta-arco-íris"</i>	García-Meilán et al., 2022
	F:GGGAGTCTTTTACCACCGTTTC R: TCGCCAGCAGCATACTTGTT	<i>Daphnia magna;</i>	Wang et al., 2014
<i>Beta actina (β-actin)/ 189pb</i>	F:GGACTTTGAGCAGGAGATGG R:ATGATGGAGTTGTAGGTGGTCT	<i>Oncorhynchus mykiss/ "Truta-arco-íris"</i>	García-Meilán et al., 2022
	F:GCCCTCTTCCAGCCCTCATTCT R:TGGGGCAAGGGCGGTGATTT	<i>Daphnia magna</i>	Wang et al., 2014
<i>18S rRNA</i>	F:ACCACATCCAAGGAAGGCAG R:CACCAGACTTGCCCTCCAAT	<i>Neoarius graeffei isolate</i>	Depositadas no banco de dados genético dos genes (Genbank)
<i>28S rRNA</i>	F:TCCCTCCGAAGTTTCCCTCA R: AGGTTGAGACTCGTTTCGGC	<i>Arius felis</i>	Depositadas no banco de dados genético dos genes (Genbank)
<i>Citocromo b (Cyt B)</i>	F:TCCCCTTCCACCCCTACTTC R:GGGGGTTGGCAGAGGTAAAG	<i>Notarius graeffei</i>	Depositadas no banco de dados genético dos genes (Genbank)
<i>Prolil peptidase-isomerase I (PPIA)</i>	F:CATCCCAGGTTTCATGTGC R:CCGTTCAAGCCAGTCAGTGTT	salmão do Atlântico (<i>Salmo salar L.</i>),	Bower and Johnston (2009)

3.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os dados biométricos e também os de expressão gênica de *GST* e *CAT* obtidos dos peixes capturados nas duas áreas de estudos estão representados como média \pm desvio padrão. Os pressupostos de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Levene) foram testados nos dados abióticos, biométricos, nas alterações histológicas, na expressão gênica de genes endógenos - β -*actina*, *18S rRNA* e *28S rRNA* e nas atividades enzimáticas de *GST* e *CAT* para posterior aplicação da análise de variância (One – way ANOVA). Quando $p < 0,05$ foi considerado diferenças significativas entre as variáveis. Quando diferenças significativas foram identificadas, o teste de Tukey foi aplicado.

Os dados foram analisados no programa MatLab (Mathworks Laboratory) versão 2018, e a caixa de ferramentas PCA versão 1.5 (BALLABIO, 2015) foi usada para simulação de análise de componentes principais dos dados de atividade enzimática *CAT/GST/* versus expressão gênica de *GST* e *CAT* e atividade enzimática *CAT/GST/* versus histologia. O número ótimo de PCA a ser usado na análise foi estimado (KAISER, 1958).

4 RESULTADOS

4.1 VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA E OLIGOELEMENTOS E NÍVEIS DE HPAS EM AMOSTRAS DE SEDIMENTOS

Os parâmetros físico-químicos dos dois anos de coletas (2019 e 2021) estão apresentados na Tabela 2. Os resultados de temperatura, e Ph estão de acordo com os limites permitidos pela legislação CONAMA 357/2005, nos dois anos de estudo. Também em 2021 observou-se valores de salinidade acima dos permitidos pela resolução CONAMA em PG no período de estiagem para água salobra da classe 3 (Tabela 2). Comparando os dois anos de estudo notou-se que os parâmetros de salinidade e oxigênio dissolvidos estavam com valores mais alterados em 2021 em relação ao ano de 2019. Para os dados físico-químicos não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

Tabela 2. Variáveis físico-químicas da água nas duas áreas de estudo Porto Grande e Ilha dos Caranguejos em 2019 e 2021 em épocas diferentes do ano (Estiagem e chuvoso).

Parâmetros físico-químicos	Ano de 2019				CONAMA 357/2005 ^a
	IC	PG	IC	PG	
	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso	Estiagem	
Temperatura (°C)	28.7	28.2	28.2	30.3	28-32 °C
Salinidade (ppm)	13.3	14.2	15.3	15.5	0,5- 30‰
Ph	7.41	7.77	7.53	6.79	5-9
Oxigênio dissolvido O ₂ (mg/L)	6.1	6.3	5.7	5.8	>3mg/L
	Ano de 2021				
Temperatura (°C)	29.10	29.00	29.10	29.20	28-32 °C
Salinidade (ppm)	13.10	29.00	25.20	32.50	0,5- 30‰
Ph	7.46	7.18	7.34	6.64	5-9
Oxigênio dissolvido O ₂ (mg/L)	4.90	7.63	6.20	5.70	>3mg/L

Os dados dos oligoelementos de metais traços e HPAs estão representados na Tabela 3. As concentrações de oligoelementos nos sedimentos ocorreram na seguinte ordem de grandeza: Fe>Al>Mn>Sr>Cr>Ba>V>Zn>Ni>Cu>Pb>As>Cd>THg. Al, Mn e Fe apresentaram valores altos e com diferença significativa ($p<0,05$).

A presença de diferentes HPAs foi observada com concentrações variadas nos sedimentos entre os locais e estações analisadas (Tabela 3). Houve maior detecção de anéis HPAs 5–6 para PG acima dos níveis permitidos pela Agência Nacional do Meio Ambiente (CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2004) em todos os períodos de coletas do ano de 2019.

Tabela 3. Variáveis de oligoelementos e níveis de HPAs em amostras de sedimentos coletados em duas épocas (estiagem e chuvoso) do ano de 2019.

Elemento traços	Ilha dos Caranguejos		Porto Grande	
	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso	Estiagem
Hg	0.0260±0.0011	0.0314±0.0028	0.0292±0.0032	0.0305 ± 0.0035
Al	10076.31±41.75^{*a}	11949.47±818.33[*]	10252.33±739.50^{*b}	12365.58±2593.15[*]
As	6.05 ± 0.06	7.01 ± 0.52	5.60 ± 0.08	7.30 ± 0.10
Ba	21.95 ± 0.19	16.54 ± 0.57	15.83 ± 0.41	18.92 ± 1.66
Cd	0.19 ± 0.00	0.23 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Co	4.84 ± 0.04	3.49 ± 0.03	3.76 ± 0.12	3.90 ± 0.35
Cr	27.65 ± 0.51	24.46 ± 0.39	22.79 ± 0.64	26.74 ± 2.21
Cu	7.95 ± 0.09	7.50 ± 0.03	7.57 ± 0.16	8.14 ± 0.07
Fe	20611.10± 80.30[*]	21481.52±677.14[*]	19381.87± 877.96[*]	21764.62± 2016.63[*]
Mn	338.25 ± 0.86 [*]	308.63 ± 4.73 [*]	125.06 ± 6.25 [*]	301.10 ± 44.93 [*]
Ni	9.54 ± 0.11	7.40 ± 0.19	7.26 ± 0.20	8.12 ± 0.56
Pb	6.60 ± 0.13	5.06 ± 0.15	5.15 ± 0.13	5.74 ± 0.22
Sr	113.43 ± 0.79 [*]	363.81 ± 4.77 [*]	222.12 ± 6.59 [*]	281.32 ± 12.58 [*]
V	21.25 ± 0.04	21.46 ± 0.70	20.26 ± 0.74	23.57 ± 1.27
Zn	18.62 ± 0.11	13.88 ± 0.62	14.76 ± 0.22	16.27 ± 0.56

PAHs	Ilha dos Caranguejos		Porto Grande	
	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso	Estiagem
2–4-Ring				
2-Meth	5.65	<LQ	99.6	19.05
AceP	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
AceN	6.78	<LQ	<LQ	<LQ
Chri	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

DibenA	<LQ	<LQ	50.87	32.09
Phen	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Fluoran	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Fluore	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Naph	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Py	2.05	<LQ	<LQ	<LQ
BaA	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
5-6-Ring				
BaP	<LD	<LD	415.2	331.1
BbF	<LD	<LD	348.1	270.7
BghiP	<LD	<LD	329.0	303.4

Legenda.^{a, b} Indica diferenças significativas entre os locais ($p < 0,05$).^{*} Indica diferenças significativas entre as estações ($p < 0,05$).LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação.Os dados para elementos traço são expressos como média \pm desvio padrão. Os elementos traço acima dos limites máximos definidos pela Agência Brasileira do Meio Ambiente (CONAMA, 2004) são mostrados em negrito.Os HPAs acima dos limites máximos definidos pela Agência Brasileira do Meio Ambiente (CONAMA, 2004) são mostrados em negrito.

4.2 DADOS BIOMÉTRICOS

Os dados biométricos dos exemplares de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) estão representados na Tabela 4. No ano de 2019 os peixes da Ilha dos Caranguejos no período chuvoso (cIC) apresentaram médias maiores de peso e tamanho quando comparados com Porto Grande nos dois períodos do ano. Em 2021 os pesos e tamanhos dos peixes variaram, sendo que também em cIC no período chuvoso os peixes tiveram médias maiores de pesos e tamanhos, enquanto que em PG tanto no período chuvoso e de estiagem eles apresentaram valores altos de pesos e tamanhos.

Os peixes apresentaram médias maiores de peso para os peixes coletados em 2021 quando comparado com as médias dos peixes de 2019. Por outro lado, em 2019 os peixes de cIC apresentaram médias maiores de tamanhos. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) das médias de peso e tamanho nos dois anos de coletas e períodos do ano (chuvoso e estiagem).

Tabela 4. Dados biométricos de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) de duas áreas de estudo Ilha dos Caranguejos (IC) e Porto Grande (PG) em duas épocas (chuvosos e estiagem) dos anos de 2019 e 2021.

Biometria	Ano de 2019			
	IC		PG	
	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso	Estiagem
Peso total (g)	204.2± 18.41*	204.2 ± 105.44*	131.2 ± 25.77*	88.22 ± 23.86*
Comprimento total	28.8 ± 0.71*	11.63 ± 5.25*	25.45 ± 1.77*	22.27 ± 2.13*
Comprimento Padrão	24.39 ± 0.71	9.69 ± 1.18	20.65 ± 1.79	18.77 ± 1.67
Comprimento furcal	25.26 ± 0.68	10.09 ± 1.18	21.47 ± 1.74	19.27 ± 1.67
	Ano de 2021			
Peso total (g)	458.33 ± 136.94*	297.4 ± 127.84*	306.08 ± 127.84*	419.81 ± 55.42*
Comprimento total	19.69 ± 1.69*	17.35 ± 1.92*	12.00 ± 1.64*	18.78 ± 0.81*
Comprimento Padrão	15.92 ± 1.48	13.18 ± 1.51	13.72 ± 1.51	15.87 ± 0.82
Comprimento furcal	17.32 ± 1.95	15.17 ± 1.81	15.41 ± 1.67	16.82 ± 0.68

Legenda. *- Diferença significativa entre as amostras. IC – Ilha dos Caranguejos. PG- Porto Grande.

4.3 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE *S. herzbergii* (BLOCH, 1794).

Na tabela 5, os índices do órgão de brânquias e fígados dos peixes *S. herzbergii* (Bloch, 1794) estão representados. As principais alterações identificadas em brânquias foram: Hemorragia (BLE), aneurisma (ANR), congestão (CG), deslocamento epitelial (LD) (Figura 5A) - distúrbios circulatórios; necrose (NC) (Figura 5C), estreitamento lamelar (LN), degeneração do tecido (TD) e fusão lamelar (LF) -mudanças regressivas; e hiperplasia (HYP) (Figura 5B) -mudanças progressivas (Tabela 5).

O índice do órgão das alterações branquiais de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) (Tabela 5) foi mais alto para IC nas duas estações (chuvoso e estiagem) em 2019. Por outro lado, em 2021 PG apresentou índices altos de alteração na estação chuvosa em comparação com IC. Contudo, os valores dos índices das alterações branquiais foram maiores em 2019 do que em 2021.

Para o fígado as principais alterações identificadas foram: Hemorragia (BLE), fibrose (FB), esteatose (ST) -distúrbios circulatórios; degeneração tecidual (TD), vacuolização dos hepatócitos (VH) (Figura 5B), necrose (NC) (Figura 5C) – mudanças regressivas; e centro de melanomacróforo (MC) (Figura 5A), infiltração leucocitária (HI), células em diferenciação (DC) e material amorfo encapsulado (EAM) – respostas inflamatórias (Tabela 5). O índice do órgão das alterações hepáticas em fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) foram altos em PG nas duas estações (chuvosa e estiagem) para os dois anos de coletas (2019 e 2021). Em 2019 os exemplares de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) apresentaram maiores índices do que em 2021.

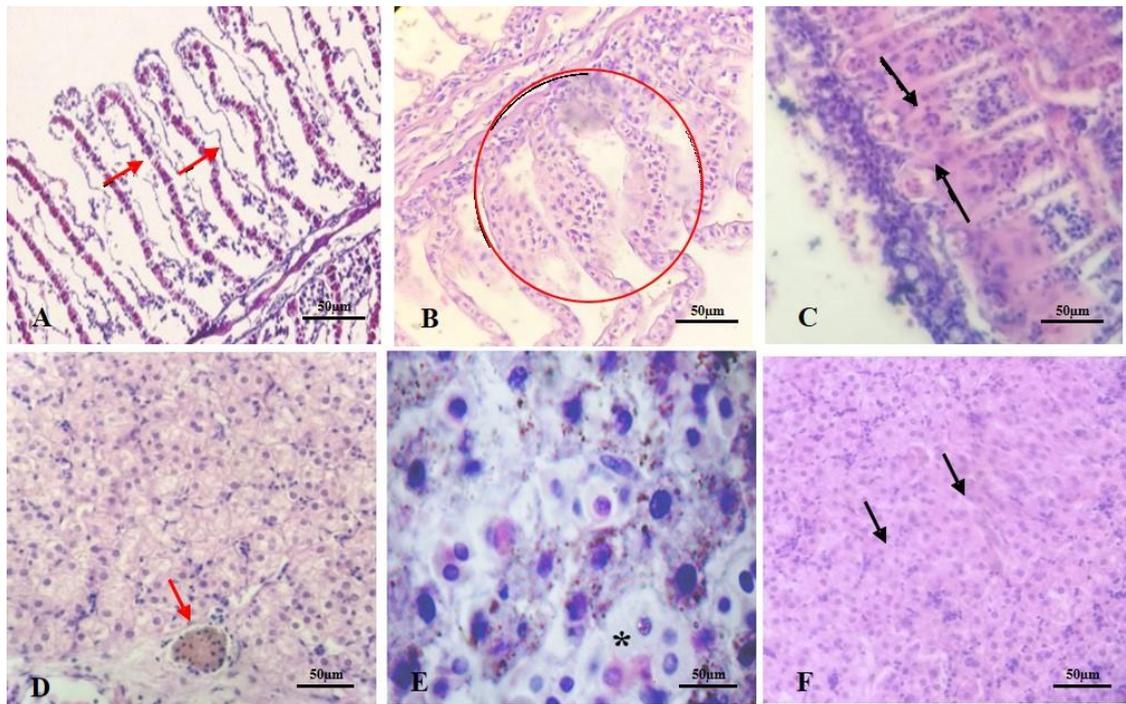
Tabela 5. Índice do órgão de brânquias e fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) de duas áreas de estudo Ilha dos Caranguejos (IC) e Porto Grande (PG) em duas épocas (chuvosos e estiagem) dos anos de 2019 e 2021.

Órgão	Padrões de reações	Tipo de alteração	Fator de importância (w)	Chuvoso (2019) (log)		Estiagem (2019) (log)	
				IC	PG	IC	PG
Brânquias	Distúrbios circulatórios	Hemorragia	1				
		Aneurisma	1				
		Congestão	1				
		Deslocamento epitelial	1				
	Mudanças regressivas	Necrose	3				
		Estreitamento lamellar	1	203	184	220	168
		Degeneração do tecido	2				
	Mudanças progressivas	Fusão lamelar	2				
		Hiperplasia	2				
		Distúrbios circulatórios	Hemorragia	1			
Fibrose			2				
Esteatose			2				
Mudanças regressivas		Degeneração tecidual	2				
		Vacuolização dos hepatócitos	2	40	86	70	80
		Necrose	3				
		Respostas inflamatórias	Centro de melanomacrófagos	2			

Órgão	Padrões de reações	Tipo de alteração	Fator de importância (w)	Chuvoso (2021) (log)		Estiagem (2021) (log)		
				IC	PG	IC	PG	
		Infiltração leucocitária	2					
		Células em diferenciação	1					
		Material amorfo encapsulado	2					
Brânquias	Distúrbios circulatórios	Hemorragia	1					
		Aneurisma	1					
		Congestão	1					
		Deslocamento epitelial	1					
	Mudanças regressivas	Necrose	3					
		Estreitamento lamellar	1					
		Degeneração do tecido	2	27	35	39	34	
		Fusão lamelar	2					
		Mudanças progressivas	Hiperplasia	2				
		Fígado	Distúrbios circulatórios	Hemorragia	1			
Fibrose	3							
Esteatose	2							
Mudanças regressivas	Vacuolização dos hepatócitos		2					
	Necrose		3					
	Degeneração tecidual		2					
	Centro de melanomacrófagos		2	9	12	16	19	
Respostas inflamatórias	Infiltração leucocitária		2					
	Células em diferenciação		1					
	Material amorfo encapsulado		2					

Legenda. IC – Ilha dos Caranguejos. PG – Porto Grande.

Figura 5. Alterações branquiais e hepáticas em *S. herzbergii* (Bloch, 1794) capturados nas duas áreas de estudos.



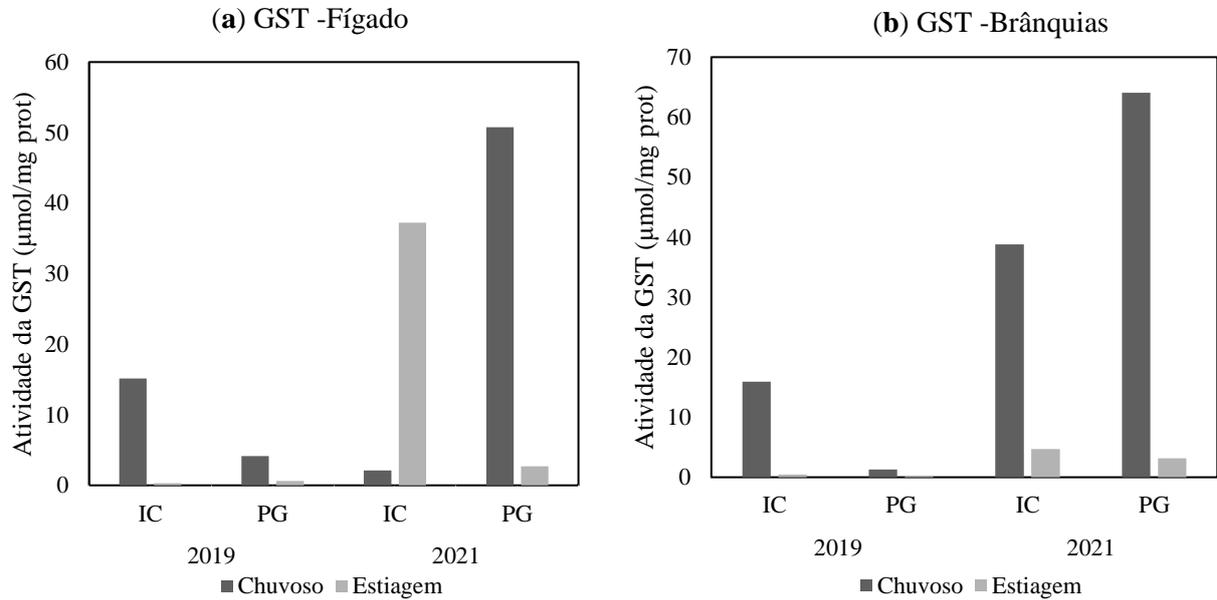
Legenda. (A) Deslocamento do epitélio (setas vermelhas finas), (B) hiperplasia (círculo vermelho) e (C) necrose (setas pretas grossas). (D) Centro do melanomacrófago (seta vermelha fina), (E) vacuolização (asterisco) (F), necrose (seta preta fina). Coloração Eosina e Hematoxilina.

4.4. BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS EM BRÂNQUIAS E FÍGADO DE *S. herzbergii* (BLOCH, 1794).

Nas Figuras 6a e 6b os resultados das atividades de GST em fígados e brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) estão representados. Como é possível observar, a atividade de GST em fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) mostrou média maior no período chuvoso para os dois anos de estudo 2019 e 2021, exceto em IC (2021) que apresentou médias altas para o período de estiagem (Figuras 6a). No entanto, em 2021 essa atividade foi maior quando comparada ao ano de 2019.

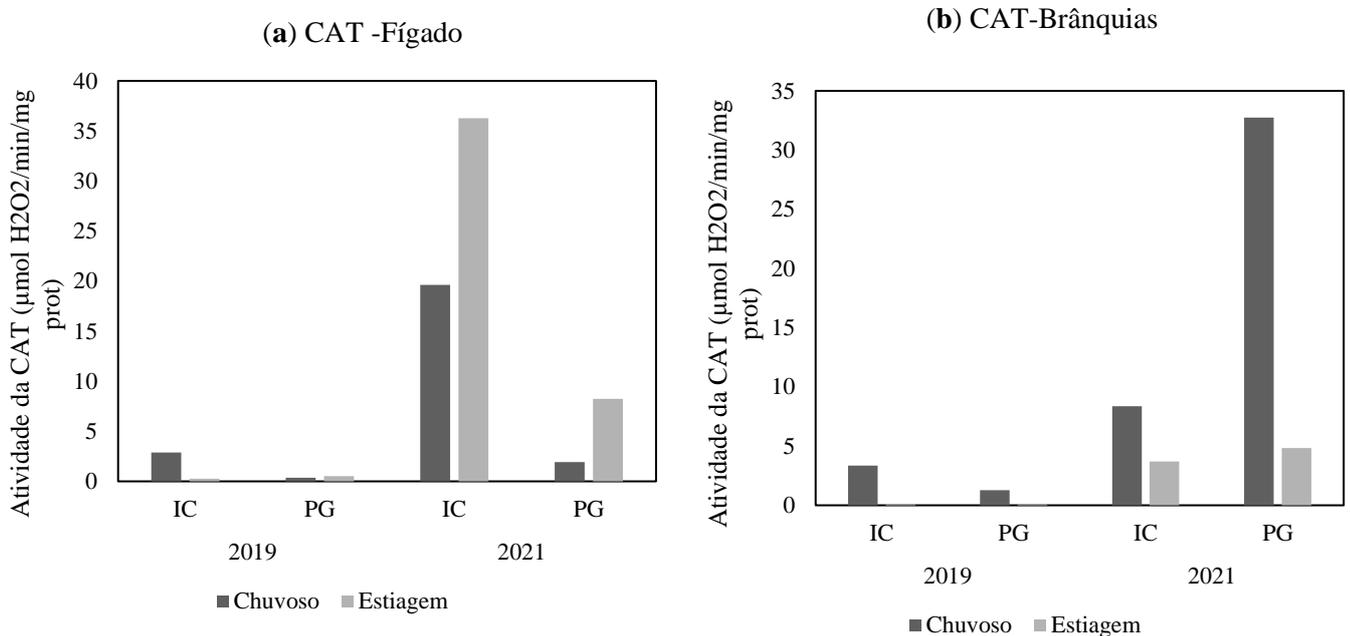
Contudo, os valores altos de GST em *S. herzbergii* (Bloch, 1794) para o ano de 2021 foram encontrados em PG. A atividade de GST em brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) teve o mesmo comportamento, apresentando médias maiores no período chuvoso (Figura 6b). Em 2021 os valores das médias da atividade de GST em brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) foram superiores em PG quando comparados a IC. Houve diferenças significativa ($p < 0,05$) entre os grupos somente para a atividade de GST para os dois anos (2019 e 2021) de estudo e entre períodos (chuvoso e estiagem) nas brânquias avaliadas dos peixes.

Figura 6. Atividade de GST em brânquias e fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) coletados em duas áreas na Baía de São Marcos (PG e IC) em dois anos 2019 e 2021 em duas épocas do ano (chuvoso e estiagem).



A CAT em fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com valores médios altos no período de estiagem, principalmente em IC no ano de 2021 (Figura 7a). Por outro lado, em brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) essa atividade foi maior na estação chuvosa para os dois anos de coletas, principalmente em PG em 2021 (Figura 7b).

Figura 7. Atividade de CAT em brânquias e fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) coletados em duas áreas na Baía de São Marcos (PG e IC) em dois anos 2019 e 2021 em duas épocas do ano (chuvoso e estiagem).



4.5 RELAÇÃO DOS MULTIBIOMARCADORES GST E CAT COM AS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS E BRANQUIAIS EM *S. herzbergii* (BLOCH, 1794)

Uma relação entre os biomarcadores enzimáticos e as alterações histológicas em brânquias e fígados de peixes foram avaliados por uma PCA (Figuras 8 e 9). A figura 8a (gráfico de scores - PC1 – 26,78% e PC2- 21,96%) e a figura 8b (gráfico de loadings - PC1 – 26,78% e PC2- 21,96%) representam as duas PCAs nos gráficos e explicam a semelhança de 48,74% dos dados de GST e CAT e as alterações branquiais para o ano de 2021. As amostras de Porto Grande chuvoso (cPG) são correspondentes aos biomarcadores enzimáticos GST e CAT em brânquias indicando que na maioria das amostras há valores elevados em PG no período chuvoso em 2021. Em relação aos biomarcadores histológicos em brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) a alteração aneurisma em brânquias (bANR) possui o valor mais elevado em amostras encontradas em Porto Grande estiagem (ePG). Também é possível verificar a relação da alteração bANR com a CAT e GST, pois as mesmas formam agrupamentos no período chuvoso em PG no ano de 2021. Na maioria das amostras de brânquias em Porto Grande estiagem (ePG) tem-se valores bem elevados de hiperplasia em brânquias (bHYP). O maior valor de fusão lamelar em brânquias (bLF) encontra-se em Ilha do Caranguejos chuvoso (cIC) para o ano de 2021 (Figura 8b). Pelo gráfico de Loadings (Figura 8b) podemos observar que o

índice de degeneração tecidual em brânquias (bTD) é contrário ao CAT significando que nas amostras, quanto maior o CAT menor o bTD e vice-versa. Algo parecido é evidenciando entre o bTD e GST, porém em menos amostras (Figura 8b).

A figura 8c (gráfico de scores - PC1 – 31,8% e PC2- 23,41%) e a figura 8d (gráfico de loadings - PC1 – 31,8% e PC2- 23,41%) representam as duas PCAs nos gráficos e explicam a semelhança de 55,21% dos dados de GST e CAT e as alterações branquiais para o ano de 2019. Ao avaliar os valores de GST e CAT com as alterações brânquias em 2019, observou-se que há valores elevados de CAT e GST em IC em uma amostra no período de chuva (Figura 8c e 8d). Para Ilha dos Caranguejos chuvoso (cIC) temos valores elevados de hemorragia em brânquias (bBLE), fusão lamelar em brânquias (bLF), aneurisma em brânquias (bANR) e degeneração tecidual em brânquias (bTD) (Figura 8c e 8d). As alterações necrose em brânquias (bNC) e estreitamento lamelar em brânquias (bLN), apresentam forte relação com Porto Grande chuvoso (cPG) (Figura 8c e 8d). As alterações de hiperplasia em brânquias (bHYP), degeneração tecidual em brânquias (bTD) e congestão em brânquias (CG) (Figura 8c e 8d), foram frequentes em Ilha dos Caranguejos chuvoso (eIC) (Figura 8c e 8d). Quando GST e CAT aumentam bLN, bNC e bTD diminuem e vice-versa (Figura 8d).

A figura 9a (gráfico de scores - PC1 – 28,97% e PC2- 19,12%) e a figura 9b (gráfico de loadings - PC1 – 28,97% e PC2- 19,12%) representam as duas PCAs nos gráficos e explicam a semelhança de 48,09% dos dados de GST e CAT e as alterações hepáticas para o ano de 2021. Para o ano de 2021, através do gráfico de loadings (b) fica evidente que nenhuma amostra apresentou a alteração material amorfo encapsulado (fEAM) em fígado de peixes. Existem maiores valores de CAT em eIC. As alterações degeneração tecidual em fígado (fTD) e esteatose em fígado (fST), são opostos significando que quando uma aumenta a outra diminui e vice-versa entre as áreas e períodos. A mesma análise é similar para CAT com infiltração leucocitária em fígado (fHI) e vacuolização dos hepatócitos em fígado (fVH) com necrose em fígado (fNC). As alterações fST e fHI são mais comuns nas amostras de Porto Grande no período chuvoso. A alteração fibrose em fígado (fFB) possui valores elevados em PG na estiagem.

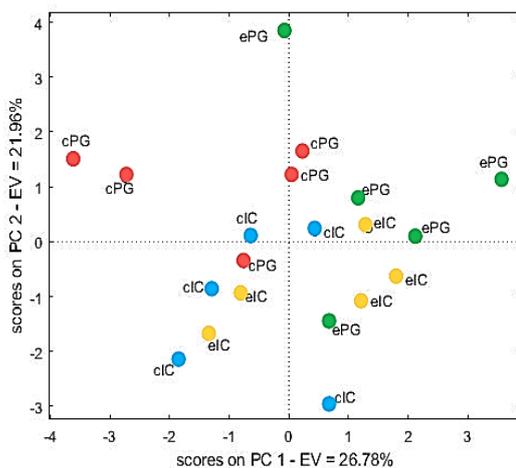
A figura 9c (gráfico de scores - PC1 – 28,57% e PC2- 19,85%) e a figura 9d (gráfico de loadings - PC1 – 28,57% e PC2- 19,85%) representam as duas PCAs nos gráficos e explicam a semelhança de 48,42% dos dados de GST e CAT e as alterações hepáticas para o ano de 2019. CAT e GST possuem valores elevados em uma amostra de IC no período de chuvoso. As alterações fTD e células em diferenciação em fígado (fDC) não foram detectados em 2019. As alterações fNC, fHI e fEAM possuem altos valores em ePG. No período de chuvoso, em PG, há valores elevados de hemorragia em fígado (fBLE). Quando centro de melanomacróforo em

fígado (fMC) aumenta, fHI e fEAM diminuem e vice-versa. Ademais, quando CAT e GST aumentam, fBLE diminui e vice-versa.

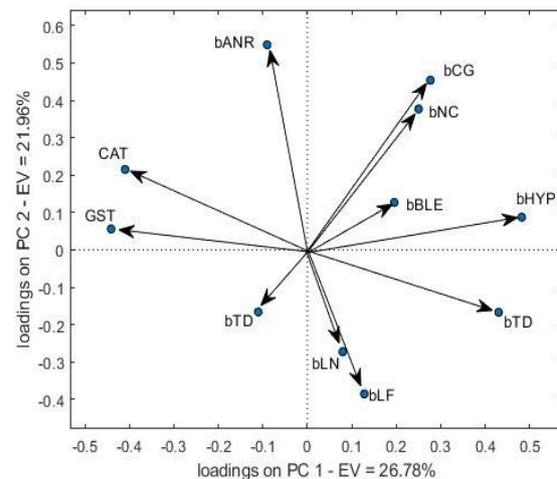
Figura 8. Análise de componentes principais (PCAs) das alterações enzimáticas GST e CAT com as alterações histológicas em brânquias de *S. herzegii* (Bloch, 1794) capturados em dois períodos (chuvoso e estiagem) dos anos de 2019 e 2021.

Brânquias

Ano 2021

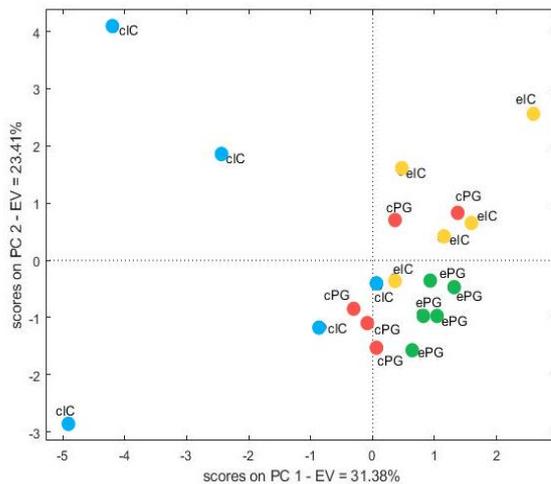


(a)

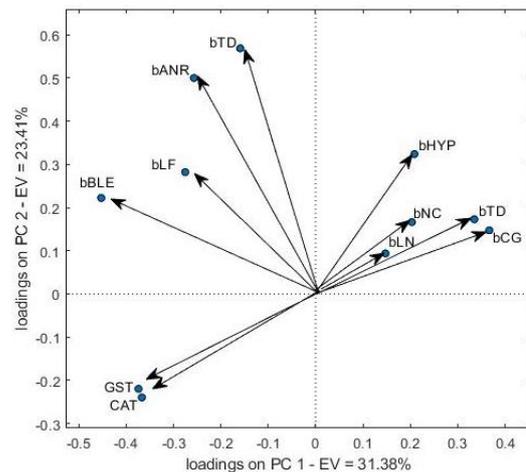


(b)

Ano 2019



(c)



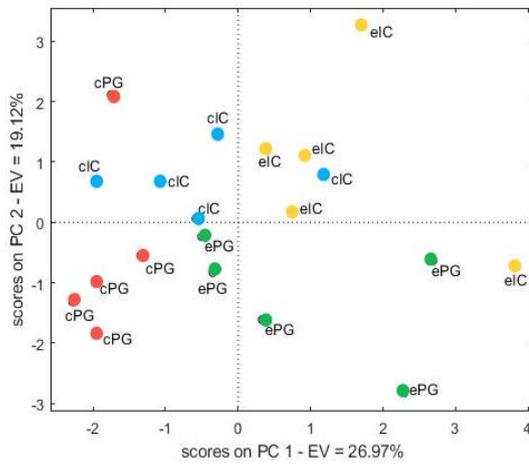
(d)

Legenda. cIC – Ilha dos Caranguejos no período chuvoso. eIC - Ilha dos Caranguejos no período de estiagem. cPG – Porto Grande no período chuvoso. ePG – Porto Grande no período estiagem. GST – Enzima glutatona S-transferase. CAT – Enzima catalase. bBLE - Hemorragia – bLF – Fusão lamelar. bANR – Aneurisma. bTD – Degeneração tecidual. bHYP- Hiperplasia. bNC – Necrose. bLN- Estreitamento Lamelar bCG – Congestão.

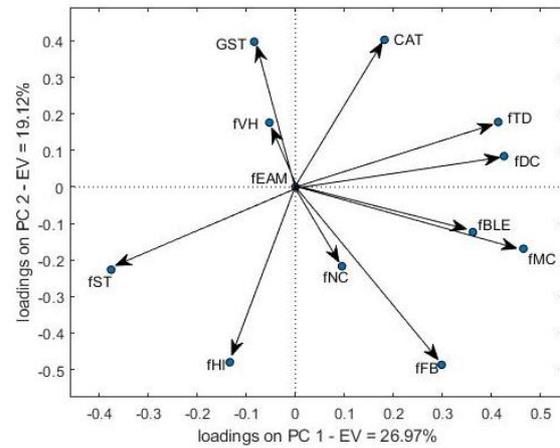
Figura 9. Análise de componentes principais (PCAs) das alterações enzimáticas GST e CAT com as alterações histológicas em fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) capturados em dois períodos (chuvoso e estiagem) dos anos de 2019 e 2021.

Fígado

Ano 2021

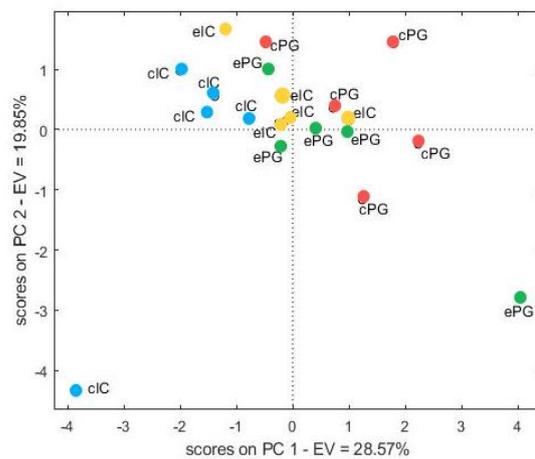


(a)

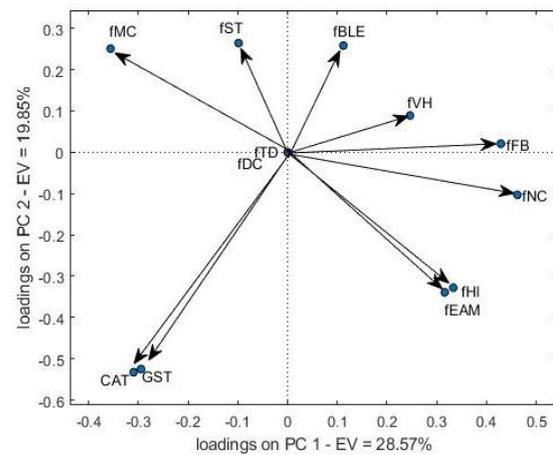


(b)

Ano 2019



(c)



(d)

Legenda. cIC – Ilha dos Caranguejos no período chuvoso. eIC - Ilha dos Caranguejos no período de estiagem. cPG – Porto Grande no período chuvoso. ePG – Porto Grande no período estiagem. GST – Enzima glutiona S-transferase. CAT – Enzima catalase. fMC – Centro de melanomacrófago. fST- Esteatose. fBLE- Hemorragia. fVH- Vacuolização dos hepatócitos. fFB- Frobose. fNC – Necrose. fHYP – Hiperplasia. fEAM – Material Amorfo Encapsulado. fDC - Células em Diferenciação – fTD – Degeneração Tecidual.

4.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *GST* E *CAT* EM FÍGADO E BRÂNQUIAS DE *S. herzbergii* (BLOCH, 1794)

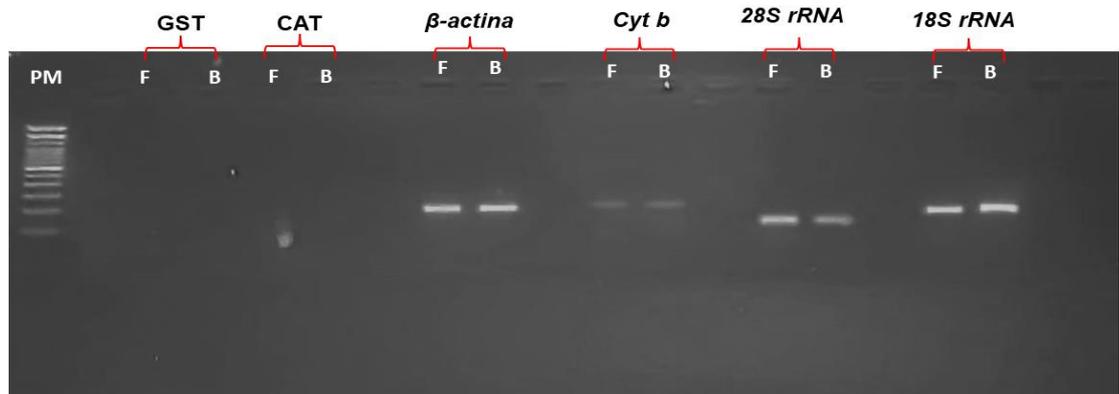
4.6.1 Análise de expressão gênica de *Citocromo b*, *28S rRNA* e *18S rRNA*, β -*actina* e *PPIA* em fígado e brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794)

Os testes realizados para avaliar a eficiência do conjunto dos genes endógenos (β -*actina*, *Citocromo b*, *28S rRNA*, *18S rRNA* e *PPIA*) nas amostras de fígado e brânquias dos peixes selecionados, utilizando o corante fluorescente SYBR, demonstrou que curvas de amplificação foram formadas apenas para os genes endógenos β -*actina*, *28S rRNA* e *18S rRNA*. As curvas de *melt* dos genes *PPIA* e *Citocromo b* não amplificaram, apenas curva com picos inespecíficos foram gerados, atestando a não expressão desses genes no teste de eficiência. A PCR convencional dos genes endógenos β -*actina*, *28S rRNA* e *18S rRNA*, apresentou uma única banda para cada gene, além disso, não ocorreram dímeros ou bandas amplificadas não específicas (Figura 10), o que indicou que os primers projetados eram apropriados para qRT-PCR.

4.6.1 Análise de expressão gênica de *GST* e *CAT* em fígado e brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794)

Teste de eficiência para os genes alvos *GST* e *CAT* nas amostras de fígado e brânquias dos peixes avaliados, utilizando o corante fluorescente SYBR demonstrou a não amplificação das cruvas de *melt*. Para a confirmação dos primers dos genes alvos *GST* e *CAT*, não houve amplificação, indicando a não especificidade deste conjunto de genes para a espécie estudada (Figura 10).

Figura 10. Gel de eletroforese em agarose a 1,5%, corado com Sybr Safe, representativo da amplificação dos genes *CAT* e *GST* e os genes endógenos β -actina, *Cyt b*, *28S rRNA* e *18S rRNA*. PM= Peso Molecular; F=fígado e B=brânquia.



4.6.2 Dados estatístico das médias e desvios padrão de Ct – Threshold cycles dos genes endógenos β -actina, *28S rRNA* e *18S rRNA* em fígado e brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794)

As médias e desvios-padrão de Ct dos genes endógenos β -actina, *28S rRNA* e *18S rRNA* em fígado e brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) estão representados na Tabela 6. Nas brânquias o gene β -actina apresentou a maior média de Ct nas brânquias dos peixes em comparação com os genes endógenos *28S rRNA* e *18S rRNA* (Tabela). A maior média de Ct de β -actina em brânquias foi registrado no período chuvoso em IC quando comparado com o período de estiagem (Tabela). Os genes endógenos *28S rRNA* e *18S rRNA* também apresentaram médias de Cts com valores altos em IC no período chuvoso em comparação com o período de estiagem (Tabela 6). Quando comparado os maiores valores das medias dos genes endógenos entre as áreas de estudos, observou-se que os genes β -actina e *28S rRNA* apresentaram médias de CTs alta em PG. Enquanto que a maior média de Ct para o gene *18S rRNA* foi registrado em IC no período chuvoso (Tabela 6). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias das variáveis neste estudo.

Em fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) o gene β -actina também apresentou os maiores valores médios de Cts nas duas áreas de estudo e nos dois períodos do ano – chuvoso e estiagem (Tabela 9) quando comparado com os demais genes endógenos *28S rRNA* e *18S rRNA*. As maiores médias de β -actina foram registrados em IC e PG principalmente no período de estiagem, tendo destaque o maior valor médio de Cts para esse gene na região potencialmente impactada (Tabela 6). Os genes *28S rRNA* e *18S rRNA* também apresentaram médias altas de

Cts no período de estiagem nas duas áreas de estudos, contudo, os maiores valores de Cts desses genes foram registrados na região potencialmente impactada. Além disso, os genes 28S rRNA e 18S rRNA apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos (chuvoso e estiagem) em IC. O teste estatístico comparando os valores de Ct para as duas áreas de estudo não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$).

Comparando as médias de expressão gênica dos três genes endógenos entre os dois órgãos avaliados, mostrou que em brânquias os valores médios de Ct foram altos quando comparados com os valores de Ct em fígados (Tabela). O gene endógeno 18S rRNA se comportou como o gene mais estável em estudos utilizando tecidos de brânquias e fígados de peixes na expressão gênica. E o β -actina como o gene endógeno mais instável para os dois órgãos (Tabela 6).

Tabela 6. Média e Desvio-Padrão de Cts de genes endógenos β -actina, 28S rRNA e 18S rRNA em fígado e brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794).

Genes endógenos em brânquias						
Gene	IC			PG		
	Chuvoso	Estiagem	Valor de (p)	Chuvoso	Estiagem	Valor de (p)
<i>β-actina</i>	22.28±4.18	17.04±0.91	0.07	22.41±5.39	22.91±4.26	0.90
<i>28S Rrna</i>	16.25±5.99	9.87±0.54	0.10	16.41±5.81	15.79±2.32	0.86
<i>18S Rrna</i>	14.60±6.32	7.44±0.60	0.09	13.65±5.17	13.19±1.85	0.89
Genes endógenos em fígado						
<i>β-actina</i>	21.69±2.16	22.99±1.17	0.18	22.14±4.13	24.09±3.91	0.60
<i>28S Rrna</i>	12.49±3.49	15.40±3.62	0.009^a	12.78±3.69	15.80±4.36	0.44
<i>18S Rrna</i>	9.21±3.55	12.31±3.77	0.01^a	10.19±3.99	12.36±4.61	0.59

Legenda: Números em negrito diferença significativa $p < 0,05$. Letra **a.** representa diferença significativa entre a sazonalidade (chuvoso e estiagem). IC-Ilha dos Caranguejos, PG- Porto Grande.

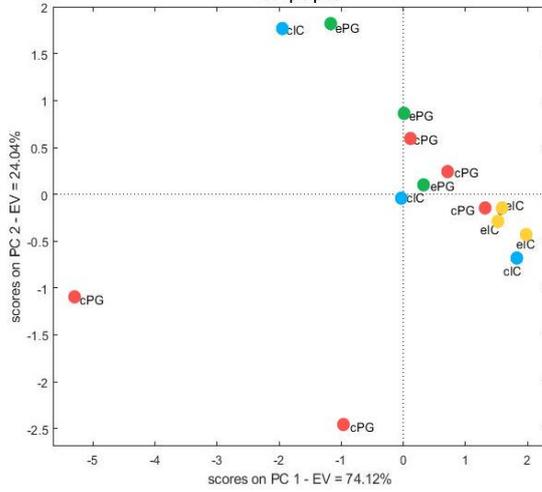
4.6.2 Correlação dos valores médios de Cts – Threshold cycles dos genes endógenos β -actina, 28S rRNA e 18S rRNA com as atividades enzimáticas de GST e CAT em fígado e brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794)

A explicação dos dados para as amostras de brânquias dos valores médios de Cts, dos genes endógenos nas duas PCAs (gráfico de scores - PC1 – 74,12% e PC2- 24,04% (Figura 11a) e gráfico de loadings - PC1 – 74,12% e PC2- 24,04% (Figura 11b) é de aproximadamente 98% cada. Em amostras de brânquias, registrou-se altos valores de atividades enzimáticas de CAT e GST no período chuvoso em PG (Figura 11 a e b). Valores elevados de Cts dos genes endógenos 28S rRNA e 18S rRNA foram registrados em IC no período chuvoso (Figura 11 a e b). Amostras com valores altos de Cts para o gene β -actina foram encontrados em PG na estiagem (Figura 11 a e b). Na Figura 11b a PCA de loadings não apresentou formação de agrupamentos e também não apresentou relação entre as atividades de GST e CAT com os genes endógenos (β -actina, 28S rRNA e 18S rRNA).

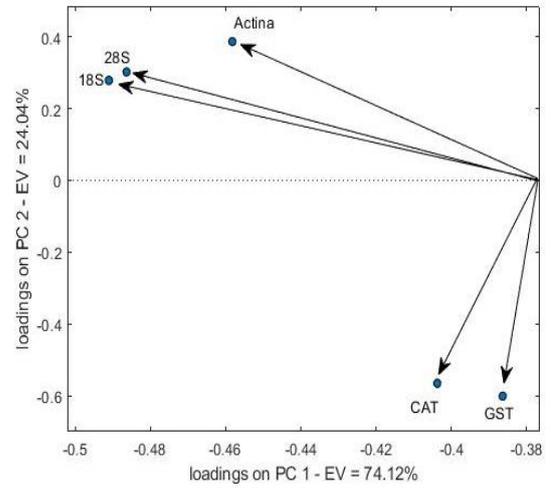
Para duas PCAs os valores médios de Cts no fígado, demonstraram aproximadamente 93% de explicação dos dados, dos genes endógenos (gráfico de scores - PC1 – 64,45% e PC2- 28,49% (Figura 11c) e gráfico de loadings - PC1 – 64,45% e PC2- 28,49% (Figura 11d). (Figura 11c e 11d). No fígado, valores altos de atividades enzimáticas CAT, GST são encontradas em amostras de IC na estiagem. Para os valores médios de Cts dos genes endógenos 28S rRNA e 18S rRNA e β -actina foram encontrados em amostras de IC e PG na estiagem e IC chuvoso. Na Figura 11d a PCA de loadings não apresentou formação de agrupamentos e também não apresentou relação entre as atividades de GST e CAT com os genes endógenos (β -actina, 28S rRNA e 18S rRNA).

Figura 11. Análise de componentes principais (PCAs) das alterações enzimáticas GST e CAT com o valor médio de CTs dos genes endógenos em brânquias e fígados de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) capturados em dois períodos (chuvoso e estiagem) dos anos de 2021.

Brânquias

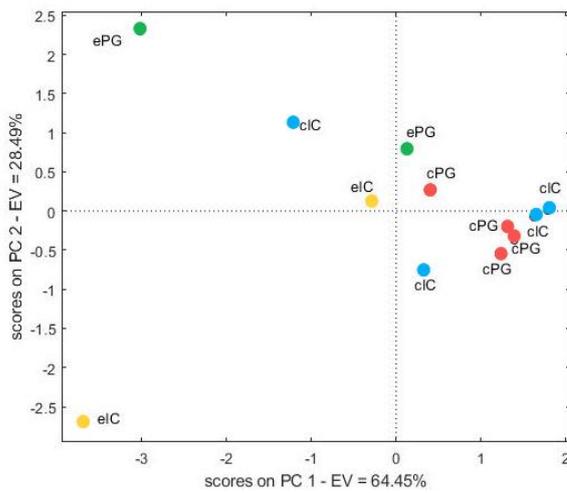


(a)

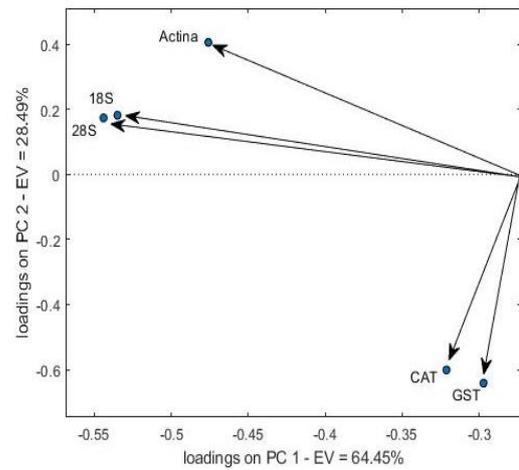


(b)

Fígado



(c)



(d)

5. DISCUSSÃO

Entre os parâmetros físico-químicos da água registrados em duas áreas da Baía de São Marcos, apenas a salinidade na área de Porto Grande, no período seco em 2021, estava em desacordo com os padrões da atual legislação ambiental (para águas salobras classe 3, CONAMA 357/2005). A salinidade elevada pode afetar a saúde dos peixes, gerando desde alterações no equilíbrio osmótico até estresse fisiológico e metabólico (CHRISTENSEN *et al.*, 2019), resultando na produção de um grande número de espécies reativas de oxigênio. Esse distúrbio afeta a capacidade antioxidante, o que leva ao estresse oxidativo, influenciando negativamente na saúde dos animais (JIANG *et al.*, 2022).

O elevado valor de salinidade pode ser devido a diminuição significativa do volume de água devido à falta de chuvas, típica deste período. Cavalcanti *et al.* (2018) também encontraram situação semelhante durante o período seco na mesma região e associaram-na à diminuição da vazão dos rios (dos rios Mearim e Pindaré) e à influência das águas marinhas na Baía de São Marcos, devido à a diminuição da proporção de aspecto (área onde a água doce e a água salgada se misturam) determinada pela variação da superfície livre e pelo movimento das ondas gravitacionais superficiais. Macedo *et al.* (2024) registraram valores de temperatura, salinidade e pH em duas localidades do Complexo Estuarino de São Marcos, dentro dos limites regulatórios, com exceção dos níveis de oxigênio dissolvido, que na localidade de Porto Grande, principalmente no período seco, ficaram abaixo do padrão da legislação ambiental. Os dados de Macedo e colaboradores para salinidade e oxigênio dissolvido diferenciam dos nossos achados, pois a salinidade em 2021 foi alta em PG no período de estiagem e os dados de oxigênio dissolvido foram altos em PG e IC no período chuvoso e estiagem nos dois anos de coletas.

Oxigênio dissolvido é essencial para processos fisiológicos vitais em peixes, também servindo como um importante indicador de qualidade ambiental (YU *et al.*, 2023). Alta entrada de contaminantes industriais e águas residuais domésticas podem levar a desequilíbrios nos parâmetros hidrológicos, especialmente aqueles relacionados a diminuição do oxigênio dissolvido (SANTOS *et al.*, 2009). O oxigênio dissolvido é considerado um dos principais parâmetros que caracteriza os efeitos da poluição da água por efluentes e contaminantes (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Pinheiro-Sousa *et al.* (2022), ao avaliar *S. herzbergii* (Bloch, 1794), e Jesus *et al.* (2020), avaliando os invertebrados *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), determinou as concentrações de Al, As, Cd, Fe, Mn, Pb, Ni e Hg em sedimentos coletados na Baía de São Marcos. Níveis dos elementos foram encontrados acima dos limites estabelecidos por lei

(CONAMA, 2004), situação também observada no presente estudo e relatado por Carvalho Neta et al. (2012), Carvalho Neta et al. (2010) e Castro et al. (2018). Sedimentos são locais de armazenamento de longo prazo para metais, e seu perfil é um importante indicador de qualidade ambiental (QU *et al.*, 2017).

A maioria dos oligoelementos nos sedimentos investigados nesta pesquisa estavam de acordo com os níveis recomendados pela legislação brasileira normas regulatórias. No entanto, alguns oligoelementos (Al, Fe, Mn e Sr) mostraram diferenças entre os locais amostrados. Estudos anteriores em mesma região relatam a presença de oligoelementos em vários ambientes matrizes (MACEDO *et al.*, 2024; PINHEIRO SOUSA *et al.*, 2021). Estudos de Silva Montes *et al.* (2023) avaliou 352 exemplares de *S. herzbergi* (Bloch, 1794) nos canais de maré de Irinema e Buenos Aires (Baía de São Marcos) e no estuário do Caeté (Pará) e encontrou um fator de condição de baixo valor, com as maiores concentrações de Al, Cd e Hg no músculo desta espécie no primeiro local de estudo. Enquanto estudos de Nunes *et al.* (2020) encontraram maior concentração de Fe nos músculos de peixes capturados na Baía de São Marcos e maior concentração de Al no sedimento ($46.645,4 \pm 8.815,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) do que no presente estudo. Oliveira *et al.* (2023) registraram concentrações de zinco e manganês nas águas, ao longo da mesma Baía, acima do valor estabelecido pela corrente Legislação brasileira. A presença de altos níveis de metais no ambiente estuarino pode amplificar os efeitos tóxicos sobre os organismos, pois eles interferem nos processos de osmorregulação e também podem afetar negativamente nas trocas gasosas (NUNES *et al.*, 2020).

No presente estudo, os peixes em IC no ano de 2019 tiveram pesos e tamanhos maiores em ambas estações do que os espécimes PG. Por outro lado, em 2021 as médias pesos e tamanhos variaram, pois notou-se valores maiores tanto em IC como em PG. Resultados semelhantes foram descritos por Soares *et al.* (2020) para os mesmos locais: os peixes IC eram mais pesados que os peixes PG. Os autores atribuíram esses resultados ao fato de que peixes de o IC provavelmente apresentavam condições de alimentação mais adequadas. Os achados vão ao encontro dos de Carvalho-Neta *et al.* (2012) e Viana *et al.* (2021).

IC faz parte de uma Área de Proteção Ambiental, sofrendo menos impacto do que o local do porto. Segundo Soares *et al.* (2020), exposição de organismos a contaminantes e altas concentrações de poluentes podem comprometer aspectos vitais biológicos, bioquímicos, fisiológicos, e sistemas comportamentais, levando ao redirecionamento de energia para processos de desintoxicação e regulação (SOUSA *et al.*, 2013), inferindo assim que as condições ambientais podem influenciar características de desenvolvimento dos indivíduos, como o peso e o tamanho dos peixes (PINHEIRO-SOUSA *et al.*, 2022).

As alterações observadas no presente estudo foram também descritas por Castro *et al.* (2018) em um estudo com a mesma espécie que ocorrem na Baía de São Marcos. Os autores descobriram que o deslocamento epitelial foi a alteração mais frequente, também descrita da mesma forma por Sousa *et al.* (2013) juntamente com fusão das lamelas secundárias. Segundo Soares *et al.* (2020) também identificaram fusão lamelar e deslocamento epitelial nos tecidos de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) amostrados na Baía de São Marcos em 2018 e 2019. A fusão lamelar é um tipo de lesão que ocorre como um mecanismo de defesa contra o contato entre contaminantes e o epitélio lamelar; no entanto, essas alterações também reduzem a superfície respiratória, o que pode resultar em morte dos indivíduos pela reduzida capacidade de realização das trocas gasosas (PEREIRA *et al.*, 2020).

Segundo Pereira *et al.* (2020), deslocamento epitelial é um dos biomarcadores mais comuns observados nas brânquias de peixes expostos à toxicidade aguda. Os autores argumentaram ainda que a fusão de lamelas secundárias também é frequentemente encontrada em organismos afetados por contaminantes. Os peixes estão diretamente associados ao ambiente aquoso e mudanças no ecossistema são rapidamente refletidos em alterações fisiológicas. A análise das lesões branquiais pode demonstrar o grau de estresse ao qual os organismos estão submetidos (SOUSA *et al.*, 2013). Deslocamento epitelial, fusão de lamelas secundárias, aneurisma e hiperplasia, as alterações mais comuns observadas em brânquias no presente estudo, também foram relatados por Reis *et al.* (2009) e Pinheiro-Sousa *et al.* (2021). Esses estudos demonstram a importância de identificar lesões branquiais como estratégia para avaliar a qualidade da água e saúde da espécie. Brânquias são importantes indicadores da qualidade de água devido à sua sensibilidade às condições da água e contato direto com o ambiente impactado.

A frequência das alterações histológicas nas brânquias e fígado de espécimes de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) coletados nas áreas de estudo indica que esses organismos estão sob estresse causada por contaminação por metais e HPAs. Avaliação histológica de amostras de fígado de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) revelou uma alta frequência de centros melanomacrófagos, necrose, vacuolização de hepatócitos e fibrose na amostra do estudo. Este resultado está de acordo com os achados de Carvalho-Neta *et al.* (2014), que afirmaram que centros de melanomacrófagos são exemplos de mecanismos de defesa.

Segundo Bombonato *et al.* (2007), centros de melanomacrófagos atuam como forma de defesa natural em peixes. Santos Filho *et al.* (2014), ao estudar biomarcadores histológicos em peixes ósseos, observaram a presença destas estruturas de defesa. O fígado é um órgão importante, pois desempenha funções vitais, relacionadas ao metabolismo basal e participa de desintoxicação, bioativação, acumulação e excreção de xenobióticos (FIGUEIREDO-

FERNANDES *et al.*, 2006). Portanto, o órgão é de grande interesse para investigar a exposição de peixes a contaminantes (BERNET *et al.*, 1999).

Alterações como necrose aparecem após perda irrevogável da função celular (BERNET *et al.*, 1999). Essas patologias constituem uma resposta comum dos peixes em ambientes aquáticos degradados (SOARES *et al.*, 2020).

As brânquias e o fígado dos peixes capturados em PG apresentaram danos reversíveis e irreversíveis. Alterações descritas como moderadas a leve podem permitir a regeneração e recuperação da função da estrutura afetada, se houver uma diminuição na exposição a xenobióticos presentes no meio ambiente (BERNET *et al.*, 1999).

Alterações histopatológicas em tecidos de peixes são biomarcadores de exposição a estressores ambientais, como um ou mais agentes tóxicos (BERNET *et al.*, 1999). O alto tráfego de número de navios no complexo portuário provavelmente está causando um aumento em substâncias tóxicas que podem estar associadas à indução de lesões nas brânquias e no fígado em peixes com consequente danos à saúde aquática (CASTRO *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2020).

A CAT funciona na célula para eliminar espécies reativas de oxigênio (SANTANA *et al.*, 2018). A respeito de atividades enzimáticas neste estudo, CAT nas brânquias de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) não mostram uma diferença significativa, embora tenham apresentado um valor médio superior desta atividade na época das chuvas em ambas as áreas. Nos fígados dos peixes analisados observou-se que os maiores valores de CAT foram registrados principalmente no IC no período seco.

Enzimas antioxidantes são consideradas de primeira linha de defesa celular contra danos oxidativos (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Bioquimicamente, as células tentam eliminar radicais livres formados durante a metabolização de produtos químicos usando enzimas específicas, como CAT e GST (DI GIULIO *et al.*, 1989).

As altas atividades de GST observadas em diferentes épocas do ano podem ter sido uma resposta fisiológica para prevenir dano lipídico. Por outro lado, segundo Freire *et al.* (2015), estas diferenças podem ser simplesmente sazonais. No entanto, o aumento da indução de GST em locais contaminados sugerem que este tipo de enzima biotransformadora responde fortemente à contaminação ambiental (SANTANA *et al.*, 2018).

O GST também apresentou alta atividade no período chuvoso em PG. Estes dados corroboram com os descritos por Torres *et al.* (2023), para esta mesma espécie e região. Este resultado pode ser consequência da maior interação de peixes com substâncias contaminantes provenientes do transporte promovida pelo aumento do fluxo de água nesse período.

Em estudo realizado sobre a qualidade das águas pluviais em Natal (Rio Grande do Norte) Righetto *et al.* (2017) descobriram que o escoamento superficial tem grande potencial para poluir corpos d'água ao encontrar altas taxas de concentração de poluentes em diferentes intensidades de chuva. GST apresentou maiores valores em brânquias e fígado de peixes em PG na estação chuvosa para o ano de 2021, por outro lado, em 2019 houve um pico de atividade de GST na estação seca em IC para os dados de fígado, ou seja, esses dados indicam que a sazonalidade pode estar diretamente influenciando as respostas biológicas nesses organismos, independentemente da área de coleta e estação do ano.

Neste estudo ao relacionar as atividades enzimáticas com as alterações branquiais dos peixes coletados em períodos distintos (chuvoso e estiagem) entre dois anos (2019 e 2021) de estudo, observou-se respostas biológicas distintas de GST e CAT nas brânquias entre os anos e áreas de estudo (conforme demonstrado nas PCAs). Para o ano de 2019, GST e CAT em brânquias de peixes apresentou valores altos em IC no período chuvoso, por outro lado essas atividades enzimáticas foram diferentes para o ano de 2021 que registrou valores altos em PG, também no período chuvoso. Esses dados demonstraram que a sazonalidade não interferiu em nossos achados, tendo em vista que as alterações enzimáticas apresentaram relação na mesma época do ano (chuvoso) independente da área de estudo. Em 2019 Magalhães *et al.* (2022) ao avaliarem os impactos causados pelo derramamento de óleo ocorrido na costa nordeste do Brasil, detectaram a presença de HPAs (principalmente naftalenos) em amostras de tecidos comestíveis de vários organismos (peixes, crustáceos e moluscos). Esse evento que atingiu vários estados da costa do Brasil (Maranhão a Rio de Janeiro) provavelmente pode ter influenciado nos resultados encontrados para as duas áreas de estudo em 2019.

No que se refere à presença de hidrocarbonetos no ambiente marinho, observou-se que esses compostos atuam como estressores significativos, devido à sua natureza persistente e bioacumulativa, podendo provocar alterações adversas em processos biológicos essenciais, levando a consequências graves para a saúde das espécies expostas e, potencialmente, para os ecossistemas como um todo (Lima *et al.*, 2024). Os HPAs podem ser introduzidos no ambiente marinho por diversas vias, como a deposição atmosférica, escoamento superficial, emissários domésticos e industriais, além de derramamentos diretos de petróleo ou derivados (Maioli *et al.*, 2010; Azevedo Neto *et al.*, 2022).

Neste estudo a expressão gênica dos genes alvo *GST* e *CAT* em brânquias e fígados de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) comportou-se de forma negativa, não ocorrendo a expressão nos tecidos de brânquias e fígados de peixes, indicando que os genes em questão são muito conservados para esta espécie e/ou o conjunto de *primers* desenhados para a pesquisa de espécies diferentes e de espécies da mesma família não corresponderam aos resultados

esperados por não serem específicos para a espécie; outra hipótese para esse resultado pode ser o fato de que a expressão não foi registrada porque não teve alta atividade dessas enzimas. Não foram encontrados os *primers* específicos dos genes alvos (*GST* e *CAT*) da espécie em estudo para se ter um diagnóstico mais preciso dos resultados. Isto pode também estar relacionado com a não amplificação dos genes alvos, uma vez que, *primers* específicos aumentam a chance de responder melhor a expressão dos genes. Isso se deve ao fato, de não estar ainda disponível nos bancos de dados genômicos o sequenciamento genético da espécie. A abordagem desta pesquisa ainda é inicial, embora existam registros de genes endógenos no banco de dados (NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para indivíduos da mesma família Ariidae (*Neoarius graeffei* isolate, *Arius felis* e *Notarius graeffei*), conforme foi utilizado neste trabalho.

Embora não existam estudos da expressão gênica dos genes alvos *GST* e *CAT* para a espécie *S. herzbergii* (Bloch, 1794) que possam servir de base para discutir os achados desta pesquisa, na qual não foi possível verificar a expressão gênica dos genes investigados, estudos com outras espécies (*Oreochromis niloticus*, *Tilapia zillii* e *Pelteobagrus fulvidraco*) avaliaram a expressão dos genes relacionados com o estresse oxidativo *GST* e *CAT* em condições experimentais controladas utilizando metais pesados em ensaios ecotoxicológicos em diferentes tecidos (ABDEL-GAWAD *et al.*, 2020; KU *et al.*, 2014; SADDICK *et al.*, 2017).

A presente pesquisa consistiu na primeira descrição e avaliação de genes endógenos (*Housekeeping genes*) para *S. herzbergii* (Bloch, 1794) no Brasil. Neste estudo, observou-se que altos níveis de expressão gênica, sobretudo para o gene endógeno *18S rRNA*, o torna um excelente candidato para utilização em pesquisas futuras, uma vez que este gene desempenha um papel crucial nas células eucarióticas, sendo um componente ribossômico importante na síntese de proteína e na tradução e ligação dos aminoácidos nas células. O gene endógeno *18S rRNA* é frequentemente usado como um gene de referência em experimentos de quantificação de RNA, como RT-qPCR, devido à sua expressão estável e abundante nas células (JOHANSSON *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2022). Os genes endógenos expressos neste estudo demonstraram nos tecidos de brânquias e fígado que os peixes de PG apresentaram medias de Ct para β -actina e *28S rRNA* com valores altos, indicando que são genes menos estáveis. Esses resultados também sugerem uma provável atuação da região e período sazonal, que possivelmente influenciaria na estabilidade do gene, conforme observadas nas importantes alterações a níveis histológicos relacionadas à estas variáveis, uma vez, que as alterações histológicas e enzimáticas apontam para valores semelhantes na região de PG. Da mesma forma Jesus *et al.* (2021) e Pinheiro-Sousa *et al.* (2021) já demonstraram na região de PG componentes químicos como os oligoelementos que influenciam na bioacumulação de tecidos de peixes e crustáceos nessa região. E ainda conforme Abdel-Gawad *et al.* (2020) avaliando a indução do

estresse oxidativo por metais pesados em *Oreochromis niloticus*, verificaram a indução e redução da expressão gênica de *GST* e *CAT* em brânquias e fígados nessa espécie, quando as concentrações de Cu e Zn eram aumentadas durante o ensaio. Dentre os conjuntos de genes testados, verificou-se expressão negativa dos genes-alvo *CAT* e *GST* pelo método da RT qPCR assim como foi visto por ensaio anterior realizado por meio de PCR convencional, tanto em brânquias quanto em fígado de peixes. Os genes endógenos *β -actina*, *28S rRNA* e *18S rRNA*, apresentaram expressão, isso indica que o material biológico tinha qualidade e o método foi aplicado corretamente, visto que os genes endógenos se expressaram nas amostras de fígado e brânquias analisadas.

O método de RT qPCR foi aplicado corretamente (tanto é que ocorreu expressão de genes endógenos). Contudo, não ocorreu expressão de genes alvos de *GTS* e *CAT*. Esse resultado pode estar relacionado com a inespecificidade dos primers utilizados para a espécie, o tempo de exposição do animal aos poluentes, que tem um ciclo de vida aproximadamente de três anos ou a capacidade de resistência do peixe aos poluentes específicos do estudo. Todos esses aspectos podem ser investigados e constituem em ponto de partida para pesquisas futuras.

6 CONCLUSÕES

O táxon *S. herzbergii* (Loch, 1794) foi considerado nesta investigação como um excelente organismo modelo para a avaliação de áreas protegidas e impactadas, apresentando-se, assim, como biomonitor de áreas portuárias, dada a sua capacidade de resposta aos contaminantes aos quais são expostos.

A frequência de alterações histológicas e enzimáticas nas brânquias e no fígado dos espécimes de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) coletados na região portuária indica que esses organismos estão sob estresse causado por contaminantes de origem antrópica. As alterações histológicas mais frequentes e mais graves nos peixes amostrados na região mais impactada mostram que a sanidade dos exemplares de *S. herzbergii* (Bloch, 1794) está comprometida.

As atividades de Catalase e glutathione S-transferase observadas nos peixes nas diferentes estações de coleta podem ter sido uma resposta biológica para evitar danos lipídicos significativos, visto que as enzimas antioxidantes e de biotransformação são consideradas a primeira linha de defesa contra os danos causados por estresse oxidativo.

Os dados das expressões genéticas de *GST* e *CAT* apresentaram resultados de expressão negativa; por outro lado, genes endógenos apresentaram respostas positivas indicando a confiabilidade do método aplicado para *S. herzbergii* (Bloch, 1794). Dessa forma, novos estudos para essa espécie podem ser aprofundados através de ensaios ecotoxicológicos com base na expressão de *GST* e *CAT* que verifiquem os efeitos específicos de poluentes químicos a nível molecular.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GAWAD, F.K.; KHALIL, W.K.; BASSEM, S.M.; KUMAR, V.; PARISI, C.; INGLESE, S.; GUERRIERO, G. The duckweed, lemna minor modulates heavy metal-induced oxidative stress in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Water**, v. 12, n. 11, p. 2983, 2020.
- ADAMS, G.D.; FLORES, D. Influência de El Niño oscilación del Sur en la disponibilidad y abundância de recursos hidrobiológicos de la pesca artesanal em Ica, Perú. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 51, n. 2, p. 265-272, 2016.
- ADAMS, S.M. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. **American Fisheries Societies**, v. 8, 1990.
- ADAMS, S.M.; SHUGART, L.R.; SOUTH WORTH, G.R.; HINTON, D.E. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MMARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Ed.). Biomarkers of environmental contamination. Boca Raton: **Lewis Publishers**, p. 333-353, 1990.
- ADEOGUN, A.O.; IBOR, O.R.; ONOJA, A.B.; ARUKWE, A. Fish condition factor, peroxisome proliferator activated receptors and biotransformation responses in *Sarotherodon melanotheron* from a contaminated freshwater dam (*Awba Dam*) in Ibadan, Nigeria. **Marine Environmental Research**, 2016.
- AGUNWAMBA, J.C.; ONUOHA, K.C.; OKOYE, A.C. Potential effects on the marine environment of dredging of the Bonny channel in the Niger Delta. **Environmental monitoring and assessment**, v. 184, p. 6613-6625, 2012.
- ALBINATI, A.C. L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B.; CARVALHO, J.V.; SANTOS, G.B.; LIRA, A.D. Toxicidade aguda do herbicida Roundup® para piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v. 8, n.3, p.184-192, 2007.
- ALCÂNTARA, E.H.; SANTOS, M.C.E.V. Mapeamento de Áreas de Sensibilidade Ambiental ao Derrame de Óleo na Região Portuária do Itaquí, São Luís, MA-Brasil. Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 16-21, INPE, Goiânia: INPE, 2005.
- ALMEIDA DUARTE, L.F.; DE SOUZA, C.A.; PEREIRA, C.D.S.; PINHEIRO, M.A.A. Metal toxicity assessment by sentinel species of mangroves: In situ case study integrating chemical and biomarkers analyses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, p. 367-376, 2017.
- ALMEIDA, J. S. Avaliação da qualidade do sedimento do ribeirão Cambé (Londrina, PR) por meio de parâmetros funcionais de curimbas (*Prochilodus lineatus*). Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2001.
- AMADO, L.L.; DA ROSA, C.E.; LEITE, A.M.; MORAES, L.; PIRES, W.V.; LEÃES PINHO, G.L.; MARTINS, C.M.G.; ROBALDO, R.B.; NERY, L.E.; MONSERRAT, J.M. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxic and immunological effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 2, p. 199-206, 2006.
- ANDRADE, T.S.O.M. **Biomarcadores em caranguejo uçá (*Ucides cordatus*) para monitoramento ambiental em áreas portuárias**. 2016. Dissertação (Mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca) Universidade Estadual do Maranhão. São Luís-MA, 2016.

ANGELI, J.L.F.; TREVIZANI, T.H.; RIBEIRO, A.; MACHADO, E.C.; FIGUEIRA, R.C.L.; MARKERT, B.; FRAENZLE, S.; WUENSCHMANN, S. Arsenic and other trace elements in two catfish species from Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, p. 8333–42, 2013.

ANTAQ. Agência Nacional de Transportes Aquaviários. **Portos brasileiros**. Disponível em: <<http://www.antaq.gov.br/Portal/pdf/Portos/Itaqui.pdf>> Acesso em: 30 de setembro. 2018.

ARAÚJO, F.G. Abundancia relativa, distribuição e movimentos sazonais de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) no estuário da Lagoa dos Patos-RS. **Revista Brasileira de Zoologia**, n. 5, p. 509-543, 1988.

ARAÚJO, F.G.; FICHBERG, I.; PINTO, B.C.T.; PEIXOTO, M.G.A preliminary index of biotic integrity for monitoring the condition of the Rio Paraíba do Sul, Southeast Brazil. **Environmental Management**, v. 32, p. 516-526, 2003.

ARAÚJO, M.E.; TEIXEIRA, J.M.C.; OLIVEIRA, A.M.E. Peixes estuarinos marinhos do Nordeste brasileiro: guia ilustrado. Fortaleza: Edições UFC, 2004.

ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the *Senegales Sole*, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v.44, p.62-72, 1999.

ATLI, G.; CANLI, E.G.; EROGLU, A.; CANLI, M. Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 30–37, 2016.

AZEVEDO, J.S.; FERNANDEZ, W.S.; FARIAS, L.A.; FÁVARO, D.T.I.; BRAGA, E.S. Use of *Cathorops spixii* as bioindicator of pollution of trace metals in the Santos Bay, Brazil. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 577–586, 2009.

AZEVEDO NETTO, A.; FARIAS, S.P.; SILVA, L.L.; SILVA, V.K.; FREITAS D.J.; RAMOS MENEZES, C.; VIEIRA, N.C.; BAPTISTA NETO, J. A.; MONTEIRO, F.E. Distribution dynamics and potential sources of polycyclic aromatic hydrocarbons for surface sediments and bivalves from a highly anthropized estuary. *S &G Journal*, vol.17, n°.1, p. 104-117, 2022.

BALLABIO, D. A MATLAB toolbox for Principal Component Analysis and unsupervised exploration of data structure. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 149, p. 1-9, 2015.

BARCAROLLI, I.F.; MARTINEZ, C.B.R. Effects of aluminum in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 72, n. 3, p. 639-646, 2004.

BARRETT, J.C.; VAINIO, H.; PEAKALL, D.; GOLDSTEIN, B.D. 12th Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemical: susceptibility to environmental hazards. **Environmental Health Perspective**, v. 105, n. 4, p. 699–737, 1997.

BATISTA, W.S. **Alterações em brânquias e hepatopâncreas de caranguejo *Ucides cordatus* como biomarcadores para monitoramento de áreas portuárias em São Luís (Maranhão)** Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Maranhão – São Luís, 2017.

- BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v. 112, p. 285-298, 2001.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution, **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.
- BERTHELSEN, A.; CASANOVAS, P.; CLAPCOTT, J.; CLARK, D.; WAGENHOFF, A.; PATTERSON, M.; SINNER, J. Relationships in ecological health between connected stream and estuary ecosystems. **Ecological Indicators**, v. 115, p. 106-374, 2020.
- BESSE, J.P.; COQUERY, M.; LOPES, C.; CHAUMOT, A.; BUDZINSKI, H., LABADIE, P.; GEFFARD, O. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. **Water Research**, v. 47, p. 650-660, 2013.
- BOMBONATO, M.T.S.; ROCHEL, S.S.; Vicentini, C.A.; VICENTINI, I.B.F. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum. Ciências Biológicas**, v. 29, n. 1, pág. 81-85, 2007.
- BONETTI, Taciana et al. Discutindo a gestão urbana de áreas costeiras: o caso do Farol de Santa Marta/Laguna-SC. 2011.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília: MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006.
- BRÁZOVÁ, Tímea et al. Biomonitoring of polychlorinated biphenyls (PCBs) in heavily polluted aquatic environment in different fish species. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, p. 6553-6561, 2012.
- BUSS. D.F.; BAPTISTA. D.F.; NESSIMIAN. J.L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 465-473, 2003.
- BUSTIN, S.A.; BEAULIEU, J.F.; HUGGETT, J.; JAGGI, R.; KIBENGE, F.S.; OLSVIK, P.A.; TOEGEL, S. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. **BMC molecular biology**, v. 11, p. 1-5, 2010.
- CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARAQUETE, C. VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of population in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 274, p. 295-311, 2000.
- CAMPOS, I.A.Z.; MARQUES, C. Direito ao meio ambiente e o necessário controle da poluição atmosférica: A inovação trazida pelo estado do Espírito Santo. **Revista Jurídica**, v. 2, n. 43, p. 534 - 558, 2017.
- CANTANHÊDE, S.M. **Biomarcadores em peixes como ferramenta na avaliação da qualidade de ambientes estuarinos na Ilha do Maranhão, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís-MA, 2016.

CAPPARELLI, M.V.; MCNAMARA, J.C.; GROSELL, M. Effects of waterborne copper delivered under two different exposure and salinity regimes on osmotic and ionic regulation in the mudflat fiddler crab, *Minuca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, p. 201–209, 2017.

CARDOSO, C.M.; MALUF, A.; MORENO, B.B.; NOBRE, C.R.; MARANHO, L.A.; HANDAN, B.A.; RIBEIRO, D.A.; ABESSA, D.M.S.; PEREIRA, C.D.S. Common snook juveniles, *Centropomus undecimalis*, as biomonitor organisms to evaluate cytogenotoxicity effects of surface estuarine water from Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110513, 2019.

CARDOSO, C.M.; MALUF, A.; MORENO, B.B.; NOBRE, C.R.; MARANHO, L.A.; HANDAN, B.A.; RIBEIRO, D.A. Common snook juveniles, *Centropomus undecimalis*, as biomonitor organisms to evaluate cytogenotoxicity effects of surface estuarine water from Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110513, 2019.

CARVALHO NETA, R.N.F.; TORRES, A.R.; ABREU SILVA, A.L. Biomarkers in 112 catfish *Sciades herzbergii* (teleostei: ariidae) from polluted and non-polluted areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 5, p. 1314–1327, 2012.

CARVALHO NETA, R.N.F.; MOTA ANDRADE, T.D.S.D.O.; DE OLIVEIRA, S.R.S.; TORRES JUNIOR, A.R.; DA SILVA CARDOSO, W., SANTOS, D.M.S.; BRITO, N.M. Biochemical and morphological responses in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) as indicators of contamination status in mangroves and port areas from northern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 15884-15893, 2019.

CARVALHO NETA, R.N.F.; SOUSA, D.B.P.; ALMEIDA, Z.D.S.; SANTOS, D.M.S.; TCHAICKA, L.A. histopathological and biometric comparison between catfish (Pisces, Ariidae) from a harbor and a protected area, Brazil. **Aquatic Biosystems**, v. 10, p. 1-7, 2014.

CARVALHO-NETA, R.N.F.; ABREU-SILVA, A.L. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: an in situ study of an estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. spe4, p. 11-17, 2010.

CARVALHO-NETA, R.N.F.; NUNES, J.L.S.; PIORSKI, N.M. Peixes estuarinos do Maranhão. In : NUNES, J. L. S.; PIORSKI, N. M. **Peixes marinhos e estuarinos do Maranhão**. São Luís: Café & Lápis - FAPEMA, p 95-104, 2011.

CASTRO, J. S.; FRANÇA, C.L.; CARDOSO, R.L.; SILVA, W.M.M.L.; SANTANA, T.C.; SANTOS, D.M.S.; CARVALHO-NETA, R.N.F.; TEIXEIRA, E.G. Histological changes in the kidney of *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) for environmental monitoring of a neotropical estuarine area (São Marcos Bay, Northeastern Brazil). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 1, p. 1-9, 2019.

CASTRO, J.S.; FRANÇA, C.L.; FERNANDES, J.F.F.; SILVA, J.S.; CARVALHO-NETA, R.N.F.; TEIXEIRA, E.G. Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) capturados no complexo Estuarino de São Marcos, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 2, p. 410-418, 2018.

CAVALCANTI, L.F.; AZEVEDO-CUTRIM, A.C.G.; OLIVEIRA, A. L.L.; FURTADO, J.A., ARAÚJO, B.D.O.; SÁ, A.K.D.D.S.; CUTRIM, M.V.J. Structure of microphytoplankton

community and environmental variables in a macrotidal estuarine complex, São Marcos Bay, Maranhão-Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 66, n. 3, p. 283-300, 2018.

CHATZINIKOLAOU, E.; MANDALAKIS, M.; DAMIANIDIS, P.; DAILIANIS, T.; GAMBINERI, S.; ROSSANO, C.; ARVANITIDIS, C. Spatio-temporal benthic biodiversity patterns and pollution pressure in three Mediterranean touristic ports. **Science of the Total Environment**, v. 624, p. 648–660, 2018.

CHRISTENSEN, E.A.; STIEGLITZ, J.D.; GROSELL, M.; STEFFENSEN, J.F. Intra-specific difference in the effect of salinity on physiological performance in European perch (*Perca fluviatilis*) and its ecological importance for fish in estuaries. **Biology**, v. 8, n. 4, p. 89, 2019.

COBEA - Proteção e Bem Estar de Animais de Laboratório. <http://www.cobea.org.br/> 2015.

COLOMBI, J. S. Experimentos de contaminação in vitro com mehg e hgcl₂ em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794). Monografia Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ JULHO – 2009. Bacharel em Biociências e biotecnologia.

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2004. Resolução nº. 344. Diário Oficial da União, pp. 605-612.

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. Resolução nº. 357. Diário Oficial da União, pp. 605-612.

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2012. Resolução nº. 454. Diário Oficial da União, pp. 605-612.

DA SILVA AIRES, M.; PAGANINI, C. L.; BIANCHINI, A. Biochemical and physiological effects of nickel in the euryhaline crab *Neohelice granulata* (Dana, 1851) acclimated to different salinities. Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: **Toxicology and Pharmacology**, v. 204, p. 51–62, 2018.

DA SILVA, E. G.; BEHREND, R.D.L. Uso de biomarcadores em ambientes aquáticos e o monitoramento ambiental em regiões costeiras. **Revista Científica e-Locução**, v. 1, n. 22, p. 17-17, 2022.

DAVANSO, M.B.; MOREIRA, L.B.; PIMENTEL, M.F.; COSTA-LOTUFO, L.V.; DE SOUZA ABESSA, D.M. Biomarkers in mangrove root crab *Goniopsis cruentata* for evaluating quality of tropical estuaries. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 80-88, 2013.

DE ALMEIDA DUARTE, L.F.; SOUZA, C.A.; NOBRE, C.R.; PEREIRA, C.D.S.; PINHEIRO, M.A.A. Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western atlantic. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 176–187, 2016.

DE JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia brasiliensis**, v.12, n. 4, p. 7, 2008.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment Invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 2, p. 161-172, 1994.

DI GIULIO, R.T.; WASHBURN, P.C.; WENNING, R.J.; WINSTON, G.W.; JEWELL, C.S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 8, n. 12, p. 1103-1123, 1989.

DONDERO, F.; DAGNINO, A.; JONSSON, H.; CAPRÌ, F.; GASTALDI, L.; VIARENGO, A. Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. **Aquatic toxicology**, v. 78, p. S13-S24, 2006.

DUARTE, L. F. DE A. DE SOUZA, C.A.; NOBRE, C.R.; PEREIRA, C.D.S.; PINHEIRO, M.A.A. Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western atlantic. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 176–187, 2016.

DURAL, M.; GÖKSU, M.Z.L.; ÖZAK, A.A. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. **Food Chemistry**, v. 102, p.415–421, 2007.

FIGUEIREDO, J.L.; MENEZES, N.A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil: II Teleosti (1)**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1978.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; PEIXOTO, F.; ROCHA, E.; REIS-HENRIQUES, M.A. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 85, n. 2, p. 97-103, 2006.

FREIRE, C.A.; SOUZA-BASTOS, L.R.; CHIESSE, J.; TINCANI, F.H.; PIANCINI, L.D.; RANDI, M.A.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 13263-13277, 2015.

FREITAS, B.V.; DE OLIVEIRA, E.L. Impactos socioeconômicos da construção do Complexo Portuário-Industrial do Açú sobre a população e o território de São João da Barra. **Revista de Geografia-PPGEO-UFJF**, v. 2, n. 1, 2012.

GOKSOYR, A.; ANDERSSON, T.; BUHLER, D.R.; STEGEMAN, J.J.; WILLIAMS, D.; FORLIN, L. Immunochemical Cross-Reactivity of Beta-naphthoflavone inducible cytochrome P450 (P450ia) in liver- microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 9, p. 1-13, 1991.

GUILOSKI, I.C. **Estudos in vivo e in vitro dos efeitos de pesticidas em peixes nativos**. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal do Paraná-PR, Curitiba-PR, 2009.

GUNDERSEN, D.T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S.D.; MILLAR, J.G. BLAZER, V. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordanes-contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 19, n. 9, p. 2275-2285, 2000.

GUNDERSEN, D.T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S.D.; MILLAR, J.G.; BLAZER, V. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordanes-contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 19, n. 9, p. 2275-2285, 2000.

GUPTA, R. C. Chapter 1: Introduction. In: GUPTA, R. C. (Ed.). *Biomarkers in Toxicology*. Kentucky, USA, **Elsevier**, 2014.

HENDERSON, R.F. Strategies for use of biological markers of exposure. **Toxicology letters**, v. 82, p. 379-383, 1995.

HERING, D.; VERDONSCHOT, P.F.M.; MOOG, O.; SANDIN, L. Overview and application of the AQEM assessment system: integrated assessment of running waters in Europe. **Hydrobiologia**, v. 516, p. 1-20, 2004.

HOJAT, A.H.M.; RAHIM, K.A. Effluent charge reform for controlling water pollution in the Malaysian crude palm oil industry. **Environment and Development Economics**, v. 17, p. 781-794, 2012.

HOOK, S.E.; GALLAGHER, E.P.; BATLEY, G.E. The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. **Integrated Environmental Assessment Management**, v. 10, p. 327-41, 2014.

JESUS, M.S.S.; FRONTALINI, F.; BOUCHET, V.M.P.; YAMASHITA, C.; SARTORETTO, J.R.; FIGUEIRA, R.C.L.; SOUSA, S.H.M. Reconstruction of the palaeo-ecological quality status in an impacted estuary using benthic foraminifera: the Santos estuary (São Paulo state, se Brazil). **Marine Environmental Research**, v. 162, p. 105- 121, 2020.

JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 682-693, 2008.

JESUS, W.B.; DE OLIVEIRA MOTA, T.D.S.; SOARES, H.S.; PINHEIRO-SOUSA, D. B.; DE OLIVEIRA, S.R.S.; TORRES, H.S.; PROTÁZIO, G.S.; SILVA, D.S; SANTOS, D.M.S; CARVALHO-NETA, A.V.; BENJAMIN, L.A.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Biomarkers and occurrences of heavy metals in sediment and the bioaccumulation of metals in crabs (*Ucides cordatus*) in impacted mangroves on the Amazon coast, Brazil. **Chemosphere**,v. 271, p. 129444, 2021.

JIANG, Y.; YUAN, C.; QI, M.; LIU, Q.; Hu, Z. The effect of salinity stress on enzyme activities, histology, and transcriptome of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Biology**, v. 11, n. 11, p. 1580, 2022.

JIMINEZ, B.; STEGEMAN, J. Detoxification enzymes as indicator of environmental stress on fishes. In: **American Fish Society Symposium**. v. 8, p. 69-79, 1990.

JOHANSSON, S.; FUCHS, A.; ÖKVIST, A.; KARIMI, M.; HARPER, C.; GARRICK, T.; EKSTRÖM, T.J. Validação de controles endógenos para análise quantitativa de expressão gênica: aplicação em córtices cerebrais de alcoólatras crônicos humanos. **Brain research** , v. 1132, p. 20-28, 2007.

JUNIOR, A.R.; DA SILVA CARDOSO, W.; SANTOS, D.M.S.; BATISTA,W.S; SERRA,I.M.R.S; BRITO, N. M. Biochemical and morphological responses in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) as indicators of contamination status in mangroves and port areas from northern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 16, p. 15884-15893, 2019.

KAISER, H.F. The varimax criterion for analytical rotation in factor analysis *Psychometrika*. **P187--200**, 1958.

KAISER, M.J.; ATTRILL, J.M.; JENNINGS, S.; THOMAS, D.N.; BARNES, D.K.A.; BRIERLEY, A.S.; POLUNIN, N.V.C.; RAFFAELLI, D.G.; WILLIAMS, P.J.B. Estuarine Ecology. In: KAISER, M. J., ATTRILL, J. M., JENNINGS, S., THOMAS, D. N.; BARNES, D. K. A.; BRIERLEY, A. S.; POLUNIN, N. V. C.; RAFFAELLI, D. G.; WILLIAMS, P. J. B (Eds.). *Marine Ecology- Processes, Systems, and Impacts*, New York: **Oxford University Press**, p. 151-187, 2005.

KAISER, M.J.; ATTRILL, M.J.; JENNINGS, S.; THOMAS, D.N.; BARNES, D.K.A.; BRIERLEY, A.S.; POLUNIN, N.V.C.; RAFFAELLI, D.G.; WILLIAMS, P.J. le B. *Marine Ecology: Processes, systems, and impacts*: **Oxford University Press**, Oxford 2005.

KARR, J.; CHU, E.W. *Restoring life in running waters: better biological monitoring*. Washington, **Inland Press**; 1999.

KENNISH, M.J. Environmental threats and environmental future of estuaries. **Environmental Conservation**, v. 29, p. 78- 107, 2002.

KERAMBRUN, E.; HENRY, F.; CORNILLE, V.; COURCOT, L.; AMARA, R.A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries **Chemosphere**, v. 91, p. 498–505, 2012.

KROON, F.; STRETEN, C.; HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. **PloS One**, v. 12, n. 4, 2017.

KU, P.; WU, X.; NIE, X.; OU, R.; WANG, L.; SU, T.; LI, Y. Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 166, p. 105-114, 2014.

LAM, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean and Coastal Management**, v. 52, n. 7, p. 348–354, 2009.

LEON, L.L.; BERTOLUCCI, J.B.; DE SOUZA, A. S.; DE GOES, A. Q.; BALHAZAR-SILVA, D.; ROCHA-LIMA, A.B.C. Poluição dos ecossistemas marinhos brasileiros: uma breve revisão sobre as principais fontes de impacto e a importância do monitoramento ambiental. **Unisanta BioScience**, v. 9, n.3, p. 166-173, 2020.

LI, Z., DEEN, M.J.; KUMAR, S.; SELVAGANAPATHY, P.R. Raman spectroscopy for in-line water quality monitoring—Instrumentation and potential. **Sensors**, v. 14, n. 9, p. 17275-17303, 2014.

LIMA, B.A.; MODKOVSKI, T.A.; KRAMER, R.D.; AZEVEDO, J.C.R. Pollution profile by n-alkanes in sediment and surface water of the Paranaguá Estuarine Complex. *Caderno Pedagógico*, vol.21, n°4, p. 36-38, 2024.

LOWE-MCCONNELL, R.H. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. (Tradutores: VAZZOLER, A. E. A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; CUNNINGHAM, P. T. M.) São Paulo: **Editores USP**. 1999.

LU, Y.; YUAN, J.; LU, X.; SU, C.; ZHANG, Y.; WANG, C.; SWEIJID, N. Major threats of pollution and climate change to global coastal ecosystems and enhanced management for sustainability. **Environmental Pollution**, v. 239, p. 670-680, 2018.

MACEDO, G.H.R.V.; CASTRO SILVA, J.; JESUS, W.B.; TORRES, H.S.; ROSA, R.G.; NETA, R.N.F.C.; SOUSA, D.B.P. Biomarcadores de estresse oxidativo em uma espécie de bagre estuarino capturado próximo a um complexo portuário na costa amazônica brasileira. **Estudos Regionais em Ciências Marinhas**, v. 69, p. 103-306, 2024.

MAIOLI, O.L.; RODRIGUES, K.C.; KNOPPERS, B.A.; AZEVEDO, D.A. Pollution source evaluation using petroleum and aliphatic hydrocarbons in surface sediments from two Brazilian estuarine systems. *Organic Geochemistry*, vol. 41, n° 9, p. 966-970, 2010.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. **A bacia do Rio Tibagi. Editora dos Editores, Londrina, PR, Brazil**, p. 551-577, 2002.

MARTINEZ, C.B.R.; SUADICANI, S.O.; FERRONI, E.N.; MOREIRA, G.S. Effect of benzene on the swimming activity of *Mysidopsis juniae* (Crustacea, Mysidacea). **Brazilian J. Med. Biol. Res.** v. 25, p. 487 – 490, 1992.

MCLUSKY, D.S.; ELLIOT, M. The estuarine environment. In: McLUSKY, D. S., ELLIOT, M. (Eds.). *The Estuarine Ecosystem - ecology, threats, management*, **Oxford University Press**, p. 1-18, 2004.

MIGNANI, L.; DA SILVA, C.M.; MANZATTO, C.; PACKER, A.; SAMPAIO, F.G.; MANZATTO, C.V. Monitoramento ambiental da Aquicultura em águas da União: subsídios para a proposição de um plano nacional, 2019.

MMA. Poluição Ambiental. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/qualidade-do-ar/fontes-fixas>. Acesso em: 15 de Agosto de 2022.

MMA. Programa Nacional do Meio Ambiente II PNMA II - Fase 2 2009 – 2014. COMPONENTE DESENVOLVIMENTO INSTITUCIONAL. SUBCOMPONENTE MONITORAMENTO AMBIENTAL. Disponível em: https://antigo.mma.gov.br/estruturas/pnma/arquivos/03_02_sub_pga_juli09_6.pdf. Acesso em: 15 de Agosto de 2022.

MONTES, C.S.; FERREIRA, M.A.P.; SANTOS, S.S.D. Branchial histopathological study of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) in the Guajará bay, Belém, Pará State, Brazil. **Acta Scientiarum Biological Science**, v. 32, n. 1, p. 93-99, 2010.

NDIAYE, A.; SANCHEZ, W.; DURAND, J.D. ; BUDZINSKI, H. ; PALLUEL, O. ; DIOUF, K. ; NDIAYE, P. ; PANFILI, J. Multiparametric approach for assessing environmental quality 34 variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) as a sentinel species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 4133-4147, 2012.

NIETO, R. M.; GARCÍA-BARREIRA, T.; GÓMEZ-ARIZA, J-L.; LÓPEZ-BAREA, R. Environmental monitoring of Domingo Rubio stream (Huelva Estuary SW Spain) by combining conventional biomarkers and proteomic analysis in *Carcinus maenas*. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 401-408, 2010.

- NIGRO, M.; FALLENI, A.; BARGA, I.D.; SCARCELLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 77, p. 339-347, 2006.
- NUNES, B.; PAIXÃO, L.; NUNES, Z.; AMADO, L.; FERREIRA, M.A.; ROCHA, R. Use of biochemical markers to quantify the toxicological effects of metals on the fish *Sciades herzbergii*: potential use to assess the environmental status of Amazon estuaries. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 30789-30799, 2020.
- OLIVEIRA, C.N.D.; CAMPOS, V.P.; MEDEIROS, Y.D.P. Avaliação e identificação de parâmetros importantes para a qualidade de corpos d'água no semiárido baiano. Estudo de caso: bacia hidrográfica do rio Salitre. **Química Nova**, v. 33, p. 1059-1066, 2010.
- OLIVEIRA, E.C.; HORTA, P.A.; AMANCIO, C.E.; SANT'ANNA, C.L. Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação. In: **Workshop sobre Avaliação e ações prioritárias para a conservação da Biodiversidade das zonas costeiras e marinhas, Brasília, Ministério do Meio Ambiente**, v. 1, p. 411-416, 2002.
- OLIVEIRA, S.R.S.; BATISTA, W.D.S.; SOUSA, J.B.M.; NOLETO, K.S.; AROUCHE LIMA, I.M.; ANDRADE, T.S.M.; CARDOSO, G.S.; CARVALHO NETA, R.N.F. Enzymatic and histological biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an industrial port on the north coast of Brazil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v.102,n.6, p. 802-810, 2019.
- OLIVEIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, L.B.; FERREIRA, L.J.S.; PROTAZIO, G.S.; SANTOS, D.M.S.; MORENO, L.C.G.A.I.; CARVALHO NETA, R.N.F. Biomarkers and health status of the crab *Ucides cordatus* to assess the impact of contaminants in an estuarine mangrove region in the Brazilian Amazon. **Gaia Scientia**, v. 17, p. 153–167, 2023.
- OVERSTREET, R.M. Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. coasts: histopathological indicators. **Aquatic Toxicology**, v. 11, p. 213 – 239, 1988.
- PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331 – 347, 2002.
- PAYNE, J.F.; FANCEY, L.; RAHIMTULA, A.; PORTER, E. Revisão e perspectiva do uso de enzimas oxigenases de função mista no monitoramento biológico. **Bioquímica e Fisiologia Comparativa Parte C: Farmacologia Comparada**, v. 86, n. 2, p. 233-245, 1987.
- PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**. v. 1, n.15, p. 1 – 60, 1995.
- PEREIRA FILHO, J.; SPILLERE, L.C.; SCHETTINI, C.A.F. Dinâmica de nutrientes na região portuária do rio Itajaí-Açu, SC. **Atlântica, Rio Grande**, v. 25, n.1, p. 11-20, 2003.
- PEREIRA, N.; SANTOS, M.; SILVA MAIÃO, J.P.L.; CAMPOS, J.; SILVA, N.; MENDES, D.; SANTOS, D. Histological biomarkers in fish gills in the assessment of environmental contamination of the Mearim River, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 68063-68079, 2020.

PERILLO, G.M.E. Definition and Geomorphologic Classifications of Estuaries. In: PERILLO, G. M. E. (Eds.). *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries*. Elsevier Science, v. 53, p. 17-48, 1995.

PINHEIRO, M.A.A.; SILVA, P.P.G.; DE ALMEIDA DUARTE, L.F.; ALMEIDA, A. A.; ZANOTTO, F.P. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucridae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 81, p. 114-121, 2012.

PINHEIRO-SOUSA D.B.P.; ALMEIDA Z.S.; CARVALHO-NETA R.N.F. Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes) to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, p. 305-312, 2013.

PINHEIRO-SOUSA, D.B.; DA COSTA SOARES, S.H.; TORRES, H.S.; DE JESUS, W.B.; OLIVEIRA, S.R.S.; BASTOS, W.R.; RIBEIRO, C.A.O.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Sediment contaminant levels and multibiomarker approach to assess the health of catfish *Sciades herzbergii* in a harbor from the northern Brazilian Amazon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111540, 2021.

PINHEIRO-SOUSA, D.B.; LIMA, M.I.S.; GONÇALVES, R.M.; SANTOS, D.M.S.; CARVALHO NETA, A.V.; ANJOS BENJAMIM, L.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Interaction between Benzo [a] anthracene 7, 2-dione 7-oxime (BZA) and calf thymus dsDNA using electroanalytical genosensor. **Analytical Biochemistry**, v. 657, p. 114905, 2022.

PIVETTA, F.; MACHADO, J.M.H.; ARAÚJO, U.C.; MOREIRA, M.D.F.R.; APOSTOLI, P. Biological monitoring: concepts and applications in public health. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, v. 17, n. 3, p. 545–554, 2001.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and 105 chronic effects of pollution. In: *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford: Fishing News Books, 1994.

PRATT, J.M.; COLER, R.A. A procedure for the routine biological evaluation of urban runoff in small rivers. **Water Research**, v. 10, p. 1019-1025, 1976.

QU, X.; REN, Z.; ZHANG, M.; LIU, X.; PENG, W. Sediment heavy metals and benthic diversities in Hun-Tai River, northeast of China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 10662-10673, 2017.

RAGUNATHAN, P.; SIELAFF, H.; SUNDARARAMAN, L.; BIUKOVIĆ, G., MANIMEKALAI, M.S.S.; SINGH, D.; GRÜBER, G. A singularidade da subunidade α das F-ATP sintases micobacterianas: Uma variante evolutiva para adaptação de nicho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292 (27), p. 11262-11279, 2017.

REGOLI, F.; GIULIANI, M.E.; BENEDETTI, M.; ARUKWE, A. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidante defense systems in multiple tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3- 4 SUPPL., p. 56–66, 2011.

REIS, A.B.; SANT'ANA, D.D.M.G.; AZEVEDO, J.F.D.; MERLINI, L.S.; ARAÚJO, E.J.D.A. The influence of the aquatic environment in tanks sequetially interconnected with PVC pipes

on the gill epithelium and lamellas of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, p. 303-311, 2009.

REPULA, C.M.M.; CAMPOS, B.K.D.; GANZAROLLI, E.M.; LOPES, M.C.; QUINÁIA, S.P. Biomonitoramento de Cr e Pb em peixes de água doce. **Química Nova**, v. 35, p. 905-909, 2012.

RIBEIRO, E.B.; NOLETO, K.S.; DE OLIVEIRA, S.R.S.; DE JESUS, W.B.; DE SOUSA SERRA, I. M. R.; DE ALMEIDA, Z. D. S.; NETA, R.N.F.C. Biomarkers (glutathione S-transferase and catalase) and microorganisms in soft tissues of *Crassostrea rhizophorae* to assess contamination of seafood in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 158, p. 111348, 2020.

RIBEIRO, E.B.; RIBEIRO, D. B., COSTA, A. R. C., KANO, R. S., BLASQUES, R. V., MARQUES, P.R.B.O.; NUNES, G.S. Enzymatic Biosensors for Determination of Pesticides. **Revista Gestão Inovação e Tecnologias** v. 11, n. 1, p. 5835-5848, 2021.

RIGHETTO, A.M.; GOMES, K.M.; SOUSA FREITAS, F.R. Diffuse pollution of storm water runoff from an urban catchment. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1109-1120, 2017.

RODRIGUES, A.S.D.L.; CASTRO, P.D.T.A. Protocolos de avaliação rápida: instrumentos complementares no monitoramento dos recursos hídricos. 2008.

ROLA, R.C.; MONTEIRO, M.C.; REIS, S.R.S.; SANDRINI, J.C. Molecular and biochemical biomarkers responses in the mussel *Mytilus edulis* collected from Southern Brazil coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 766-71, 2012.

ROSS, K.; COOPER, N.; BIDWELL, J.R.; ELDER, J. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species : a comparison between populations from contaminated and reference sites. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 671-679, 2002.

RUDIGER, H.W. Biomonitoring in occupational medicine. In: MARQUART, H.; SCHAFER S. G; McCLELLAN R.; WELSCH F. (Eds.). **Toxicology**. San Diego: ACADEMIC PRESS, p. 1027-1039. 1999.

SADDICK, S.; AFIFI, M.; ZINADA, O.A.A. Effect of Zinc nanoparticles on oxidative stress-related genes and antioxidant enzymes activity in the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 7, p. 1672-1678, 2017.

SÁENZ, L.I.; SEIBERT, E.L.; ZANETTE, J.; FIEDLER, H.D.; CURTIUS, A.J.; FERREIRA, J.F.; ALMEIDA, E.A. ; MARQUES, M.R.F. ; BAINY, A.C.D. Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from maricultua zones of Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology Environmental and Safety**, v. 73, n. 1, p. 796-804, 2010.

SALGADO, A.M.; JACOBY, G.; PAULA, L.A. O Estado da ciência do desenvolvimento de biossensores a nível nacional. p. 2615-2622. **Anais... XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014**, Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2. São Paulo: Blucher, 2015.

SAMARAWEERA, A.V.; SANDAMALIKA, W.G.; LIYANAGE, D.S.; LEE, S.; PRIYATHILAKA, T.T.; LEE, J. Molecular characterization and functional analysis of glutathione S-transferase kappa 1 (GSTκ1) from the big belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*): Elucidation of its involvement in innate immune responses. **Fish & Shellfish Immunology** , v. 92, p. 356-366, 2019.

SANTANA, L.M.B.M.; COSTA-LOTUFO, L.V.; ABESSA, D.M.S. A contaminação antrópica e seus efeitos em três estuários do litoral do Ceará, Nordeste do Brasil – revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 48, n. 2, p. 93-115. 2015.

SANTANA, M.S.; SANDRINI-NETO, L.; NETO, F.F. RIBEIRO, C.A.O.; DI DOMENICO, M.; PRODOCIMO, M.M. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): systematic review and meta-analysis. **Environmental pollution**, v. 242, p. 449-461, 2018.

SANTOS FILHO, F.M.; REZENDE, K.F.O.; EMERENCIANO, A.K.; MOREIRA, L.M.; VILA, V.B.; BORGES, R.M.; PRESSINOTTI, L.N. Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. **Atas de Saúde Ambiental-ASA (ISSN 2357-7614)**, v. 2, n. 1, p. 09-22, 2014.

SANTOS, T.G.; BEZERRA-JUNIOR, J.L.; COSTA, K.M.P.; NASCIMENTO FEITOSA, F.A. Dinâmica da biomassa fitoplancônica e variáveis ambientais em um estuário tropical (Baía do Pina, Recife, PE). **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, n. 1, p. 95-109, 2009.

SARKAR, A.; RAY, D.; SHRIVASTAVA, N.A.; SARKER, S. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 333-340, 2006.

SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v.8, p. 231 – 240, 2001.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SILVA FILHO, M.V.; OLIVEIRA, M.M. CUNHA.; BASTOS, V.L.F.; ALVES, M.V.; CUNHA B.J. Validação de espécies sentinelas par biomarcação com colinesterase em peixes. In: ESPINDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.B.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA NETO, A.L. (Eds). *Ecotoxicologia: perspectiva para o séc. XXI*. São Carlos: RIMA, p.147 – 164, 2000.

SILVA MONTES, C.; PAIXÃO, L.F.; NUNES, B.; NUNES, Z.M.P.; FERREIRA, M. A.P.; ROCHA, R. M. Investigating spatial-temporal contamination for two environments of the Amazon estuary: A multivariate approach. **Marine Environmental Research**, v. 185, p. 105883, 2023.

SILVA, M.L.B. Alterações enzimáticas, celulares e histológicas em peixes expostos in situ ao efluente de uma mina. Dissertação (Mestrado em Biologia) Universidade de Aveiro, Portugal, 2008.

SOARES, S. H. C. **Biomarcadores bioquímicos e histológicos em *Sciades herzbergii* (Pisces Ariidae) para avaliação de ambientes estuarinos da baía de São Marcos, Maranhão**. São Luís, MA. Dissertação (Mestrado em Recursos aquáticos e pesca) Universidade Estadual do Maranhão, 2020.

SOARES, S.H.C.; SOUSA, D.B.P.; JESUS, W.B.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Biomarcadores histológicos em *Sciades herzbergii* (Pisces, Ariidae) para avaliação de impactos

em ambientes estuarinos da Baía de São Marcos, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 1403-1412, 2020.

SOGORB, M.A.; PAMIES, D.; DE LAPUENTE, J.; ESTEVAN, C.; ESTÉVEZ, J.; VILANOVA, E. An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 356-367, 2014.

SOUSA, D.B.P.; ALMEIDA, Z.S.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes), to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 305–312, 2013a.

SOUSA, D.B.P.; ALMEIDA, Z.S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da Costa Maranhense, Brasil [Histology biomarkers in two estuarine catfish species from the Maranhense Coast, Brazil]. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 65, n. 2, p. 369– 376, 2013b.

SOUSA, D.B.P.; ALMEIDA, Z.S.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da Costa Maranhense, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 369-376, 2013.

SOUSA, D.B.P., Biomarcadores e biossensores como subsídio ao monitoramento ambiental do complexo industrial e portuário de São Luís-ma. Tese (Doutorado em biodiversidade e biotecnologia da Rede Bionorte), Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, 2021

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. IV Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em petróleo e Gás. Anais. Campinas, SP: ABPG-PDPETRO, p. 21-24, 2007.

TEH, S.J.; ADAMS, S.M.; HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51 – 70, 1997.

THOPHON, S.; KRATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**. v. 121, p. 307 – 320, 2003.

TORRES, H.S. Biomarcadores histopatológicos em duas espécies de bagres (Pisces, Ariidae) de importância econômica na baía de São Marcos, Maranhão. Dissertação (Mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís-MA, 2015.

TORRES, H.S.; BARROS, M.F.S.; JESUS, W.B.; KOSTEK, L.S.; PINHEIRO-SOUSA, D.B.; CARVALHO, R.N.F. Impacted estuaries on the Brazilian Amazon coast near port regions influence histological and enzymatic changes in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Bloch, 1794). **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e271232, 2023.

TORRES, H.S.; DE JESUS, W.B., RIBEIRO, E.B.; PINHEIRO-SOUSA, D.B.; COSTA FILHO, R. N.D.; NETA, R.N.F.C. Trace elements and multibiomarkers in *Sciades herzbergii*

(Pisces, Ariidae) for monitoring port areas on the north coast of the Amazon, Brazil. **Regional Studies in Marine Science**, p. 103656, 2024.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicological Pharmaceutical**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAZZOLER, A. E. A. de M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: **EdUEM**, p. 196, 1996.

VENTURA, E.C.; GAELZER, L.R., ZANETTE, J.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3–5, p. 775–779, 2002.

VIANA, T.M.A.; OLIVEIRA, S.R.S.; TORRES, H.S.; JESUS, W.B.; TEIXEIRA, A.F.; NETA, R.N.F.C. Histological biomarkers in gills and livers of *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794) in a port area and in an environmental protection area – MA, Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 41047-41065, 2021.

WANG, D.; SINGHASEMANON, N.; GOH, K. S. A statistical assessment of pesticide pollution in surface Waters using environmental monitoring data: chlorpyrifos in Central Valley, California. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 332 – 341, 2016.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v. 410, p. 223-36. 1998.

WHITFIELD, A. K.; ELLIOTT, M. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: A review of progress and some suggestions for the future. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 229–250, 2002.

WHITFIELD, A. K.; HARRISON, T. D. Fishes as indicators of estuarine health. **Elsevier Science**, 2014.

WHITFIELD, A.K.; ELLIOTT, M. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: A review of progress and some suggestions for the future. **Journal of fish biology**, v. 61, p. 229-250, 2002.

WHO. INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria. Geneva: World Health Organization, 1993. 155 p.

WINKALER, E.U. Biomarcadores bioquímicos e fisiológicos de curimbas (*Prochilodus lineatus*) submetidos a testes in situ em ribeirões do município de Londrina, Paraná. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) –Universidade Estadual de Londrina, 2001.

WINKALER, E.U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum, Maringá**, v. 23, n. 2, p. 507 – 514, 2001.

WINZER, K.; WINSTON, G. W.; BECKER, W.; NOORDEN, C.J.F.V.; KÖEHLER, A. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 7 p. 143-145, 2001.

YANG, X.; TONG, G.; DONG, L.; YAN, T.; XU, H.; TANG, G.; KUANG, Y. Evaluation of qPCR reference genes for taimen (*Hucho taimen*) under heat stress. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 313, 2022.

YILMAZ, A.B.; SANGÜN, M.K.; YAĞLIOĞLU, D.; TURAN, C. Metals (major, essential to non-essential) composition of the different tissues of three demersal fish species from Iskenderun Bay, Turkey. **Food chemistry**.v.123, p. 410-415, 2010.

YU, H.; HE, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; ZHANG, X. Hepatic transcriptome analysis reveals the metabolic strategies of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) under different dissolved oxygen condition. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 45, p. 101032, 2023.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica chimica acta**, v. 606, n. 2, p. 135-150, 2008.

APÊNDICE A – Artigo intitulado “Impacted estuaries on the Brazilian Amazon coast near port regions influence histological and enzymatic changes in *Sciades herzegii* (Ariidae, Bloch, 1794)” publicado na revista Brazilian Journal of Biology.

Original Article

Impacted estuaries on the Brazilian Amazon coast near port regions influence histological and enzymatic changes in *Sciades herzegii* (Ariidae, Bloch, 1794)

Estuários impactados na costa amazônica brasileira próximos a regiões portuárias influenciam mudanças histológicas e enzimáticas em *Sciades herzegii* (Ariidae, Bloch, 1794)

H. S. Torres^a , M. F. S. Barros^a , W. B. Jesus^a , L. S. Kostek^b , D. B. Pinheiro-Sousa^c  and R. N. F. Carvalho Neta^d 

^aUniversidade Estadual do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – REDE BIONORTE, São Luís, MA, Brazil

^bUniversidade Estadual do Maranhão, Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, São Luís, MA, Brazil

^cUniversidade Federal do Maranhão, Coordenação do Curso de Engenharia Ambiental, São Luís, MA, Brazil

^dUniversidade Estadual do Maranhão, Departamento de Biologia, São Luís, MA, Brazil

Abstract

Enzymatic (glutathione S-transferase, GST and catalase, CAT) and histological biomarkers in *S. herzegii* are important for the analysis of impacted estuaries in port regions of the Brazilian Amazon coast. Fish specimens were collected in two areas in the rainy and dry seasons: Porto Grande (potentially impacted region) and Ilha dos Caranguejos (less impacted region). Sediment samples were collected for chemical analysis. Morphometric, histological, and enzymatic biomarker analyses were performed. The analysis of the sediments collected in the potentially impacted region showed levels of iron, aluminum and polycyclic aromatic hydrocarbons above the limits allowed by CONAMA legislation. Histological changes in the gills and liver, as well as GST and CAT activities, were high in fish collected at the port. Analyses suggest that fish in the potentially impacted region are subject to pollutants that compromise their health.

Keywords: ecotoxicology, catfish, histology, organ, pollution.

Resumo

Biomarcadores enzimáticos (glutamina S-transferase, GST e catalase, CAT) e histológicos em *S. herzegii* são importantes para a análise de estuários impactados em regiões portuárias da costa amazônica brasileira. Espécimes de peixes foram coletados em duas áreas nas estações chuvosa e seca: Porto Grande (região potencialmente impactada) e Ilha dos Caranguejos (região menos impactada). Amostras de sedimento foram coletadas para análise química. Análises morfológicas, histológicas e de biomarcadores enzimáticos foram realizadas. A análise dos sedimentos coletados na região potencialmente impactada mostrou teores de ferro, alumínio e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos acima dos limites permitidos pela legislação do CONAMA. As alterações histológicas nas brânquias e no fígado, bem como as atividades de GST e CAT, foram elevadas nos peixes coletados no porto. As análises sugerem que os peixes da região potencialmente impactada estão sujeitos a poluentes que comprometem sua saúde.

Palavras-chave: ecotoxicologia, bagre, histologia, órgão, poluição.

1. Introduction

In Maranhão, the São Marcos Bay estuarine region is subject to anthropogenic impacts resulting from port, domestic, and agricultural activities that generate chemical pollutants, contaminating water bodies, sediments, and aquatic biota. Such effects are mainly seen in typical species of the mangrove ecosystem (Oliveira et al., 2019), necessitating rigorous investigation of environmental impacts in the region (Carvalho Neta et al., 2012). The port complex is a very important undertaking for Maranhão

State, ranking among the largest ports for large cargo ships (Pinheiro-Sousa et al., 2022).

Biomarkers are any biological change in organisms that predict in advance the effects of pollutants on molecules, cells, tissues, physiology and behavior of animals in the face of environmental stress (Walker et al., 2010). Biomonitoring in regions that concentrate industrial and port enterprises is essential to reduce anthropogenic impacts, especially environmental impacts caused by

*e-mail: bettyralvino12@gmail.com

Received: January 17, 2023 – Accepted: March 30, 2023



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

APÊNDICE B – Artigo intitulado “Trace elements and multibiomarkers in *Sciades herzbergii* (Pisces, Ariidae) for monitoring port areas on the north coast of the Amazon, Brazil” publicado na revista *Regional Studies in Marine Science*.



Trace elements and multibiomarkers in *Sciades herzbergii* (Pisces, Ariidae) for monitoring port areas on the north coast of the Amazon, Brazil

Hetty Salvino Torres^{a,*}, Wanda Batista de Jesus^b, Eliane Braga Ribeiro^a,
Débora Batista Pinheiro-Couza^c, Raimundo Nonato Diniz Coeta Filho^c, Raimunda Nonata
Fortes Carvalho Neta^{a,d}

^a State University of Maranhão, Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology – REDE BIONORTE, São Luís, Maranhão, Brazil
^b Federal University of Maranhão, Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology – REDE BIONORTE, São Luís, Maranhão, Brazil
^c Federal University of Maranhão, Environmental Engineering Course, São Luís, Maranhão, Brazil
^d State University of Maranhão, Department of Biology, Campus Paulo VI, São Luís, Maranhão, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Accumulation of metals
Environmental analysis
Biomarkers
Estuary
Estuarine fish
Neobiotics

ABSTRACT

In this study, the objective was to evaluate the effects of trace elements and enzymatic and histological multibiomarkers, on *Sciades herzbergii*, from areas with port influence in the Amazon region, Maranhão. Samples of livers and gills were subjected to histological and enzymatic analyses, physical-chemical parameters of the water and biometric indices were analyzed in two regions, Porto Grande-PG (potentially impacted) and Ilha dos Caranguejos-IC (Conservation Unit). It was observed that fish collected in IC during the rainy season had greater weight and size compared to those from the most impacted area. Histological biomarkers in gills and livers showed higher values in PG, especially in the rainy season. Enzymatic analyses indicated a significant difference ($p < 0.05$) for GST at both times of the year. PCA showed a strong relationship between multibiomarkers and areas and periods. The data found on histological and enzymatic multibiomarkers in fish from port and conservation areas can assist in environmental management and monitoring programs in these areas.

1. Introduction

The increase in port activities is closely associated with human actions that have drastically altered aquatic ecosystems, such as discharges of xenobiotic substances that significantly change resident species (Carvalho-Neta et al., 2012; Moraes Calado et al. 2021). In São Marcos Bay, Maranhão, Brazil, the State port complex stands out as the largest interconnection point for the transport of cargo throughout the northern Amazon region and as the second largest port in Latin America. This port region in question, as well as the nearby industrial region, has been associated with several sources of anthropogenic impacts on coastal estuaries (Oliveira et al., 2019).

The main xenobiotic elements recorded in regions with port activities include polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and trace metals (Jena et al., 2021; Sousa et al., 2020). The port is also associated with a considerable increase in other effluents, such as domestic, commercial and agricultural effluents in the surrounding areas (Carvalho-Neta et al., 2014; Yeh et al., 2020). This

entire situation has also been worsening naturally, due to the drainage of the Mearim River into the estuary, which increases the transport of xenobiotics (mainly pesticides used in the region), thus contributing to the dispersion of these contaminants, making it difficult to monitor these coastal areas. (Pinheiro-Souza et al., 2021).

Over the years, the use of biomarkers has increasingly established itself as a viable and useful tool for monitoring the likely impacts of human activities in coastal environments (Gabriel et al., 2020; Noletto et al., 2021; Silva et al., 2020). According to the authors Carvalho-Neta et al. (2014) and Nunes et al. (2020) the most used biomarkers in studies carried out in the port region of São Marcos Bay are catalase (CAT), which is an antioxidant enzyme, and glutathione S-transferase (GST), which plays a significant role in the cellular detoxification process. Furthermore, histological changes, especially gill and liver lesions in fish, have also been investigated and validated as biomarkers (Carvalho-Neta et al., 2014; Nunes et al., 2020; Torres et al., 2023).

The biomarker technique can be applied to different aquatic organisms, such as fish, crustaceans and molluscs. Through this biological

* Corresponding author.
E-mail address: hetysalvino02@gmail.com (H.S. Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.rsma.2024.103656>

Received 2 April 2024; Received in revised form 13 June 2024; Accepted 23 June 2024

Available online 26 June 2024

2352-4055/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.