Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS)

Relatório Técnico Anual Integrado (2025) - Volume 3

Processo administrativo IBAMA N° 02001.114275/2017-00 (PMP-BS)

Outubro/2026

Relatório Técnico Anual Integrado – 01/01/2025 a 31/12/2025

Volume 3: Biomarcadores, Ações de Comunicação e Seções Finais

Relatório Técnico
Revisão 00
Outubro/2026

CONTROLE DE REVISÕES

REV.	DESCRIÇÃO	DATA
00	Emissão original	28/10/2026

	Original	Rev.01	Rev.02	Rev.03	Rev.04	Rev.05	Rev.06	Rev.07	Rev.08
Data	28/10/2026								
Elaboração	UNIVALI/ Petrobras								
Verificação	Petrobras								
Aprovação	Petrobras								

PÚBLICA

SUMÁRIO

TABELAS 6

FIGURAS 8

APRESENTAÇÃO 10

9 BIOMARCADORES 12
9.1 Introdução 12
9.1.1 Atividades Realizadas no Período 13
9.2 Recebimento e Guarda de Amostras 13
9.2.1 Distribuição Espacial Das Amostras Recebidas 16
9.3 Padronização da quantificação de adutos de dna (bpde-dna) em tecido hepático de tetrapodes marinhos 18
9.3.1 Extração de DNA pelo método salting out em tecido hepático de Sula leucogaster 19
9.3.2 Detecção de adutos de BPDE-DNA em tecido hepático de tetrápodes marinhos 19
9.3.3 Resultados das análises de detecção de adutos de BPDE-DNA em tecido hepático de tetrápodes marinhos 20
9.4 Padronização da análise de biomarcadores moleculares 21
9.4.1 Extração e limpeza do RNA total em amostras de tecido hepático de tetrápodes marinhos 22
9.4.2 Avaliação da qualidade e integridade do RNA total 23
9.4.3 Resultado da extração e qualidade do RNA total em amostras de tecido hepático de tetrápodes marinhos 23
9.5 Sequenciamento, montagem e anotação de transcriptomas de amostras hepáticas de tetrapódes marinhos 28
9.5.1 Construção de bibliotecas e sequenciamento de amostras hepáticas de tetrapódes marinhos 28
9.5.2 Montagem e anotação do transcriptoma de amostras hepáticas de tetrapódes marinhos 29
9.5.3 Desenho de Iniciadores 29
9.5.4 Resultados da montagem e anotação dos transcriptomas 32
9.6 Determinação do baseline para ajuste do limiar de transcrição em puffinus puffinus e larus dominicanus 39
9.7 Análise de biomarcadores bioquímicos, moleculares e de dano em tetrápodes marinhos 40
9.7.1 Metodologia para análise de biomarcadores bioquímicos e moleculares em tetrápodes marinhos 41

PÚBLICA

9.7.2 Biomarcadores Moleculares 45
9.7.3 Biomarcadores de dano 49
9.7.4 Análises estatísticas 49
9.8 Resultados e discussão de biomarcadores em aves marinhas 50
9.8.1 Larus dominicanus 50
9.8.2 Puffinus puffinus 59
9.8.3 Sula leucogaster 66
9.9 CONCLUSÕES 68
9.10 PRÓXIMAS ETAPAS 69
9.11 BIBLIOGRAFIA 70

10 AÇÕES DE COMUNICAÇÃO 77
10.1 Educação Ambiental 77
10.2 Divulgação 80
10.3 Divulgação Técnico-Científica 83

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS 86

EQUIPE TÉCNICA 88
Coordenação Geral 88
Coordenações Temáticas 89

APÊNDICES 91
Apêndice 01 – Ocorrências de Fauna Alvo 91
Apêndice 02 – Históricos Clínicos 91
Apêndice 03 – Necropsias 91
Apêndice 04 – Modelos Lineares Generalizados 91
Apêndice 05 – Análise de Redundância 91
Apêndice 06 – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e organohalogenados 91
Apêndice 07 – Elementos Traço 91
Apêndice 08 – Biomarcadores 91
Apêndice 09 – Ações de Educação Ambiental 92
Apêndice 10 – Coordenadas 92

PÚBLICA

TABELAS

TABELA 9.2-1. AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS PROVENIENTES DO PMP-BS DESTINADAS À ANÁLISE DE BIOMARCADORES DESDE O INÍCIO DAS ATIVIDADES ATÉ DEZEMBRO DE 2025. AS ESPÉCIES PRIORITÁRIAS PARA ANÁLISE DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E MOLECULARES ESTÃO SINALIZADAS EM AZUL. 14

TABELA 9.4-1. IDENTIFICAÇÃO DOS ESPÉCIMES DE CARETTA CARETTA, CALONECTRIS BOREALIS E SULA LEUCOGASTER CUJAS AMOSTRAS FORAM UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE RNA PARA SEQUENCIAMENTO E MONTAGEM DE TRANSCRIPTOMAS 22

TABELA 9.4-2. CONCENTRAÇÃO, PUREZA E INTEGRIDADE DOS RNAS EXTRAÍDOS DE TECIDO HEPÁTICO DE CARETTA CARETTA, CALONECTRIS BOREALIS E SULA LEUCOGASTER 24

TABELA 9.5-1. SEQUÊNCIAS DE INICIADORES SELECIONADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES ALVO EM TECIDO HEPÁTICO DE CARETTA CARETTA. 30

TABELA 9.5-2. SEQUÊNCIAS DE INICIADORES SELECIONADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES-ALVO EM TECIDO HEPÁTICO DE SULA LEUCOGASTER. 31

TABELA 9.5-3. SEQUÊNCIAS DE INICIADORES SELECIONADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES-ALVO EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS. 32

TABELA 9.5-4. MÉTRICAS DA MONTAGEM DE NOVO DO TRANSCRIPTOMA HEPÁTICO DE CARETTA CARETTA. 34

TABELA 9.5-5. MÉTRICAS DA MONTAGEM DE NOVO DO TRANSCRIPTOMA HEPÁTICO DE SULA LEUCOGASTER. 37

TABELA 9.5-6. MÉTRICAS DA MONTAGEM DE NOVO DO TRANSCRIPTOMA HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS. 38

TABELA 9.6-1. DETERMINAÇÃO DO BASELINE DO LIMIAR DE TRANSCRIÇÃO PARA OS GENES-ALVO DE PUFFINUS PUFFINUS EM UNIDADES RELATIVAS DE FLUORESCÊNCIA (RFU). OS DADOS ESTÃO APRESENTADOS COM RFU MÉDIO POR ENSAIO, ALÉM DAS RESPECTIVAS MÉDIAS, DESVIO PADRÃO (DP) E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV) PARA CADA GENE. 40

TABELA 9.6-2. DETERMINAÇÃO DO BASELINE DO LIMIAR DE TRANSCRIÇÃO PARA OS GENES-ALVO DE LARUS DOMINICANUS EM UNIDADES RELATIVAS DE FLUORESCÊNCIA (RFU). OS DADOS ESTÃO APRESENTADOS COM RFU MÉDIO POR ENSAIO, ALÉM DAS RESPECTIVAS MÉDIAS, DESVIO-PADRÃO (DP) E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV) PARA CADA GENE. 40

TABELA 9.7-1. INICIADORES SENSO (F) E ANTI-SENSO (R) SELECIONADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DOS GENES-ALVO RECEPTOR DE HIDROCARBONETO AROMÁTICO (AHR), CITOCROMO P450 1A (CYP1A4), RECEPTOR DE ESTROGÊNIO (ESR1), GLUTATIONA S-TRANSFERASE ALFA (GSTA), URIDINA DIFOSFO GLICURONILTRANSFERASE 1 (UGT1) E VITELOGENINA (VTG2) EM TECIDO HEPÁTICO DE LARUS DOMINICANUS. 48

TABELA 9.7-2. INICIADORES SENSO (F) E ANTI-SENSO (R) SELECIONADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DOS GENES ALVO RECEPTOR DE HIDROCARBONETO AROMÁTICO (AHR), CITOCROMO P450 1A (CYP1A5), RECEPTOR DE ESTROGÊNIO (ESR1), GLUTATIONA S-TRANSFERASE ALFA (GSTA), URIDINA DIFOSFO GLICURONILTRANSFERASE 1 (UGT1) E VITELOGENINA (VTG1) EM TECIDO HEPÁTICO DE PUFFINUS PUFFINUS. 48

TABELA 10.1-1 – QUANTIDADE DE PESSOAS ATINGIDAS PELAS AÇÕES DE DIVULGAÇÃO E EDUCAÇÃO AMBIENTAL DESENVOLVIDAS PELO PMP-BS NO PERÍODO DE 01/01/2025 A 31/12/2025. 79

TABELA 10.2-1 – QUANTIDADE DE REAÇÕES EM REDES SOCIAIS RELACIONADAS A PUBLICAÇÕES FEITAS PELAS INSTITUIÇÕES DO PMP-BS NO PERÍODO DE 01/01/2025 A 31/12/2025. 82

TABELA 10.3-1 – TRABALHOS ACADÊMICO-CIENTÍFICOS FINALIZADOS PELAS INSTITUIÇÕES DO PMP-BS ÁREA SC/PR, NO PERÍODO DE 01/01/2025 A 31/12/2025.....83

TABELA 10.3-2 – TRABALHOS CIENTÍFICOS FINALIZADOS PELAS INSTITUIÇÕES DO PMP-BS ÁREA SP, NO PERÍODO DE 01/01/2025 A 31/12/2025. 84

TABELA 10.3-3 - TRABALHOS CIENTÍFICOS FINALIZADOS PELAS INSTITUIÇÕES DO PMP-BS ÁREA RJ, NO PERÍODO DE 01/01/2025 A 31/12/2025.....85

PÚBLICA

FIGURAS

FIGURA 9.2-1. DISTRIBUIÇÃO DAS OCORRÊNCIAS DE CARCAÇAS DE AVES MARINHAS (CALONECTRIS BOREALIS, LARUS DOMINICANUS, PUFFINUS PUFFINUS E SULA LEUCOGASTER), A PARTIR DAS QUAIS FORAM COLETADAS AMOSTRAS DE FÍGADO PARA ANÁLISES DE BIOMARCADORES. 16

FIGURA 9.2-2. DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE QUELÔNIOS (CARETTA CARETTA, LEPIDOCHELYS OLIVACEA E CHELONIA MYDAS) A PARTIR DAS QUAIS FORAM COLETADAS AMOSTRAS DE FÍGADO PARA ANÁLISES DE BIOMARCADORES. 17

FIGURA 9.2-3. DISTRIBUIÇÃO DAS OCORRÊNCIAS DE CARCAÇAS DE BOTO CINZA, SOTALIA GUIANENSIS, A PARTIR DAS QUAIS FORAM COLETADAS AMOSTRAS DE FÍGADO PARA ANÁLISES DE BIOMARCADORES. 18

FIGURA 9.3-1 CURVA PADRÃO DE ADUTOS DE BENZO[A]PIRENO DIOL EPÓXIDO (BPDE-DNA) (NG/ML). 21

FIGURA 9.4-1. PERFIL ELETROFORÉTICO DE RNA EM GEL DE AGAROSE 1,2% COM FORMALDEÍDO DAS AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO DE CARETTA CARETTA E SULA LEUCOGASTER. 25

FIGURA 9.4-2. PERFIL ELETROFORÉTICO DE RNA EM GEL DE AGAROSE 1,2% COM FORMALDEÍDO DAS AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS. 25

FIGURA 9.4-3. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA DE CARETTA CARETTA NO SCREEN TAPE NO SISTEMA TAPESTATION. À ESQUERDA A VISÃO DO GEL EXIBINDO AS BANDAS DE ALTO PESO MOLECULAR DEFINIDAS E À DIREITA O ELETROFEROGRAMA DA AMOSTRA EXIBINDO OS PICOS DEFINIDOS DAS SUBUNIDADES 18S E 28S 26

FIGURA 9.4-4. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA DE SULA LEUCOGASTER NO SCREEN TAPE NO SISTEMA TAPESTATION. À ESQUERDA A VISÃO DO GEL EXIBINDO AS BANDAS DE ALTO PESO MOLECULAR DEFINIDAS E À DIREITA O ELETROFEROGRAMA DA AMOSTRA EXIBINDO OS PICOS DEFINIDOS DAS SUBUNIDADES 18S E 28S. 27

FIGURA 9.4-5. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA DE CALONECTRIS BOREALIS NO SCREEN TAPE NO SISTEMA TAPESTATION. À ESQUERDA A VISÃO DO GEL EXIBINDO AS BANDAS DE ALTO PESO MOLECULAR DEFINIDAS E À DIREITA O ELETROFEROGRAMA DA AMOSTRA EXIBINDO OS PICOS DEFINIDOS DAS SUBUNIDADES 18S E 28S. 28

FIGURA 9.5-1. QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS BRUTAS SENSO E ANTISSENSO DE CARETTA CARETTA. O EIXO X REPRESENTA A POSIÇÃO DAS LEITURAS DE CADA NUCLEOTÍDEO E O EIXO Y, A NOTA PHRED MÉDIA. 33

FIGURA 9.5-2. QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS FILTRADAS SENSO E ANTISSENSO DE CARETTA CARETTA. O EIXO X REPRESENTA A POSIÇÃO DAS LEITURAS DE CADA NUCLEOTÍDEO E O EIXO Y, A NOTA PHRED MÉDIA. 34

FIGURA 9.5-3. QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS BRUTAS SENSO E ANTISSENSO DE SULA LEUCOGASTER. O EIXO X REPRESENTA A POSIÇÃO DAS LEITURAS DE CADA NUCLEOTÍDEO E O EIXO Y, A NOTA PHRED MÉDIA. 35

FIGURA 9.5-4. QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS FILTRADAS SENSO E ANTISSENSO DE SULA LEUCOGASTER. O EIXO X REPRESENTA A POSIÇÃO DAS LEITURAS DE CADA NUCLEOTÍDEO E O EIXO Y, A NOTA PHRED MÉDIA. 36

FIGURA 9.5-5. QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS FILTRADAS SENSO E ANTISSENSO DE CALONECTRIS BOREALIS. O EIXO X REPRESENTA A POSIÇÃO DAS LEITURAS DE CADA NUCLEOTÍDEO E O EIXO Y, A NOTA PHRED MÉDIA. 38

FIGURA 9.8-1. (A) ATIVIDADE GST E NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE (B) AHR E (C) ESR1 EM TECIDO HEPÁTICO DE LARUS DOMINICANUS AGRUPADOS DE ACORDO COM OS NÍVEIS TOTAIS DE DDTS NO TECIDO HEPÁTICO. 51

FIGURA 9.8-2. MAPA DE CALOR DAS CORRELAÇÕES DE SPEARMAN PARA-A-PAR PARA BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E MOLECULARES E NÍVEIS DE HPA E ORGANOHALOGENADOS BIOACUMULADOS NO TECIDO HEPÁTICO DE LARUS DOMINICANUS. *INDICAM CORRELAÇÕES SIGNIFICATIVAS (P < 0,05). 53

FIGURA 9.8-3. ATIVIDADE (A) EROD E (B) GST E NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE (C) ESR1 E (D) UGT1 EM TECIDO HEPÁTICO DE LARUS DOMINICANUS CATEGORIZADOS PELO ESCORE CORPORAL. 54

FIGURA 9.8-4. ATIVIDADE (A) EROD E NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE (B) CYP1A (C) ESR1 E (D) UGT1 EM TECIDO HEPÁTICO DE LARUS DOMINICANUS CATEGORIZADOS PELA FAIXA ETÁRIA. 56

FIGURA 9.8-5. NÍVEIS DE CONTAMINANTES EM TECIDO HEPÁTICO DE LARUS DOMINICANUS. OS NÍVEIS DE (A) ΣHPA, (B) 16 HPA PRIORITÁRIOS (C) PCB E (D) ΣDDTS FORAM ANALISADOS EM LARUS DOMINICANUS QUANTO À INFLUÊNCIA DO FATOR FAIXA ETÁRIA. 57

FIGURA 9.8-6. ATIVIDADE EROD EM TECIDO HEPÁTICO DE LARUS DOMINICANUS CATEGORIZADOS PELA ESTAÇÃO DO ANO 58

FIGURA 9.8-7. ATIVIDADE (A) EROD E (B) GST E NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE (C) CYP1A, (D) ESR1 E (E) UGT1 EM TECIDO HEPÁTICO DE LARUS DOMINICANUS CATEGORIZADOS PELO ANO DE COLETA. 59

FIGURA 9.8-8. (A) ATIVIDADE GST E NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE (B) CYP1A5 E (C) UGT1 EM TECIDO HEPÁTICO DE PUFFINUS PUFFINUS AGRUPADOS DE ACORDO COM OS NÍVEIS TOTAIS DE HCB NO TECIDO HEPÁTICO. 60

FIGURA 9.8-9. MAPA DE CALOR DAS CORRELAÇÕES DE SPEARMAN PARA-A-PAR PARA BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E MOLECULARES E NÍVEIS DE HPA E ORGANOHALOGENADOS BIOACUMULADOS NO TECIDO HEPÁTICO DE PUFFINUS PUFFINUS. * INDICAM CORRELAÇÕES SIGNIFICATIVAS (P < 0,05). 61

FIGURA 9.8-10. ATIVIDADE EROD E (B) NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE CYP1A5 EM AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO DE PUFFINUS PUFFINUS CATEGORIZADAS PELO FATOR ÓLEO NAS PENAS. 63

FIGURA 9.8-11. NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE CYP1A5 EM TECIDO HEPÁTICO DE PUFFINUS PUFFINUS CATEGORIZADOS PELA ESTAÇÃO DO ANO. 64

FIGURA 9.8-12. ATIVIDADE (A) EROD E (B) GST E NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE (C) AHR, (D) ESR1, (E) UGT1 E (F) VTG1 EM AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO DE PUFFINUS PUFFINUS CATEGORIZADAS PELO ANO DE COLETA. 65

FIGURA 9.8-13. NÍVEIS PROTEICOS DE CYP1A (UA) EM AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO DE SULA LEUCOGASTER CATEGORIZADAS POR ESTAÇÃO DO ANO. 67

PÚBLICA

APRESENTAÇÃO

O Projeto de Monitoramento de Praias (PMP-BS) é um dos projetos regionais concebidos e executados, para atender condicionantes dos processos de licenciamento ambiental de empreendimentos da PETROBRAS na Bacia de Santos. Estes processos são conduzidos pela Coordenação Geral de Licenciamento Ambiental de Empreendimentos Marinhos e Costeiros (CGMAC), da Diretoria de Licenciamento Ambiental (DILIC), do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). O processo administrativo IBAMA que contempla o PMP-BS é o nº 02001.114275/2017-00. As atividades do PMP-BS iniciaram em agosto de 2015 e têm-se desenvolvido ininterruptamente até o momento.

Atualmente, a execução do PMP-BS é coordenada por três instituições, cada uma com foco em uma região geográfica: Área SC/PR, coordenada pela Univali (Universidade do Vale do Itajaí); Área SP, coordenada pela empresa Mineral Engenharia e Meio Ambiente; e Área RJ, coordenada pela empresa Econservation Estudos e Projetos Ambientais. A execução das atividades de monitoramento e reabilitação de fauna conta com a participação de diversas instituições pertencentes à REMASUL (Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Sul) e à REMASE (Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Sudeste), ambas componentes da REMAB (Rede de Encalhe e Informação de Mamíferos Aquáticos do Brasil), e Fundação Pró-Tamar.

O PMP-BS também contempla a realização de análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), organohalogenados e de elementos traço, realizadas a partir de tecidos extraídos de animais encontrados mortos no monitoramento de praias. Tais análises são executadas por laboratórios da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio).

As análises de Biomarcadores Bioquímicos e Moleculares são realizadas em amostras de fígado de carcaças frescas (código 2) que não receberam nenhum tipo de tratamento ou passaram por procedimentos veterinários e foram analisadas pelo Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (LABCAI/UFSC).

Desde 2025, o PMP-BS passou a incluir em suas atividades a implantação de rastreadores satelitais em pinípedes antárticos e subantárticos que fossem reabilitados em suas instalações (Parecer Técnico nº 259/2023-COPROD/CGMAC/DILIC 16172941).

Este Relatório Técnico Anual foi elaborado pela UNIVALI, utilizando os dados coletados por todas as instituições que executam o PMP-BS de Santa Catarina ao Rio de Janeiro, com suporte das outras duas instituições que coordenam o PMP-BS em cada área. Os conteúdos relativos às análises de HPA, organohalogenados e elementos traço foram produzidos pela PUC-Rio e os de Biomarcadores pelo LABCAI/UFSC.

Para facilitar a elaboração e leitura do relatório, ele foi dividido em quatro volumes que apresentam os seguintes conteúdos:

- Resumo Executivo;
- Volume 1 - Introdução (capítulo 1), Atividades de exploração e produção de petróleo – E&P (capítulo 2), Monitoramento de Praias (capítulo 3), Resíduos Sólidos, Oleosos e Fauna Oleada (capítulo 4) e Atendimento Veterinário (capítulo 5), Equipe técnica;
- Volume 2 - Análises espaço-temporal integrada (capítulo 6), Hidrocarbonetos Policícliocos Aromáticos (HPA) e Organoclorados (capítulo 7), Elementos traço (capítulo 8), Equipe técnica;
- Volume 3 – Biomarcadores (capítulo 9), Ações de comunicação (capítulo 10), Considerações finais (capítulo 11), Equipe técnica e apêndices.

PÚBLICA

9 BIOMARCADORES

9.1 INTRODUÇÃO

O ambiente natural está sujeito a alterações contínuas, sejam de origem natural ou decorrentes de ações antrópicas. A magnitude dos impactos antropogênicos reforça a necessidade de monitoramento das condições ambientais, visando subsidiar estratégias de gerenciamento e mitigação de danos. Nesse cenário, a análise de biomarcadores consolida-se como uma ferramenta viável e amplamente utilizada para avaliar a exposição da biota a xenobióticos e os subsequentes efeitos biológicos (HUGGETT et al., 2002).

Biomarcadores são definidos como alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou fisiológicas medidas em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos, que indicam a exposição a xenobióticos e/ou seus efeitos sobre os organismos (LAM; GRAY, 2003; LIVINGSTONE, 1993; WALKER, 1995). Esses

indicadores fornecem informações precoces sobre os efeitos da contaminação em níveis inferiores de organização biológica, como células e tecidos, permitindo a detecção de alterações antes da manifestação de impactos mais severos em populações, comunidades ou ecossistemas (CAJARAVILLE et al., 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Dentre os biomarcadores frequentemente empregados em estudos ambientais, destacam-se as enzimas envolvidas na biotransformação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e compostos organohalogenados. Essas enzimas, presentes nas células de todos os organismos vivos, catalisam reações de oxidação e conjugação, aumentando a hidrossolubilidade dos contaminantes e favorecendo sua eliminação do organismo.

Embora sejam ferramentas extremamente úteis, Den Besten (1998) destaca que a eficácia dos biomarcadores como indicadores de alterações na homeostase do organismo depende do estabelecimento prévio de valores de referência (“valores normais” e “alterados”) para cada espécie e tecido analisado. Além disso, as particularidades bioquímicas e metabólicas de diferentes tecidos e espécies tornam necessárias adequações dos ensaios para a análise de biomarcadores, a

PÚBLICA

fim de garantir que as técnicas utilizadas retratem de forma fidedigna os processos bioquímicos e moleculares inerentes a cada modelo biológico (BEGER et al., 2017).

9.1.1 Atividades Realizadas no Período

O presente documento descreve as atividades realizadas ao longo do ano de 2025, conforme detalhado a seguir: (i) padronização do ensaio para detecção dos níveis de adutos de DNA (benzo[a]pireno diol epóxido – BPDE-DNA) em tetrápodes marinhos; (ii) padronização de biomarcadores moleculares, incluindo a montagem e a anotação dos transcriptomas hepáticos de *C. caretta*, *C. borealis* e *S. leucogaster*, bem como a padronização dos ensaios de qPCR e o estabelecimento do *baseline* para ajuste do limiar para quantificação de transcrição dos genes-alvo em *P. puffinus* e *L. dominicanus*; (iii) análises de biomarcadores moleculares em tecido hepático de *P. puffinus* e *L. dominicanus*; e (iv) análises de biomarcadores bioquímicos: determinação das atividades EROD e GST em amostras hepáticas de *P. puffinus* e *L. dominicanus*, bem como a quantificação dos níveis proteicos de CYP1A em amostras de tecido hepático de *S. leucogaster* provenientes do PMP-BS.

9.2 RECEBIMENTO E GUARDA DE AMOSTRAS

Até 31 de dezembro de 2025, encontravam-se sob guarda do LABCAI amostras hepáticas de 5.485 indivíduos provenientes do PMP-BS, abrangendo 80 espécies distintas (**Tabela 9.2-1**). Desse total, 567 amostras foram recebidas no período entre 1 de janeiro e 31 de dezembro de 2025.

Entre as amostras sob custódia, 2.821 pertencem a espécies prioritárias, sendo destinadas às análises de biomarcadores bioquímicos e moleculares. O sumário dessas amostras foi elaborado com base nas informações disponíveis no Sistema de Monitoramento da Biota Aquática (SIMBA) até 31 de dezembro de 2025.

PÚBLICA

Tabela 9.2-1. *Amostras de indivíduos provenientes do PMP-BS destinadas à análise de biomarcadores desde o início das atividades até dezembro de 2025. As espécies prioritárias para análise de biomarcadores bioquímicos e moleculares estão sinalizadas em azul.*

Grupo taxonômico	Espécie	Número de indivíduos amostrados
Classe Reptilia		
Ordem Testudinata	*Chelonia mydas*	1.561
	Caretta caretta	92
	Lepidochelys olivacea	10
	Eretmochelys imbricata	6
	Dermochelys coriacea	4
Classe Aves		
Ordem Sphenisciformes	*Spheniscus magellanicus*	1.757
Ordem Charadriiformes	*Larus dominicanus*	375
	Thalasseus acuflavidus	20
	Sterna hirundinacea	18
	Sterna sp.	12
	Sterna hirundo	15
	Pluvialis dominica	1
	Thalasseus maximus	6
	Haematopus palliatus	5
	Himantopus melanurus	4
	Rynchops niger	3
	Charadrius semipalmatus	1
	Stercorarius antarcticus	1
	Stercorarius maccormicki	1
	Tringa melanoleuca	2
	Charadrius collaris	1
	Sterna trudeaui	1
	Stercorarius parasiticus	2
	Stercorarius sp.	1
Ordem Procellariiformes	*Puffinus puffinus*	337
	Procellaria sp.	1
	Procellaria aequinoctialis	53
	Procellaria cinerea	1
	Puffinus gravis	32
	Puffinus griseus	7
	Puffinus sp.	2
	Calonectris sp.	26
	Calonectris diomedea	9
	Calonectris diomedea borealis	48
	Thalassarche melanophris	24
	Thalassarche chlororhynchos	10
	Pterodroma mollis	8
	Macronectes giganteus	3
	Oceanites oceanicus	3
	Pachyptila sp.	2
	Pachyptila desolata	4
	Pterodroma incerta	5
	Halobaena caerulea	1
	Fulmarus glacialoides	2
	Calonectris edwardsii	1
	Pterodroma sp.	1
Ordem Suliformes	*Sula leucogaster*	222
	Phalacrocorax brasilianus	165
	Fregata magnificens	104
Ordem Pelecaniformes	*Phimosus infuscatus*	4

Grupo taxonômico	Espécie	Número de indivíduos amostrados
	Egretta thula	3
	Ardea cocoi	1
	Ardea alba	7
	Nycticorax nycticorax	16
Classe Mammalia		
Ordem Cetacea		
Subordem Odontoceti	*Pontoporia blainvillei*	231
	Sotalia guianensis	150
	Stenella frontalis	25
	Tursiops truncatus	11
	Tursiops truncatus gephyreus	2
	Kogia breviceps	5
	Steno bredanensis	5
	Mesoplodon sp.	1
	Delphinus delphis	3
	Lagenodelphis hosei	3
	Globicephala macrorhynchus	2
	Stenella longirostris	2
	Stenella attenuata	2
	Stenella sp.	6
	Stenella clymene	1
	Delphinidae sp.	1
	Grampus griseus	1
	Kogia sima	1
	Phocoena dioptrica	1
	Ziphius sp.	1
Subordem Mysticeti	*Megaptera novaeangliae*	7
	Eubalaena australis	1
	Balaenoptera acutorostrata	2
Ordem Carnivora	*Arctocephalus australis*	15
	Arctocephalus tropicalis	4
	Lontra longicaudis	1
TOTAL: 80 espécies		

TOTAL: 5.485 indivíduos, cujas informações foram obtidas no SIMBA em 31/12/2025.

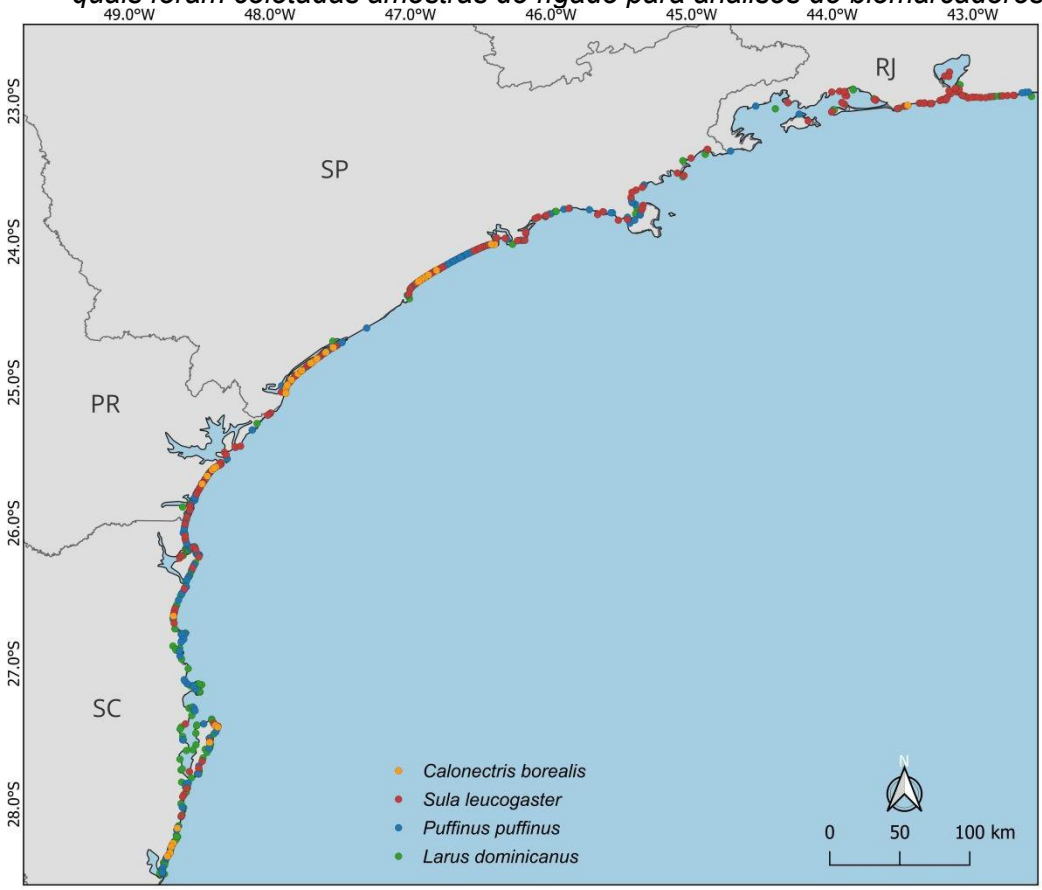
As 567 amostras hepáticas coletadas no âmbito do PMP-BS e recebidas pelo LABCAI/UFSC, entre janeiro a dezembro de 2025, foram consideradas adequadas para a execução das análises de biomarcadores. As amostras encontram-se armazenadas em freezer -80ºC, garantindo a preservação de sua integridade para as etapas analíticas subsequentes.

9.2.1 Distribuição Espacial Das Amostras Recebidas

As amostras das espécies prioritárias (*C. borealis*, *L. dominicanus*, *P. puffinus*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *C. mydas*, *L. olivacea* e *S. guianensis*) foram obtidas nos diferentes trechos que compõem a área de abrangência do PMP-BS.

A distribuição geográfica das amostras de aves prioritárias (*C. borealis*, *P. puffinus*, *L. dominicanus* e *S. leucogaster*), coletadas no âmbito do PMP-BS e encaminhadas ao LABCAI, está apresentada na **Figura 9.2-1**.

Figura 9.2-1. *Distribuição das ocorrências de carcaças de aves marinhas (Calonectris borealis, Larus dominicanus, Puffinus puffinus e Sula leucogaster), a partir das quais foram coletadas amostras de fígado para análises de biomarcadores.*



A distribuição geográfica das amostras das espécies prioritárias de quelônios (*C. caretta, L. olivacea* e *C. mydas*) coletadas no âmbito do PMP-BS e atualmente armazenadas no LABCAI está indicada na **Figura 9.2-2**.

PÚBLICA

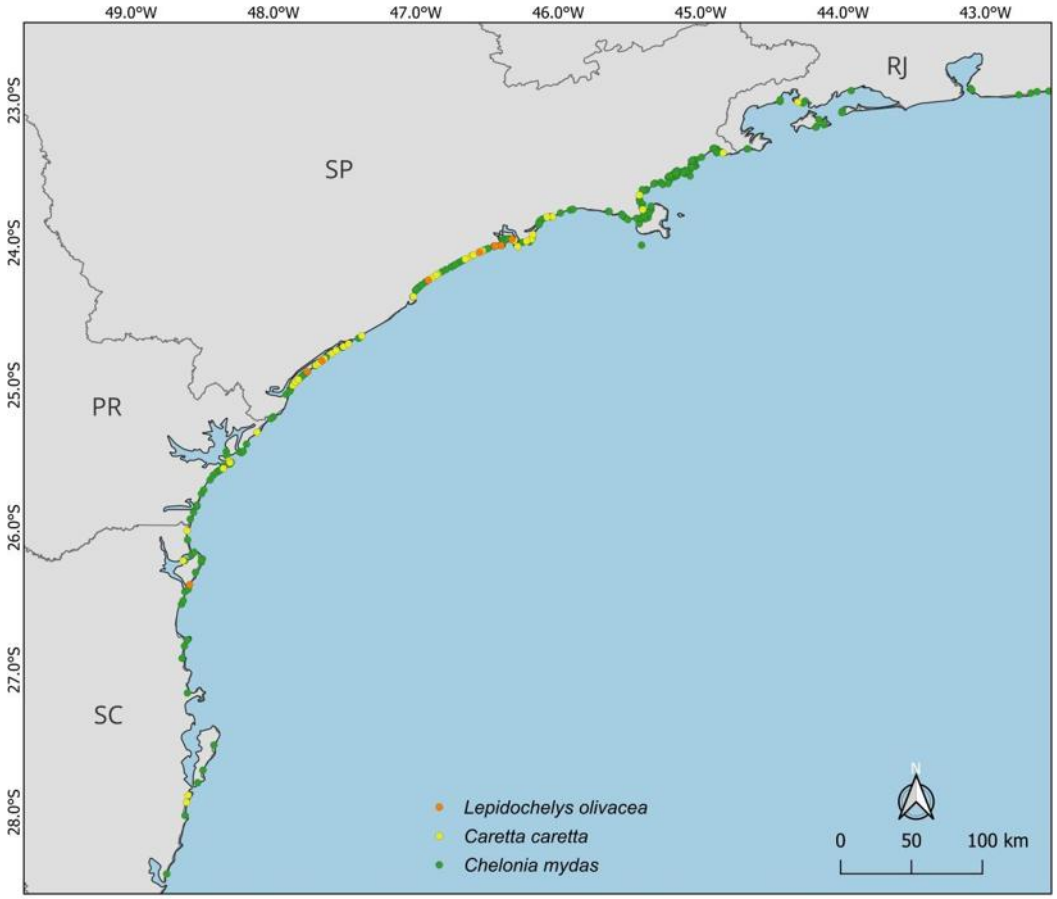


***Figura 9.2-2**. Distribuição da ocorrência de quelônios (Caretta caretta, Lepidochelys olivacea e Chelonia mydas) a partir das quais foram coletadas amostras de fígado para análises de biomarcadores.*

A distribuição geográfica de ocorrência das carcaças de cetáceos da espécie *S. guianensis*, cujas amostras de tecido hepático foram coletadas no âmbito do PMP-BS para análise de biomarcadores, está apresentada na **Figura 9.2-3**.

PÚBLICA

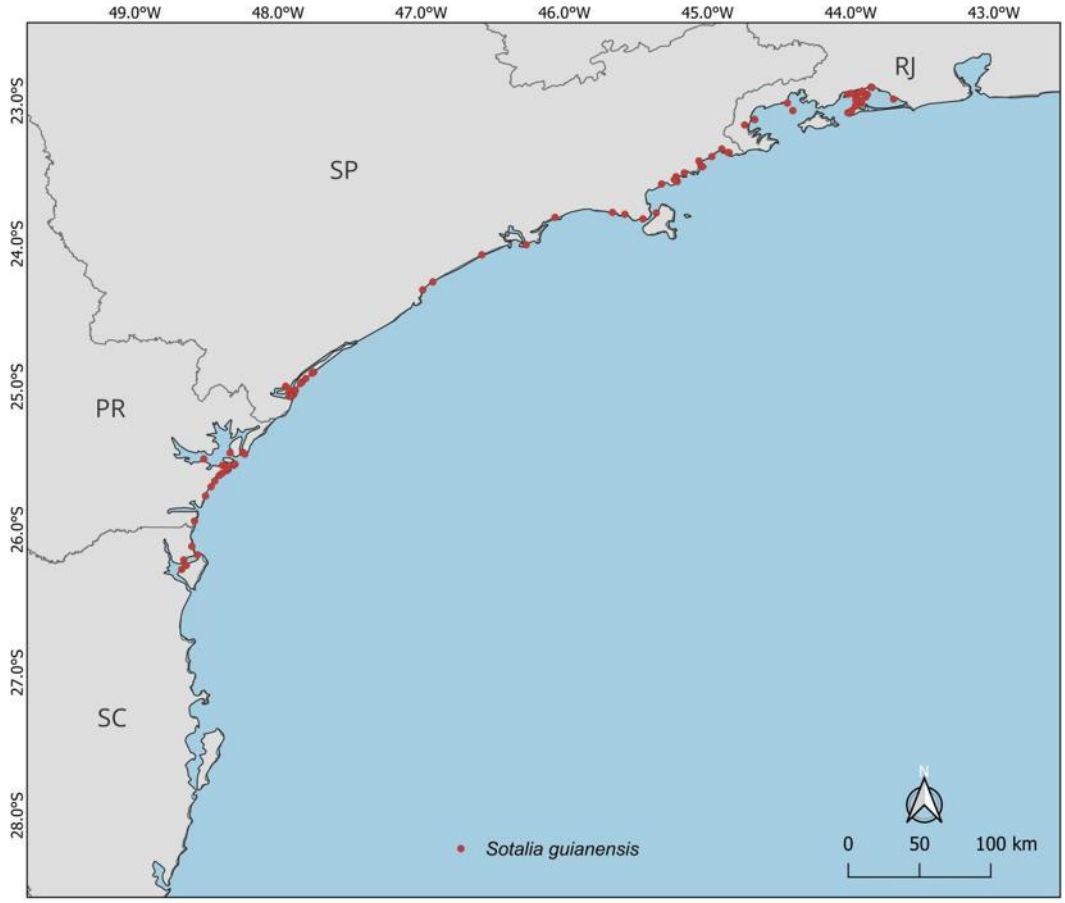


***Figura 9.2-3**. Distribuição das ocorrências de carcaças de boto cinza, Sotalia guianensis, a partir das quais foram coletadas amostras de fígado para análises de biomarcadores.*

9.3 PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE ADUTOS DE DNA (BPDE-DNA) EM TECIDO HEPÁTICO DE TETRAPODES MARINHOS

A quantificação dos níveis de BPDE-DNA foi realizada por meio de imunoensaio enzimático (ELISA), utilizando o kit Oxyselect™ BPDE DNA Adduct ELISA, de acordo com o protocolo do fabricante. Na quantificação por ELISA, a quantidade de adutos de BPDE nas amostras de DNA é determinada por comparação relativa com uma curva padrão, com intervalo de concentrações entre 25 e 0,78125 ng/mL de BPDE-DNA.

Para a padronização do ensaio, foram utilizadas amostras de tecido hepático de espécimes de *S. leucogaster* provenientes do PMP-BS. Ressalta-se que,

PÚBLICA

embora a padronização tenha sido realizada para esta espécie, os resultados são aplicáveis a todas as espécies prioritárias do projeto, uma vez que a natureza da amostra analisada, DNA genômico purificado, apresenta equivalência entre as diferentes espécies estudadas.

9.3.1 Extração de DNA pelo método salting out em tecido hepático de Sula leucogaster

Aproximadamente 25 mg de tecido hepático de cada amostra foram macerados e incubados a 40°C por uma hora em 500 µL de solução tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 0,4 M, EDTA 20 mM, SDS 0,5%, proteinase K 0,4 mg/mL, pH 7,5). Após a etapa de lise, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x *g*, por 20 min a 4°C, e 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, no qual foram adicionados 300 µL de NaCl 5M. O homogenato, composto pelo lisado e NaCl, foi centrifugado novamente a 10.000 x*g* por 15 min a 4°C, e 6 00µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para um novo tubo. Em seguida, o sobrenadante foi misturado com isopropanol na proporção de 1:1 (v:v), agitado e centrifugado (10.000 x*g*, 15 min a 4ºC) para promover a precipitação do DNA. O precipitado de DNA obtido foi lavado duas vezes com 750 µL etanol (75%), seco e ressuspendido em tampão TE 1x.

O DNA extraído foi avaliado quanto à concentração (260 nm) e pureza, por meio da análise das razões 260/280 (qualidade aceitável > 1,8) e 260/230 (qualidade aceitável > 1,7), utilizando espectrofotômetro NanoDrop®One (Thermo Fisher Scientific®) (WIECZOREK; DELAURIERE; SCHAGAT, 2012).

9.3.2 Detecção de adutos de BPDE-DNA em tecido hepático de tetrápodes marinhos

Para a detecção dos níveis de adutos de DNA, o DNA extraído das amostras foi diluído em tampão TE 1x (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) até a concentração de 4 µg.mL^{-1}, conforme indicado pelo fabricante.

Após a diluição em TE 1x, 50 µL de cada amostra ou dos padrões de BPDE-DNA foram adicionados a uma microplaca de alta afinidade para DNA. Em seguida, 50 µL da solução de ligação foram adicionados a cada poço para promover a

ligação do DNA à microplaca. A placa foi incubada *overnight* (16 h) sob agitação orbital.

Após a incubação, o conteúdo da microplaca foi removido por inversão, e os poços foram lavados duas vezes com PBS (NaCl 0,137mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH 7,4). Em seguida, a microplaca foi incubada por 1 h a 25°C com 200 µL do diluente/solução de bloqueio em cada poço.

Posteriormente, a placa foi submetida a uma série de lavagem e incubação com anticorpos, na seguinte sequência: (i) remoção da solução diluente/bloqueio;

(ii) incubação com anticorpo primário anti-BPDE-I por 1 h; (iii) cinco lavagens com tampão de lavagem para remoção do anticorpo primário livre; (iv) incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 h; e (v) cinco lavagens com tampão de lavagem.

Após a última lavagem, 100 µL da solução de substrato foram adicionados aos poços, e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 min. A reação enzimática foi interrompida com a solução de parada, e a absorbância foi medida imediatamente a 450 nm em espectrofotômetro SpectraMax® iD3 (Molecular Devices®). A concentração de adutos de BPDE-DNA foi expressa em ng/mL, com base em uma curva padrão de BPDE-DNA composta por seis pontos (25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78125 ng/mL) e um branco.

9.3.3 Resultados das análises de detecção de adutos de BPDE-DNA em tecido hepático de tetrápodes marinhos

Foi possível construir uma curva padrão com alta linearidade, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9955 (**Figura 9.3-1**). No entanto, todas as amostras analisadas apresentaram valores abaixo do limite inferior de quantificação da curva, correspondente (0,781 ng/mL). Assim, qualquer amostra com absorbância inferior àquela correspondente a essa concentração foi considerada abaixo do limite de detecção (< LD).

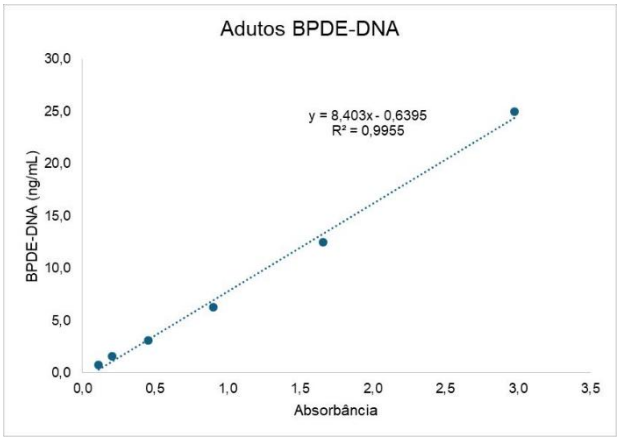


Figura 9.3-1 *Curva padrão de adutos de benzo[a]pireno diol epóxido (BPDE-DNA) (ng/mL).*

9.4 PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE DE BIOMARCADORES MOLECULARES

As atividades de padronização de análises moleculares descritas nesterelatório anual compreendem: (i) a extração, limpeza, avaliação da qualidade do RNA total, bem como o sequenciamento, seguido da montagem e anotação dos transcriptomas hepáticos de C. caretta, C. borealis e S. leucogaster; e (ii) a padronização dos ensaios de qPCR e determinação do baseline para ajuste do limiar de transcrição em L. dominicanus e P. puffinus.

Conforme apresentado no RTAP 2025, para a padronização de técnicas moleculares nas novas espécies prioritárias é necessário, inicialmente, identificar as sequências gênicas referentes aos genes-alvo selecionados para o segundo ciclo do projeto, através do sequenciamento e montagem de transcriptoma global qualitativo para cada uma das espécies prioritárias.

Na extração de RNA realizada anteriormente, a maioria das amostras não atendeu aos parâmetros de qualidade exigidos para o sequenciamento. Dessa forma, foi realizada uma nova extração de RNA, seguida de uma etapa de limpeza do RNA total e de avaliação da qualidade e integridade do RNA extraído de C. caretta, C. borealis, e S. leucogaster. Os espécimes dos quais o RNA total foi extraído e enviado para sequenciamento estão listados na Tabela 9.4-1.

***Tabela 9.4-1**. Identificação dos espécimes de Caretta caretta, Calonectris borealis e Sula leucogaster cujas amostras foram utilizadas para extração de RNA para sequenciamento e montagem de transcriptomas*

Espécie	Código LABCAI	Identificação da amostra - SIMBA	Instituição de origem	PMP
Caretta caretta	CC016	153824	Univille	PMP-BS
Caretta caretta	CC021	163288	IPeC	PMP-BS
Caretta caretta	CC025	198491	GREMAR	PMP-BS
Caretta caretta	CC026	201036	GREMAR	PMP-BS
Caretta caretta	CC029	212381	BIOPESCA	PMP-BS
Caretta caretta	CC038	254582	IPeC	PMP-BS
Caretta caretta	CC044	203905	Argonauta	PMP-BS
Caretta caretta	CC046	90532	Biopesca	PMP-BS
Calonectris borealis	CB166	109403	GREMAR	PMP-BS
Calonectris borealis	CB167	195086	GREMAR	PMP-BS
Calonectris borealis	CB168	204144	Visão Ambiental	PMP-SE/AL
Calonectris borealis	CB169	185488	GREMAR	PMP-BS
Calonectris borealis	CB170	98508	UFPR	PMP-BS
Calonectris borealis	CB171	109491	UFPR	PMP-BS
Sula leucogaster	SU061	187286	CTA/Econservation	PMP-BS
Sula leucogaster	SU076	126632	CTA/Econservation	PMP-BS
Sula leucogaster	SU091	201642	IPeC	PMP-BS
Sula leucogaster	SU094	160071	GREMAR	PMP-BS
Sula leucogaster	SU152	50399	UDESC	PMP-BS
Sula leucogaster	SU156	53289	Univali	PMP-BS

9.4.1 Extração e limpeza do RNA total em amostras de tecido hepático de tetrápodes marinhos

O RNA total de cada amostra foi extraído individualmente utilizando o reagente Qiazol® (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante, para amostras de tecido hepático de *C. caretta*, *C. borealis* e *S. leucogaster*. O RNA extraído foi seco a 40°C e ressuspendido em água livre de DNase e RNase, padrão para biologia molecular.

Para garantir a qualidade necessária exigida para o sequenciamento do RNA, foi realizada uma etapa de tratamento de cada amostra de RNA com DNase I (Qiagen), seguidas de limpeza e purificação de possíveis substâncias interferentes (proteínas, carboidratos e sais) utilizando o kit comercial RNeasy MinElute Cleanup® (Qiagen).

9.4.2 Avaliação da qualidade e integridade do RNA total

O RNA obtido de todas as amostras foi avaliado quanto à concentração (260 nm) e à pureza, por meio da análise das razões 260/280 (qualidade aceitável > 1,8) e 260/230 (qualidade aceitável > 1,7), utilizando espectrofotômetro NanoDrop® One (Thermo Fisher Scientific®) (WIECZOREK; DELAURIERE; SCHAGAT, 2012).

Devido à necessidade de altos níveis de integridade do RNA para o sequenciamento e montagem de transcriptomas, o RNA extraído e purificado foi também submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído. Nessa técnica, a integridade do material pode ser observada por meio da presença de duas bandas bem definidas, referentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. Em materiais completamente íntegros, observa-se uma proporção de 2:1 na intensidade das bandas referentes às subunidades 28S e 18S, respectivamente. Por outro lado, a ausência ou baixa definição dessas bandas sugere degradação do RNA.

As amostras de RNA de tecido hepático de *C. caretta, C. borealis* e *S. leucogaster* foram quantificadas por fluorimetria utilizando o equipamento Qubit (Invitrogen), e a integridade do RNA foi verificada por amostragem no equipamento TapeStation system com RNA Screen Tape (Agilent Technologies). Apenas as amostras CC046, CB169 e SU091 foram utilizadas para a avaliação do número de integridade de RNA (RIN).

9.4.3 Resultado da extração e qualidade do RNA total em amostras de tecido hepático de tetrápodes marinhos

Os resultados de concentração, pureza e integridade dos RNAs extraídos são apresentados na **Tabela 9.4-2**. As amostras apresentaram valores adequados para as razões A260/A280 e A260/A230, bem como concentração suficiente, com exceção da amostra CC046, que apresentou razão A260/A230 de 1,53. Entretanto, considerando que a disponibilidade de amostras de *C. caretta* que atendam aos critérios necessários para o sequenciamento é limitada, optou-se por prosseguir com a avaliação da integridade do RNA extraído dessa amostra (CC046) em conjunto com as demais.

Tabela 9.4-2. *Concentração, pureza e integridade dos RNAs extraídos de tecido hepático de Caretta caretta, Calonectris borealis e Sula leucogaster*

Espécie	Código amostra	Concentração de RNA (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
Quelônios				
Caretta caretta	CC016	2408,90	2,14	2,33
Caretta caretta	CC021	1837,30	2,15	2,33
Caretta caretta	CC025	1663,60	2,15	2,37
Caretta caretta	CC026	2747,90	2,13	2,32
Caretta caretta	CC029	2237,80	2,14	2,30
Caretta caretta	CC038	1135,10	2,03	1,95
Caretta caretta	CC044	1279,60	2,04	1,87
Caretta caretta	CC046	2412,50	1,93	1,53
Aves				
Calonectris borealis	CB166	2695,5	2,11	2,34
Calonectris borealis	CB167	2521,6	2,11	2,33
Calonectris borealis	CB168	2637,7	2,11	2,28
Calonectris borealis	CB169	2942,9	2,12	2,34
Calonectris borealis	CB170	2896,4	2,12	2,34
Calonectris borealis	CB171	2863,9	2,12	2,35
Sula leucogaster	SU061	2447,10	2,17	2,31
Sula leucogaster	SU076	2667,50	2,12	2,29
Sula leucogaster	SU091	3560,60	2,14	2,33
Sula leucogaster	SU094	2813,00	2,14	2,28
Sula leucogaster	SU152	2551,20	2,14	2,28
Sula leucogaster	SU156	3795,90	2,13	2,33

Na **Figura 9.4-1** e na **Figura 9.4-2** são apresentados os perfis eletroforéticos em gel de agarose 1,2% com formaldeído das amostras cujo RNA total foi extraído. É possível observar, pela presença de um “rastro” no gel, que algumas amostras apresentaram RNA consideravelmente degradado, sendo, portanto, inadequadas para o sequenciamento e a montagem do transcriptoma. Mais especificamente, as amostras SU061 e SU076 de *S. leucogaster* não apresentaram bandas específicas no tamanho esperado, o que indica alta degradação do material genético (**Figura 9.4-1**).

Para *C. caretta*, as amostras CC026 e CC046 foram consideradas candidatas ao sequenciamento; entretanto, não apresentam bandas bem definidas (**Figura 9.4-1**). Já para *C. borealis*, as amostras CB168, CB169 e CB170 foram selecionadas para o sequenciamento de RNA (**Figura 9.4-2**).

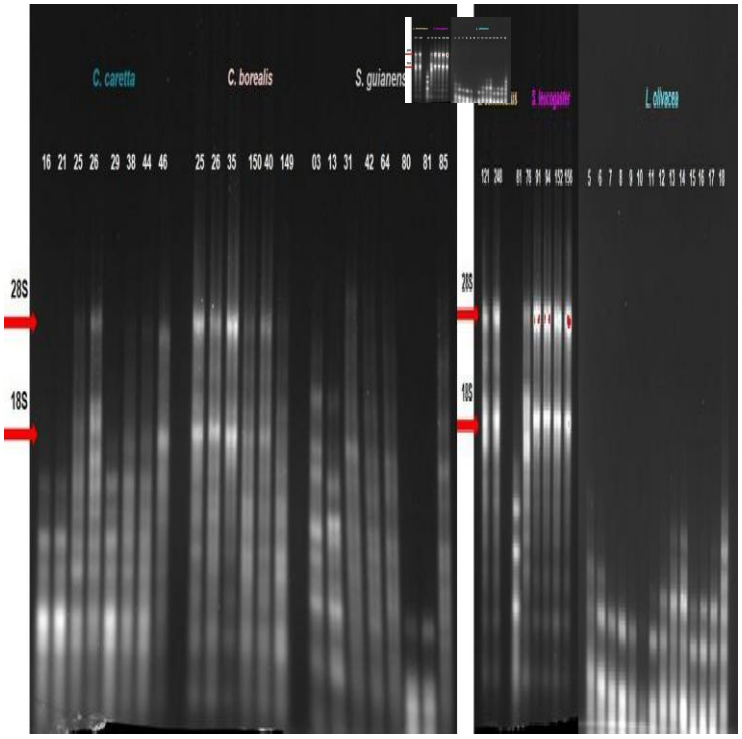


Figura 9.4-1. *Perfil eletroforético de RNA em gel de agarose 1,2% com formaldeído das amostras de tecido hepático de Caretta caretta e Sula leucogaster.*

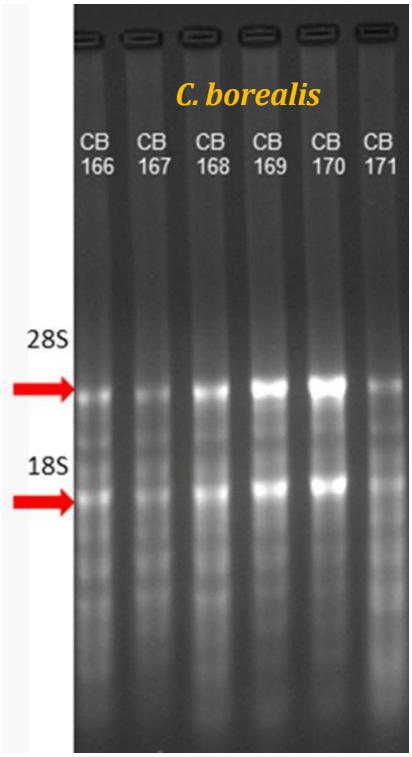


Figura 9.4-2. *Perfil eletroforético de RNA em gel de agarose 1,2% com formaldeído das amostras de tecido hepático de Calonectris borealis.*

PÚBLICA

A avalição da integridade do RNA foi realizada para a amostra CC046, que apresentou índice de integridade de RNA (RIN) de 4,8 (**Figura IV-3**). Quando separadas por eletroforese, as amostras de RNA total exibem dois picos principais representando o RNA ribossômico 18S e 28S (rRNA). Em casos de degradação, esses picos desaparecem e os produtos de degradação passam a ser observados. A qualidade do RNA também pode ser avaliada pelo valor de *RNA integrity number equivalent* (RINe), sendo que os valores de RIN variam de 10 (RNA intacto) a 1 (RNA totalmente degradado) (SCHROEDER et al., 2006).

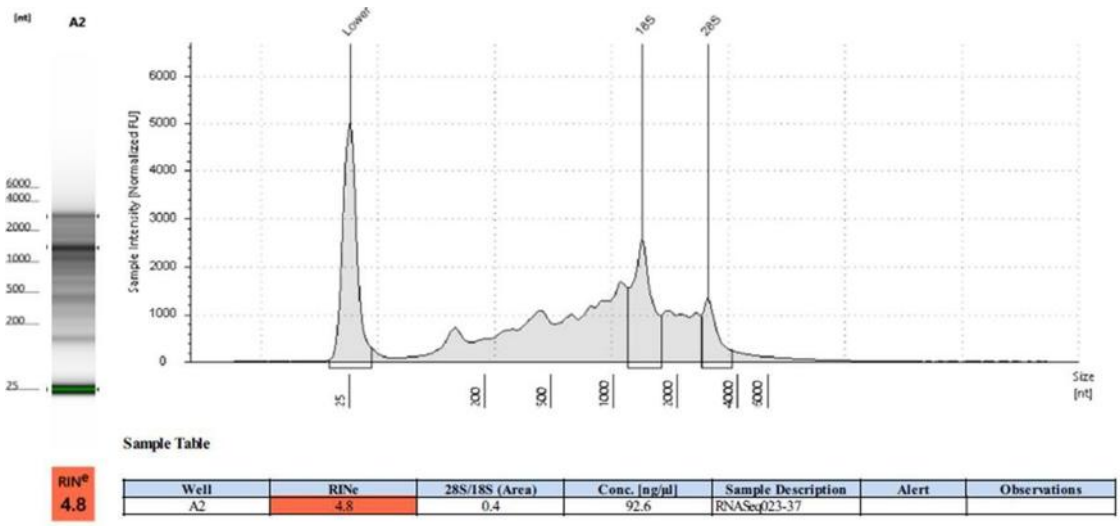


Figura 9.4-3. *Avaliação da integridade do RNA de Caretta caretta no Screen Tape no sistema TapeStation. À esquerda a visão do gel exibindo as bandas de alto peso molecular definidas e à direita o eletroferograma da amostra exibindo os picos definidos das subunidades 18S e 28S*

Apesar de o valor de RIN estar abaixo do ideal para sequenciamento de próxima geração, optou-se por seguir com a construção das bibliotecas de cDNA para sequenciamento do transcriptoma. Estudos como o realizado por Lu, Zhou e Chen (2022) demostraram que amostras de RNA degradadas, com RIN > 4,4, variaram pouco quanto à expressão de mRNA quando comparadas a amostras de RNA intacto.

Em *S. leucogaster*, a avaliação da integridade do RNA foi realizada na amostra SU91, que apresentou um RIN de 8,3, indicando RNA íntegro e adequado para sequenciamento (**Figura 9.4-4**).

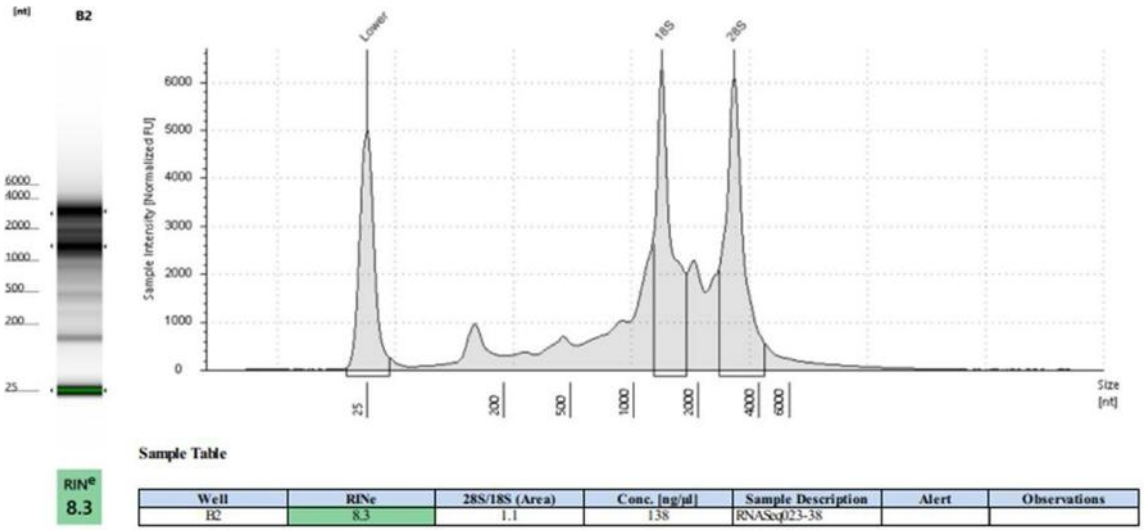


Figura 9.4-4. *Avaliação da integridade do RNA de Sula leucogaster no Screen Tape no sistema TapeStation. À esquerda a visão do gel exibindo as bandas de alto peso molecular definidas e à direita o eletroferograma da amostra exibindo os picos definidos das subunidades 18S e 28S.*

A integridade do RNA de *C. borealis* foi avaliada, e o cálculo do RIN foi realizado por amostragem, utilizando a amostra CB169 (**Figura 9.4-5**). O valor obtido (7,1) indica boa integridade do RNA e, com base nesse resultado, aliado ao perfil eletroforético previamente observado, as amostras foram encaminhadas para as etapas subsequentes de construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento.

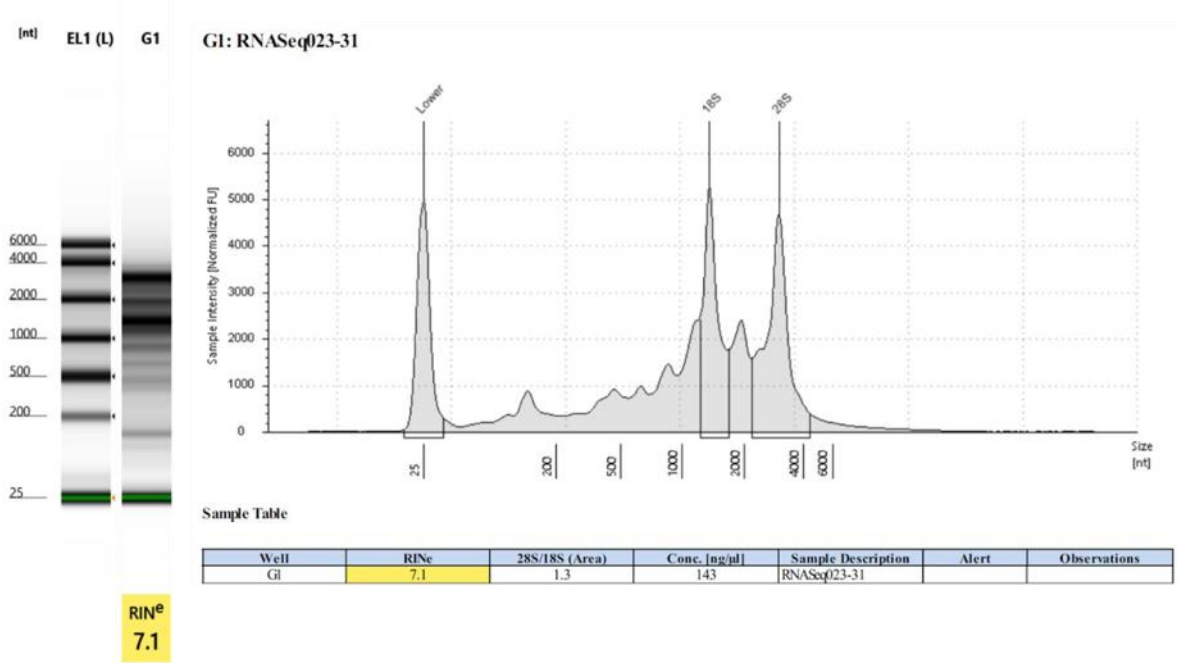


Figura 9.4-5. *Avaliação da integridade do RNA de Calonectris borealis no Screen Tape no sistema TapeStation. À esquerda a visão do gel exibindo as bandas de alto peso molecular definidas e à direita o eletroferograma da amostra exibindo os picos definidos das subunidades 18S e 28S.*

9.5 SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DE TRANSCRIPTOMAS DE AMOSTRAS HEPÁTICAS DE TETRAPÓDES MARINHOS

9.5.1 Construção de bibliotecas e sequenciamento de amostras hepáticas de tetrapódes marinhos

As bibliotecas de cDNA das amostras hepáticas de *C. carreta, S. leucogaster* e *C. borealis* foram preparadas seguindo o protocolo do kit Zymo-Seq Ribofree Total RNA Library (Zymo Research). A qualidade do cDNA foi validada através do instrumento Bioanalyzer 2100 (Agilent). A quantificação das bibliotecas de cDNA foi realizada por meio de qPCR, de acordo com as instruções do kit Sequencing Library qPCR Quantification (Illumina, EUA).

As amostras foram diluídas para uma concentração de 10 pM e agrupadas em cBot. O sequenciamento foi realizado no sistema Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, EUA), com leituras paired-end (PE 2 x 100 pb), com um total aproximado de 100 milhões de leituras ou 50 milhões de pares por amostra.

9.5.2 Montagem e anotação do transcriptoma de amostras hepáticas de tetrapódes marinhos

Após o sequenciamento das bibliotecas, as leituras (*reads*) brutas foram agrupadas em dois arquivos: um contendo todas as sequências das fitas senso (*forward*) e o outro com as sequências das fitas antissenso (*reverse*). A qualidade das leituras foi avaliada utilizando o programa FastQC (versão 0.11.9) (ANDREWS, 2010) e visualizada no programa MultiQC (versão 1.22.1).

Foi realizada uma filtragem com o *software* Trimmomatic (versão 0.39) (BOLGER et al., 2014) para eliminar leituras com escores de baixa qualidade (*phred* < 33, tanto na média quanto nas extremidades), além de remover adaptadores, contaminantes e sequências redundantes super-representadas. Após a filtragem, as sequências resultantes foram novamente submetidas à análise de qualidade pelo FastQC e visualização no MultiQC.

A montagem *de novo* foi realizada utilizando o *software* Trinity (versão 2.13.2) (HAAS et al., 2013) com as configurações padrão (k-mer = 25). As leituras foram normalizadas para posições com cobertura acima de 50 pb, visando otimizar o desempenho.

Os quadros de leitura abertos (ORFs) foram identificados com o programa TransDecoder (versão 5.0.1-3). Os contigs contendo ORFs foram anotados ao comparar suas sequências com a base de dados do TrEMBL (BOECKMANN et al., 2003). A anotação funcional foi realizada utilizando o BLAST+ (versão 1.6.3) (CAMACHO et al., 2009), alinhando as transcrições ao banco de dados SwissProt, com valor de e-value de $1e^{-05}$.

A anotação funcional dos genes-alvo foi realizada manualmente por meio de análise BLASTx.

9.5.3 Desenho de Iniciadores

Para a padronização e execução da qPCR, técnica utilizada na análise de biomarcadores moleculares, foram desenhados iniciadores específicos para a amplificação dos genes-alvo de cada espécie.

O desenho de iniciadores foi realizado utilizando o software PrimerQuest, da *Integrated DNA Technologies*, disponível no endereço eletrônico https://www.idtdna.com. Os parâmetros definidos para o desenho dos iniciadores foram: tamanho do produto (*amplicon*) de aproximadamente 100 pb, comprimento dos iniciadores entre 20 e 26 pb e temperatura de anelamento entre 58 e 60ºC.

Todos os pares de iniciadores gerados foram avaliados no programa OligoAnalyser, também da *Integrated DNA Technologies*, para verificar a possível formação de estruturas secundárias, como dobramentos (‘*hairpins*’), além de dímeros próprios e não-próprios, além de similaridade entre as temperaturas de dissociação (Tm) dos iniciadores senso e antissenso. Os iniciadores desenhados para os seis genes-alvo (*AhR*, *CYP1A4*, *ESR1*, *GSTA*, *UGT1* e *VTG1*) em cada uma das três espécies estão sumarizados nas **Tabelas IV-3** a **IV-5**.

Tabela 9.5-1. *Sequências de iniciadores selecionadas para amplificação dos genes alvo em tecido hepático de Caretta caretta.*

Genes de Interesse		Iniciadores	Tm (oC)	%GC
Receptor de Hidrocarboneto Aromático *(AhR)*	F1:	CCCAATATCACCTACGCTAATC	60	45
	R1:	CAATCTGTCTCTGTGTCTCTTG	60	45
	F2:	ACAGAACAAGAAAGGGAAGG	60	45
	R2:	GTATCTCAAGGATGGATGGAAG	60	45
	F3:	TTTCAACACAGAGACCTCTTAC	60	41
	R3:	CTCATACAACACAGCCTCAC	60	50
Citocromo P4501A *(CYP1A4)*	F1:	GCCTTACACAGAAGCCTTTATC	61	45
	R1:	TCGGGATGTAGTAGCCATTC	61	50
	F2:	TGAGCAAAGTCAGGAGAATAAAG	61	39
	R2:	GTTGTCACAGAGTCAAACCC	61	50
Receptor de estrógeno (ESR1)	F1:	TGCTCGCTGCCATTAAC	60	53
	R1:	CTGCTCAAAGTCTCCAGTTC	60	50
	F2:	CCAAGTCAGGTCTCTCTCC	60	58
	R2:	GGTGCTCCATCCCTTTATTG	60	50
	F3:	CAGTGAGATGTATGTGGAGAG	59	48
	R3:	GCATAACTGAGGCTAGTAGAG	59	48
Glutationa S-transferase alfa (GSTA)	F1:	CCAGAGCCATTCTCAACTAC	60	50
	R1:	AGGTCCATTGTTGCTTCC	60	50
	F2:	TTAAAGTTACGGCAGGATGG	60	45
	R2:	GTAGTTGAGAATGGCTCTGG	60	50
Uridina difosfo glicuroniltransferase 1	F1:	TTGGAGGTACACTGGAGAAG	61	50
	R1:	GCTTTGGGATGAGCAAGTAG	61	50
	F2:	GGCTACCACAGAATGATCTAC	60	48

PÚBLICA

Genes de Interesse		Iniciadores	Tm (oC)	%GC
(UGT1)	R2:	CTCCAAATAATGGCATCAGAAC	60	41
Vitelogenina 1 (VTG1)	F1:	CAGCCATACAGGTGAAGATAG	60	48
	R1:	CCCATCACGAGTGCTATTC	60	53
	F2:	CTGAAGGGACATCCTGTTATTG	61	45
	R2:	TGGAGTACAGCCTCTCATAC	60	50

Tabela 9.5-2. *Sequências de iniciadores selecionadas para amplificação dos genes-alvo em tecido hepático de Sula leucogaster.*

Gene de interesse		Iniciadores	Tm (ºC)	%GC
Receptor de Hidrocarboneto Aromático (AhR)	F1:	TTCCTGGGTTCCTGGACTCCTTC	60	57
	R1:	ATGCGTCCTGCTTCATCATGGC	60	55
	F2:	ACATCTGCGAAAGAGAAACCTGAAGC	59	46
	R2:	CTGCCTGTGTCTGTGACTCCTC	59	59
Citocromo P4501A (CYP1A4)	F1:	AAGACCCTTCAACCTTCAACCCTGAG	60	50
	R1:	ACTTTGTCGCTCTCTGTCCTGCTTATTTC	60	45
	F2:	TCCTTCTTGCCCTTCACCATCC	59	55
	R2:	CCACTGATTGATAAACACGCAGGTATCC	59	46
Receptor de estrógeno (ESR1)	F1:	GCAGAGGTGGGCGAATGATGAAAC	60	54
	R1:	ACAGGGCTGGACTGTTCTTCTTGTTATG	60	46
	F2:	AGTGGGAATGATGAAAGGTGGCATAC	59	46
	R2:	CCTGGAATCTTGCTCCTCTCTTTGAC	59	50
Receptor de estrógeno (ESR2)	F1:	GTGTCAAGGCAATGATCCTCCTCAA	59	48
	R1:	CCCACACCAAAGCATCTGTGACTA	59	50
	F2:	GTCAGCAGAAGAACCTGAAAGCAACA	59	46
	R2:	TGCGATAACCCACACCAAAGCA	59	50
Glutationa S-transferase alfa (GSTA)	F1:	TGTTGGAGGAACCGATGACCTTAT	58	46
	R1:	GGAAATACCTGCTTGTCGCCTTT	58	48
	F2:	GGGAAGGATCTGAAGGAGAGAG	56	55
	R2:	TCAGCCGATAAGAATGGGAACA	56	45
Uridina difosfo glicuroniltransferase 1 (UGT1)	F1:	TGGTGCTCCTCTCCCTCTTCATTTC	60	52
	R1:	TGGTTGGCTTTCTTGTTCTTCCCTTCTTA C	60	43
	F2:	GTTCTTTCAGCGGGATGTGACTGTG	60	52
	R2:	GTTGGGCATCAAAGGTCTTGGGTAATC	60	48
Vitelogenina (VTG1)	F1:	AAGGTTGGCTTCCACTGTTTCC	58	50
	R1:	AGACTCCACAGCATCCTCACAT	58	50
	F2:	CCGAAACCAGTCAAGTCCCAATGTA	59	48
	R2:	ATGGATGCGAGCAGACCTGAAA	59	50

PÚBLICA

Tabela 9.5-3. *Sequências de iniciadores selecionadas para amplificação dos genes-alvo em tecido hepático de Calonectris borealis.*

Gene de interesse		Iniciadores	Tm (ºC)	%GC
Receptor de Hidrocarboneto Aromático (AhR)	F1:	CGTCTCTTCTACTATCCAGGACTACTTGGG	60	50
	R1:	CTGTCGTTGAAACTCAGGTCTGTCTTCTG	60,1	48,2
	F2:	CAAGAAAGGGAAGGATGGTGCTACTT	58,5	46,1
	R2:	TCGTATCTCAAGGATAGATGGTGGCT	58,5	46,1
Citocromo P4501A (CYP1A4)	F1:	GCTGAAGGGACCGAAGTGAACAAA	59,3	50
	R1:	CTGGAGCAAGGTGGACAGGAAA	59,1	54,5
	F2:	AGATGTTCAGGCACTCCTCCTT	57,7	50
	R2:	AGCGGTCCTTTGGGATGTAGTA	57,4	50
Receptor de estrógeno (ESR1)	F1:	AGCACCTTGAAATCCCTGGAAGA	58,2	47,8
	R1:	GAGAAAGACCCGACTTAGCCATCA	58,1	50
	F2:	TTTGCTACTACGGCTCCAGTGT	58	50
	R2:	GGGACATTGTTCAGCGAGTGAAATC	58	48
Glutationa S-transferase alfa (GSTA)	F1:	TGGAGTCAATTCGCTGGTTGTTAGC	59,2	48
	R1:	GCTTCTCATACTGCTCTCGGGTTTC	59	52
	F2:	CTGAAGGAGAGAGCCCTGATTGA	58	52,2
	R2:	TCCTCAGCCGATAAGAATGGAAACA	58	44
Uridina difosfo glicuroniltransferase 1 (UGT1)	F1:	GGCAGATACTGGCTGAGCATCTTT	59	50
	R1:	CTGGGACACTGAGTGGCTTCAAA	59	52,2
	F2:	GTTCTGCTCCTGTCCATGCT	57,1	55
	R2:	GCCTGAGACCATCCAACACTT	57	52,4
Vitelogenina (VTG1)	F1:	GGAGGCTGGGATCGGAGGTATTT	60,3	56,5
	R1:	ACTGCTCAGGTCCTTGGATTTGGT	60,2	50
	F2:	AAGGACCTGAGCAGTTGTGAAG	56,9	50
	R2:	GTAAGTAGCAGTTGCCTGGGAAT	56,8	47,8

9.5.4 Resultados da montagem e anotação dos transcriptomas

Caretta caretta

Após o sequenciamento das duas bibliotecas de C. caretta, as leituras brutas (reads) foram avaliadas quanto à qualidade (**Figura 9.4-5**).

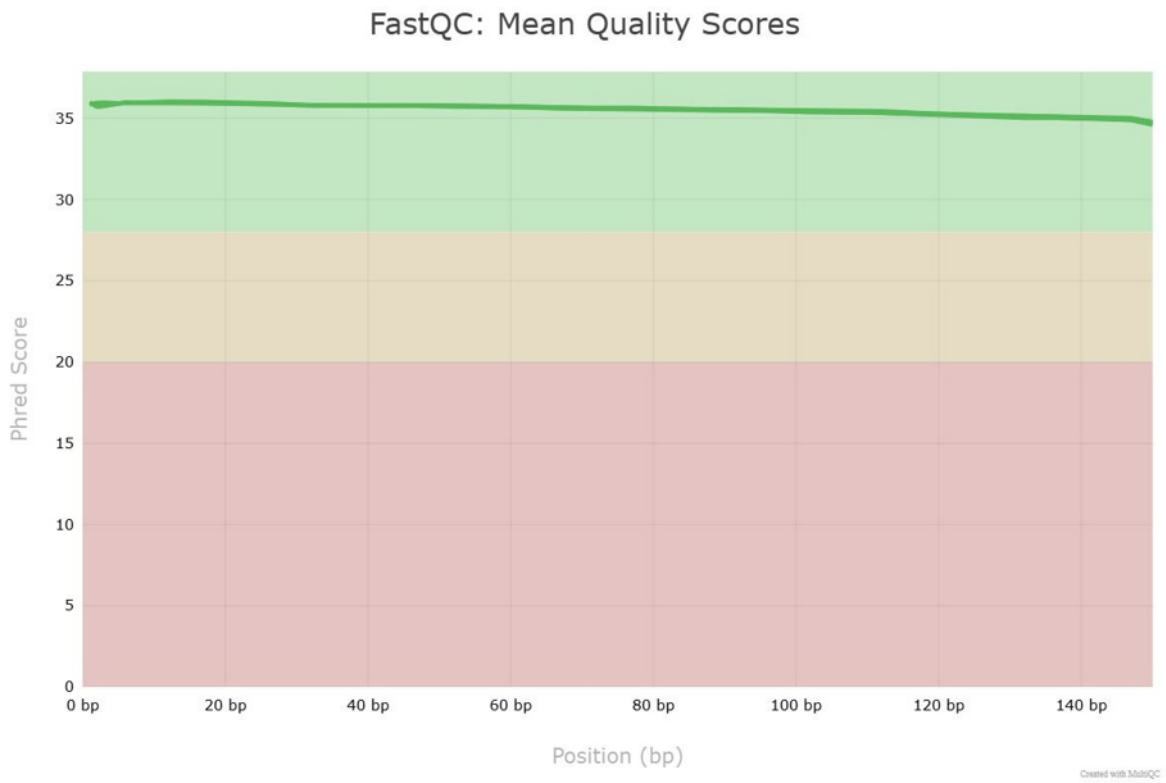


Figura 9.5-1. *Qualidade das sequências brutas senso e antissenso de Caretta caretta. O eixo X representa a posição das leituras de cada nucleotídeo e o eixo Y, a nota Phred média.*

Embora os reads brutos apresentassem boa qualidade, com uma média de Phred de 35, foi realizada uma filtragem adicional com o software Trimmomatic para eliminar leituras com baixa qualidade, adaptadores, contaminantes e sequências redundantes super-representadas. Após essa filtragem, uma nova avaliação de qualidade foi realizada, resultando em apenas 29,1 milhões de pares de reads, ou aproximadamente 30% dos reads iniciais, considerados de extrema qualidade, com nota Phred de 36 em média (**Figura 9.5-2**).

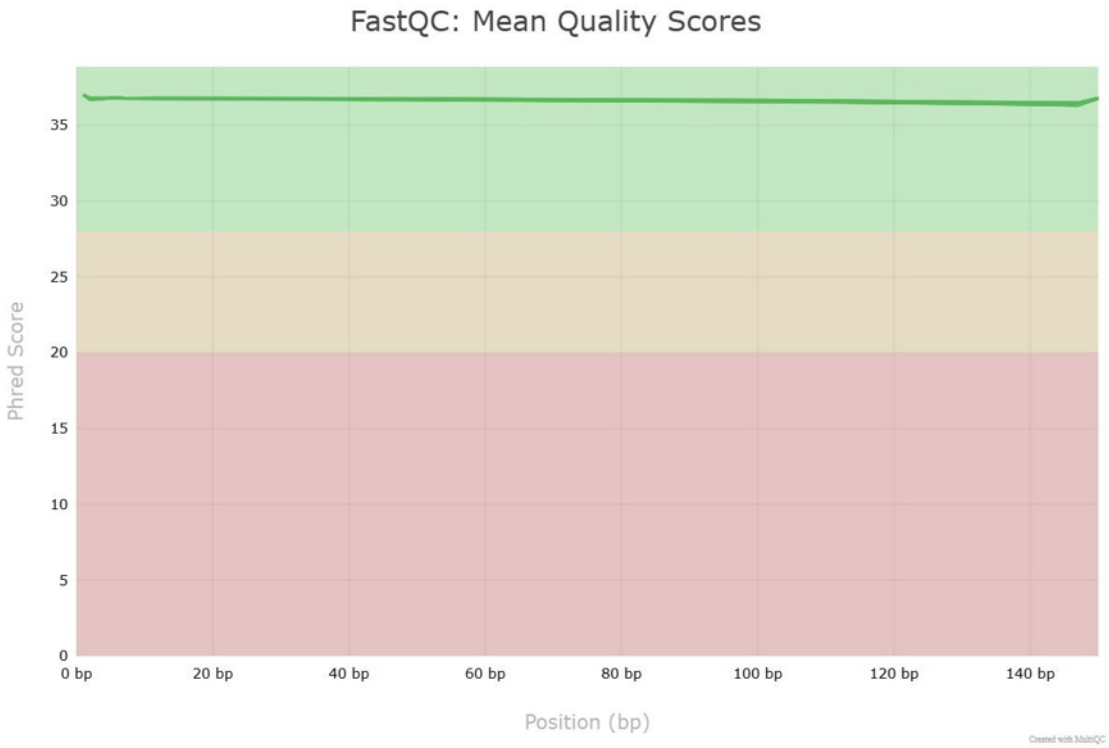


***Figura 9.5-2**. Qualidade das sequências filtradas senso e antissenso de Caretta caretta. O eixo X representa a posição das leituras de cada nucleotídeo e o eixo Y, a nota Phred média.*

A montagem de novo foi realizada com configurações padrão (k-mer = 25). As leituras foram normalizadas para posições com cobertura superior a 50 pb, visando um melhor desempenho. Foram montados 821.752 contigs, com um comprimento médio de 660 pb e uma métrica de N50 de 863 pb, o que indica que pelo menos metade do total de bases montadas está em contigs de, no mínimo, 863 pb. Além disso, foram identificadas 228.135 ORFs longas, das quais 112.392 são ORFs completas (**Tabela 9.5-4**).

***Tabela 9.5-4.** Métricas da montagem de novo do transcriptoma hepático de Caretta caretta.*

Métricas	Valores
Total de reads brutos	97.065.633
Total de reads filtrados	29.133.077
Conteúdo GC	43,76 %
Total de sequências (contigs)	821.752
Total de bases montadas	542.983.488
Tamanho médio dos transcritos	660 pb
N50	863 pb
Total de trinity 'genes'	690.679
Total trinity transcritos	821.752
Maiores ORFs identificadas	228.135
ORFs completas	112.392

Os genes de interesse identificados, que futuramente serão depositados em bancos de dados públicos, são: glutationa S-transferase alfa (GSTA), citocromo P450 1A4 (CYP1A4), receptor de hidrocarboneto aromático (AhR), receptor de estrógeno 1 (ESR1), uridina difosfato glicuronosiltransferase 1 (UGT1) e vitelogenina 1 (VTG1). Os iniciadores para esses genes-alvo foram desenhados (**Tabela IV-3**) e serão testados nas próximas etapas do projeto.

Sula leucogaster

Após o sequenciamento das três bibliotecas de *S. leucogaster*, as leituras brutas (*reads*) foram avaliadas quanto à qualidade (**Figura 9.5-3**).

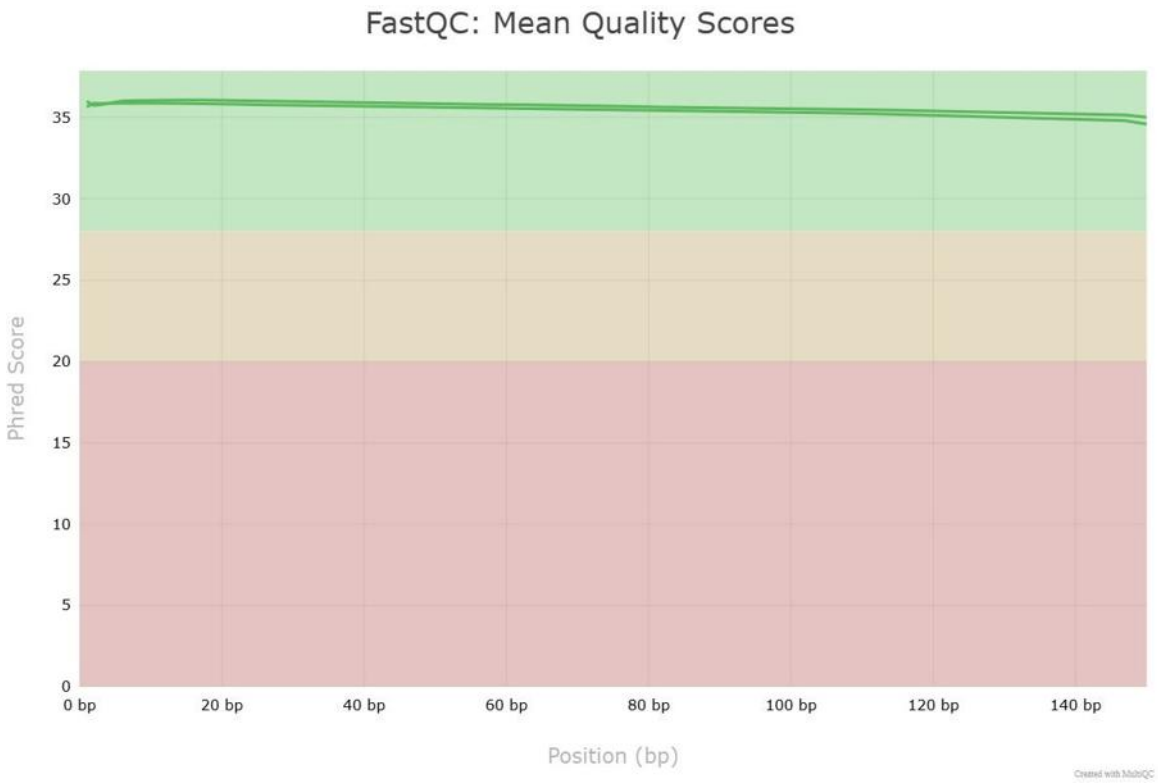


Figura 9.5-3. *Qualidade das sequências brutas senso e antissenso de Sula leucogaster. O eixo X representa a posição das leituras de cada nucleotídeo e o eixo Y, a nota Phred média.*

Embora os reads brutos apresentassem boa qualidade, com uma média de Phred de 35, foi realizada uma filtragem adicional com o software Trimmomatic para

eliminar leituras com baixa qualidade, adaptadores, contaminantes e sequências redundantes super-representadas. Após essa filtragem, uma nova avaliação de qualidade foi realizada, resultando em 31,49 % dos reads iniciais, ou cerca de 45,1 milhões de leituras pareadas de alta qualidade (**Figura 9.5-4**).

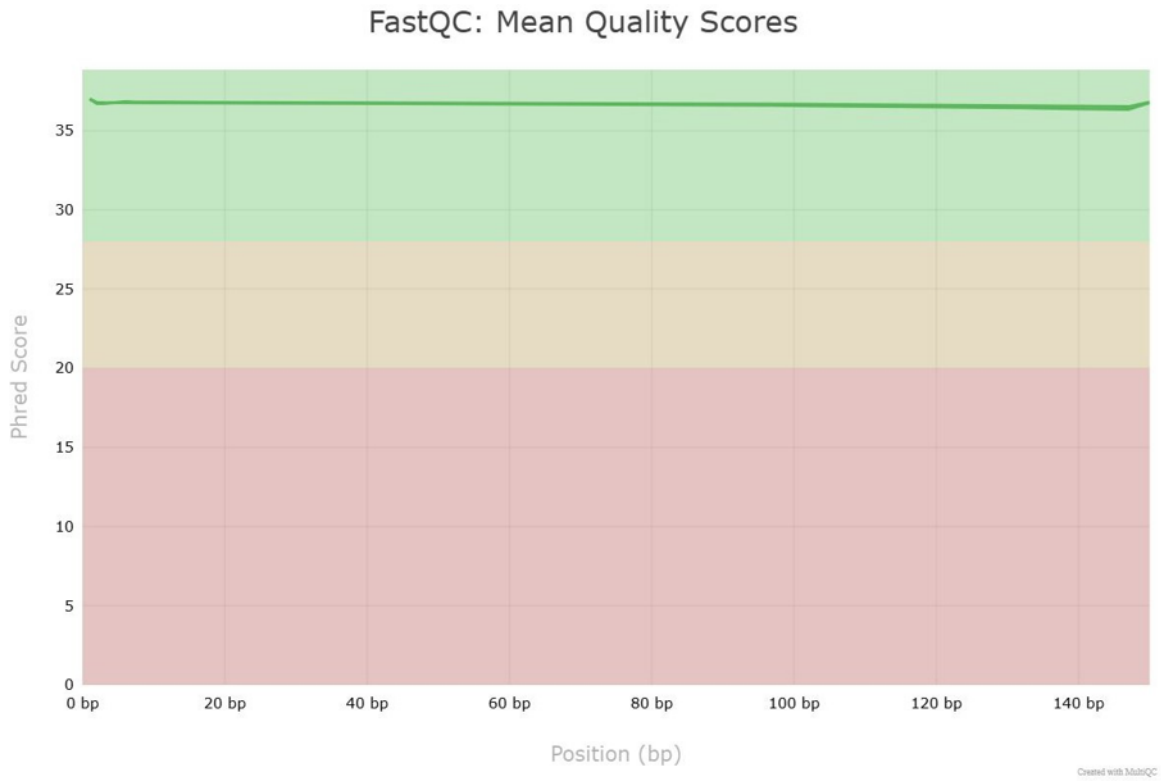


***Figura 9.5-4**. Qualidade das sequências filtradas senso e antissenso de Sula leucogaster. O eixo X representa a posição das leituras de cada nucleotídeo e o eixo Y, a nota Phred média.*

A montagem de novo foi realizada com configurações padrão (k-mer = 25). As leituras foram normalizadas para posições com cobertura acima de 50 pb para melhor desempenho. Foram montados 419.231 contigs com média de comprimento de 1.225 pares de base (pb) e métrica de N50 de 2.533 pb, o que significa que pelo menos metade do total de bases montadas está em contigs de pelo menos 1.225 pb. Foram identificados 237.928 ORFs longos, sendo 142.661 ORFs completos (**Tabela 9.5-5**).

Tabela 9.5-5. *Métricas da montagem de novo do transcriptoma hepático de Sula leucogaster.*

Métricas	Valores
Total de *reads* brutos	143.166.839
Total de *reads* filtrados	45.079.566
Conteúdo GC	42,96 %
Total de sequências (contigs)	419.231
Total de bases montadas	513.703.863
Tamanho médio dos transcritos	1.225 pb
N50	2.533 pb
Total de trinity 'genes'	337.041
Total trinity transcritos	419.231
Maiores ORFs identificadas	237.928
ORFs completas	142.661

Durante a busca pelos genes-alvo relacionados à resposta à exposição a xenobióticos, foram identificados 274 contigs correspondentes a transcritos (incluindo isoformas do mesmo gene) do *Citocromo P450* (*CYP*), distribuídos entre as famílias 1, 2 e 3, com destaque para várias subfamílias, como CYP1A4, CYP1B1, CYP2A e CYP3A. Em relação aos genes de biotransformação de fase II, foram identificados 85 contigs correspondentes a isoformas de *glutationa S-transferase* (*GST*) e 30 contigs associados a isoformas de *UDP-glicuronil transferases* (*UGT*). Quanto aos receptores nucleares, foram identificados 10 contigs correspondentes ao *receptor para aril hidrocarboneto* (*AhR*) e 18 contigs para os *receptores de estrogênio alfa e beta* (*ESR1* e *ESR2*). Por fim, foram identificados 19 contigs que transcrevem para as isoformas de *vitelogenina 1* e *2* (*VTG1* e *VTG2*). Foi possível desenhar iniciadores para todos os genes-alvo (**Tabela 9.5-2**), e estes serão testados nas fases subsequentes do projeto.

Calonectris borealis

O sequenciamento foi realizado nas três amostras de *C. borealis* (CB168, CB169 e CB170), gerando leituras brutas de: CB168 = 47.602.875, CB169 = 42.535.364 e CB170 = 46.518.811 leituras, totalizando 136.657.050 leituras. A qualidade dos *reads* (i.e., leituras) foi avaliada através do programa MultiQC. Embora os *reads* apresentassem boa qualidade, com média de Phred de 33, foi realizada uma filtragem adicional com o *software* Trimmomatic para eliminar leituras com baixa qualidade, adaptadores, contaminantes e sequências redundantes super-representadas. Após essa filtragem, uma nova avaliação de qualidade foi

PÚBLICA

realizada, resultando em 30% dos *reads* iniciais, ou cerca de 40,1 milhões de leituras pareadas de alta qualidade. A nova análise de qualidade realizada com o MultiQC (**Figura 9.5-5**) evidenciou a ausência total de adaptadores, bem como o descarte de sequências inferiores a 150 bp e/ou com valores de Phred inferiores a 33.

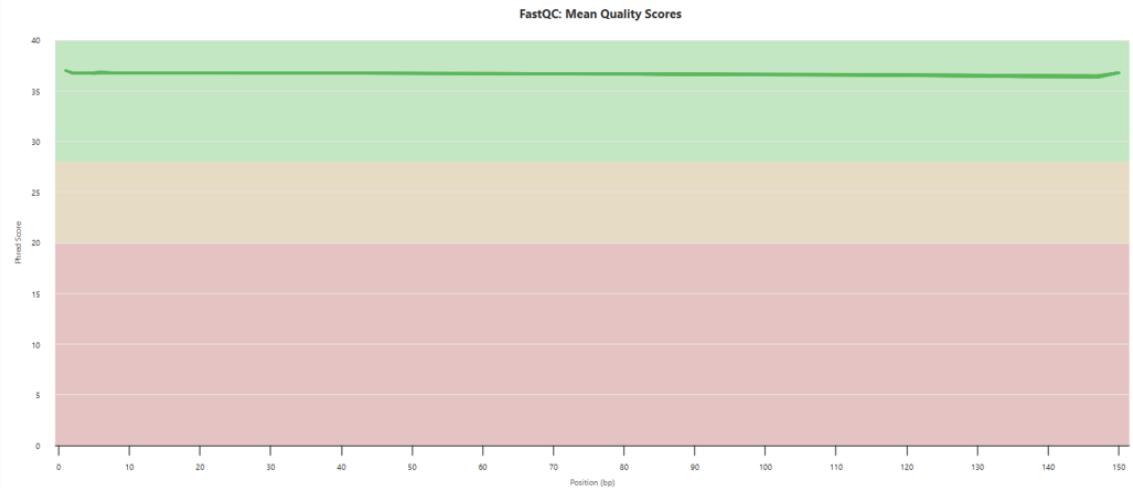


***Figura 9.5-5**. Qualidade das sequências filtradas senso e antissenso de Calonectris borealis. O eixo X representa a posição das leituras de cada nucleotídeo e o eixo Y, a nota Phred média.*

A montagem *de novo* do transcriptoma foi realizada utilizando o software Trinity com configurações padrão (k-mer = 25), cujas métricas podem ser consultadas na **Tabela 9.5-6**. As leituras foram previamente normalizadas para eliminar *reads* menores que 50 pb, com o objetivo de melhorar o desempenho da montagem.

Como resultado, foram montadas um total de 567.428.793 bases. Considerando todas as isoformas, o número total de contigs foi de 437.851, com comprimento médio de 1.295 pb e valor de N50 igual a 2.878 pb. Esse valor de N50 indica que pelo menos metade do total de bases montadas está contida em *contigs* com comprimento igual ou superior a 2.878 pb.

***Tabela 9.5-6.** Métricas da montagem de novo do transcriptoma hepático de Calonectris borealis.*

Métricas	Valores
Total de *reads* brutos	136.657.050
Total de *reads* filtrados	40.100.000
Conteúdo GC	42,7%
Total de bases montadas	567.428.793
Tamanho médio dos transcritos	559

Métricas	Valores
Total de *contigs*	437.851
N50	2.878
Total de trinity 'genes'	35.2565
Total trinity transcritos	43.7851
Maiores ORFs identificadas	253.221
ORFs completas	149.774

A anotação dos genes-alvo foi realizada manualmente por meio da ferramenta BLASTx. Os genes referentes aos biomarcadores moleculares de interesse identificados, que serão futuramente depositados em bancos de dados públicos, incluem: glutationa S-transferase alfa (GSTA); citocromo P450 1A4 (CYP1A4); receptor de hidrocarboneto aromático (AhR); receptor de estrógeno 1 (ESR1); uridina difosfato glicuronosiltransferase 1 (UGT1); e vitelogenina 1 (VTG1).

Os iniciadores para esses genes-alvo de *C. borealis* foram desenhados (**Tabela 9.5-3**) e serão testados nas próximas etapas do projeto.

9.6 DETERMINAÇÃO DO BASELINE PARA AJUSTE DO LIMIAR DE TRANSCRIÇÃO EM PUFFINUS PUFFINUS E LARUS DOMINICANUS

Foram realizados ensaios de quantificação de transcritos dos seis genes-alvos de *P. puffinus* e *L. dominicanus* em triplicata, com o objetivo de obter os valores de Unidades de Fluorescência Relativa (RFU) do ciclo limiar (Cq do threshold) de cada gene.

Para a construção das curvas padrão, foi utilizado um controle positivo sintético (gBlock) de *P. puffinus* e *L. dominicanus*, diluído em série a partir de 4.500 até 70 cópias. Para cada ensaio, uma curva nova foi construída partindo do estoque (gBlock), com reações realizadas em duplicata, incluindo os brancos de reação. A eficiência das reações de qPCR foi avaliada com base na taxa de duplicação do cDNA a cada ciclo, sendo considerada ideal uma eficiência de 100%. Após a amplificação, as curvas de dissociação (*melting curve*) foram analisadas para verificar a especificidade dos iniciadores, sendo aceitos apenas os iniciadores que

resultaram em um único produto (ou seja, único pico de temperatura de *melting*), indicando amplificação específica.

Foram considerados adequados os genes que apresentaram eficiências entre 90 e 110%, coeficiente de correlação (R^2) maior que 0,97, e um único ponto de dissociação. Estes parâmetros foram analisados diretamente no programa Bio-Rad CFX Maestro 2.3. Os valores de RFU obtidos para cada ensaio estão apresentados na **Tabela 9.6-1** e na **Tabela 9.6-2**, servindo como referência para ensaios futuros de qPCR com amostras de tecido hepático de *P. puffinus* e *L. dominicanus*.

Tabela 9.6-1. *Determinação do baseline do limiar de transcrição para os genes-alvo de Puffinus puffinus em Unidades Relativas de Fluorescência (RFU). Os dados estão apresentados com RFU médio por ensaio, além das respectivas médias, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para cada gene.*

Determinação do Ciclo Limiar Basal (RFU – SYBR*)						
Gene	**Placa 01**	**Placa 02**	**Placa 03**	**Média**	**DP**	**CV**
AhR	877,365	913,883	954,779	915,342	38,728	4,231
CYP1A5	960,362	970,388	1.018,32	983,023	30,976	3,151
ESR1	971,935	950,68	983,753	968,789	16,759	1,73
GSTA	953,951	1.015,36	1.013,88	994,396	35,034	3,523
UGT1	863,19	961,438	991,789	938,806	67,22	7,16
VTG1	824,649	871,758	952,631	883,013	64,729	7,33

Tabela 9.6-2. *Determinação do baseline do limiar de transcrição para os genes-alvo de Larus dominicanus em Unidades Relativas de Fluorescência (RFU). Os dados estão apresentados com RFU médio por ensaio, além das respectivas médias, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para cada gene.*

Determinação do Ciclo Limiar Basal (RFU – SYBR*)						
Gene	**Placa 01**	**Placa 02**	**Placa 03**	**Média**	**DP**	**CV**
AhR	771,898	731,062	738,051	747,00	21,84	2,92
CYP1 A	899,431	816,927	789,755	835,37	57,12	6,84
ESR	821,043	820,812	877,008	839,62	32,38	3,86
GST	797,291	835,137	782,893	805,11	26,98	3,35
UGT1	829,100	812,522	799,287	813,64	14,94	1,84
VTG2	777,254	829,340	812,426	806,34	26,57	3,30

9.7 ANÁLISE DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E DE DANO EM TETRÁPODES MARINHOS

As análises de biomarcadores bioquímicos realizadas no período abrangeram: (i) a quantificação de atividades enzimáticas EROD e GST em tecido hepático de

L. dominicanus e *P. puffinus*; e (ii) a mensuração dos níveis proteicos de CYP1A em amostras hepáticas de *S. leucogaster*.

No âmbito dos biomarcadores moleculares, foi realizada a quantificação dos níveis de transcritos dos genes-alvo AhR, CYP1A, ESR, GSTA, UGT1 e VTG em amostras de tecido hepático de *L. dominicanus* e *P. puffinus*.

9.7.1 Metodologia para análise de biomarcadores bioquímicos e moleculares em tetrápodes marinhos

Biomarcadores Bioquímicos

Devido à impossibilidade de reparo do espectrofluorímetro anteriormente utilizado (SpectraMax M5), o LABCAI adquiriu recentemente o modelo SpectraMax iD3. Embora se trate de um equipamento com características operacionais semelhantes, mas não idênticas às do modelo anterior, foi necessária uma nova padronização dos intervalos de quantificação dos ensaios de atividades enzimáticas EROD e GST. A metodologia previamente otimizada para esses ensaios foi apresentada Relatório Técnico Anual Parcial 2024 e aplicada às amostras analisadas no âmbito do presente relatório.

Homogeneização Das Amostras

Amostras de tecido hepático de *L. dominicanus*, *P. puffinus* e *S. leucogaster*, contendo aproximadamente 100 mg de cada espécime, foram homogeneizadas individualmente em cinco vezes o volume de tampão de homogeneização Tris-HCl (50 mM Tris-HCl pH 7,4), contendo 150 mM KCl, 1 mM DTT e 0,5 mM de PMSF, um inibidor de proteases. Os tecidos foram homogeneizados com o homogeneizador TissueTearorTM (BioSpecTM). Durante todo o procedimento, as amostras foram mantidas sobre o gelo.

O homogeneizado foi centrifugado a 9.000 x g por 30 min a 4°C para obtenção da fração citosólica (fração S9). A fração microssomal, correspondente à membrana do retículo endoplasmático, foi preparada por meio de uma segunda centrifugação da fração S9 a 100.000 x g por 60 min a 4°C, utilizando uma ultracentrífuga Hitachi CP100WX. A fração sobrenadante resultante dessa segunda

PÚBLICA

centrifugação resultante foi transferida para um novo microtubo e utilizada para a análise de atividade GST. A fração microssomal foi ressuspendida em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4), contendo 1 mM EDTA, 0,1 M KCl e glicerol 20%, e foi utilizada para a análise de atividade EROD e imunodetecção de CYP1A.

Determinação De Proteínas Totais

A determinação da concentração de proteínas na fração microssomal foi realizada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Este método emprega o corante Coomassie Brilliant Blue (G-250), que reage com os aminoácidos das proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais aromáticas ou básicas, resultando em uma coloração que varia de marrom para azul. A intensidade da cor da reação está diretamente relacionada à concentração de proteínas, quanto mais azul mais proteínas na amostra.

A determinação das proteínas totais foi realizada com o kit Bio-RadProteinAssay® (Bio-Rad®) seguindo as instruções do fabricante. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados, em duplicata, de 0,75 a 1,5 µL de cada amostra, juntamente com 200 µL do reagente de Bradford filtrado, totalizando um volume final de até 201,5 µL. Após incubação de cinco minutos, foi realizada a leitura das amostras a 595 nm utilizando o espectrofotômetro de placas SpectraMax® iD3 (Molecular Devices®). As absorbâncias das amostras foram comparadas a uma curva padrão de albumina sérica bovina gerada no mesmo ensaio das amostras. A concentração de proteínas totais foi expressa em mg.mL-1.

Ensaio De Atividade Etoxiresorufina O-Deetilase (EROD)

Os ensaios de atividade EROD foram realizados na fração microssomal, em duplicata, e nas condições previamente padronizadas para tecido hepático. Para amostras de **L. dominicanus** e *P. puffinus*, 20 µg de proteínas microssomais foram adicionadas por poço e incubadas com 140 µL de 7-ER (2 µM para *L. dominicanus* e 1,5 µM para *P. puffinus*) por 10 min a 37ºC. Após a incubação, 40 µL de NADPH (1 mM) foram adicionados em cada poço para iniciar a reação, seguida de leitura no espectrofluorímetro de placas SpectraMax® iD3 (Molecular Devices®).

Para as análises, o par de excitação e emissão (ex/em) foi ajustado para 530/585 nm. Foram realizadas 20 leituras por poço em cada intervalo temporal de 30 s. A reação foi monitorada por 600 s e o coeficiente angular da reta RFU.min-1 foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática.

Uma curva padrão com resorufina foi utilizada para converter a fluorescência (RFU) em picomoles de resorufina. A atividade foi expressa em picomoles de resorufina formada por minuto por mg de proteína (pmol.min-1.mgprt-1), usando a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade EROD} = (coef.resorufina) \times (mg\ proteína)$$

Além das amostras microssomais de tecido hepático das aves e mamíferos, uma alíquota de microssoma de camundongo, *Mus musculus*, exposto a beta-naftoflavona (BNF), foi submetida às mesmas condições de ensaio descritas acima. Essa amostra foi utilizada como controle positivo da análise enzimática.

Ensaio de atividade Glutationa s-Transferase (GST)

Os ensaios de atividade GST foram realizados na fração citosólica, em triplicata e nas condições previamente padronizadas para as espécies, seguindo o protocolo modificado de Keen, Habig e Jakoby (1976). Para amostras hepáticas de ambas as aves, o substrato GSH na concentração de 2,5 mM foi incubado por 5 min a 37ºC com 4 µL da fração citosólica das amostras diluídas em tampão de homogeneização na proporção de 1:10 (v:v). Após a incubação, foram adicionados 2,5 mM de CDNB e a formação do produto GS-DNB foi acompanhada durante 5 min em 340 nm no espectrofotômetro de placas SpectraMax® iD3 (Molecular Devices®).

A atividade GST foi calculada por meio da fórmula:

$U.mgprt^{-1}$= [(Abs.min-Br x vol.total)/(vol.amostra x mg.prt x ε x caminho óptico)] x diluição

Onde,

U.mgprt^{-1} = atividade GST

Abs.min-Br = taxa de formação de GS-DNB (ε = 9,6 mM.cm-1) em 340 nm subtraído da reação branco

Vol.total = volume total da reação em mL Vol.amostra = volume da amostra em mL mg.prt = concentração de proteína em mg.mL-1

ε = coeficiente de extinção molar (ε = 9,6 mM.cm-1) em 340 nm Obs: o caminho óptico deve ser em cm

Para o ensaio, uma alíquota de GST comercial isolada de equino (Sigma®, código G6511) foi utilizada como controle positivo. A alíquota foi submetida às mesmas condições de ensaio descritas acima.

Imunodetecção de CYP1A

As análises de quantificação dos níveis proteicos de CYP1A em tecido hepático de *S. leucogaster* foram realizadas conforme o protocolo padronizado no LABCAI para cada espécie. O procedimento da técnica de *western blotting* é dividido em quatro etapas: 1) separação de proteínas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*); 2) transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (*blotting*); 3) incubação da membrana com os anticorpos primário e secundário (imunodetecção); e 4) revelação e fotodocumentação da membrana, destacando a proteína de interesse.

Em resumo, 15 µg de proteínas microssomais de cada amostra foram submetidas à eletroforese, realizada a uma voltagem constante de 300 V por 25 min ou até que as amostras alcançassem o final do gel. Um marcador de peso molecular (*Full-Range Rainbow™*, Amersham) foi incluído em cada corrida para a determinação do peso molecular das bandas proteicas. As membranas foram bloqueadas durante a noite (~15 h) em uma solução de bloqueio.

Após a lavagem das membranas, estas foram incubadas por 90 min com o anticorpo primário anti-CYP1A de peixe produzido em coelho (CAYMAN Chemical®, código CP-226), diluído em solução de bloqueio na proporção de 1:7.500. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas e, em seguida, incubadas por 90 min com o anticorpo secundário anti-coelho (Amersham®, código RPN 2108), diluído na proporção de 1:12.500.

A detecção das proteínas foi realizada pelo método de quimioluminescência, em que as membranas, após incubação com os anticorpos primário e secundário, foram expostas a uma solução do kit comercial *Clarity Max™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad®). O cálculo de sinal quimioluminescente foi realizado de acordo com a seguinte fórmula:

$$UA=(AVQ/AVSF)*FC$$

Onde,

UA = Unidades arbitrárias de CYP1A

AVQ = Volume ajustado de sinal quimioluminescente da banda referente à proteína CYP1A

AVSF = Volume ajustado do sinal fluorescente referente às proteínas totais da amostra

FC = Fator de correção entre géis, calculado com base no controle positivo inserido na corrida

Como controle positivo, foi incluído, em cada corrida, 1 µg de proteínas microssomais de tainha (*Mugil* sp.) previamente exposta ao petróleo, ou 0,8 µg de microssomas hepáticos de camundongo (*M. musculus*, linhagem *Swiss*) tratados com β-naftoflavona.

9.7.2 Biomarcadores Moleculares

Extração de RNA total

Para extração de RNA total de tecido hepático de *L. dominicanus* e *P. puffinus*, 50 mg de tecido hepático de cada amostra foram homogeneizados em 1 mL de Qiazol® (Qiagen). A homogeneização foi realizada com o homogeneizador mecânico Tissue-Tearor® (BioSpec®).

O tecido homogeneizado em Qiazol® foi incubado a 20ºC por 30 min e, após esse período de incubação, foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio. Os tubos contendo a mistura de amostra homogeneizada em Qiazol® e clorofórmio foram agitados vigorosamente em vórtex por 15 s, mantidos a 20ºC por 3 min e centrifugados a 14.000 *x*g por 30 min a 4ºC.

Após a centrifugação, a fase transparente superior de cada um dos tecidos, referente à porção no qual o RNA está presente, foi cuidadosamente transferida para outros tubos, no qual foi acrescentado 0,5 mL de isopropanol. O conteúdo dos tubos foi misturado por inversão, incubado por 10 min a 20ºC e centrifugado a 14.000 *x*g por 30 min a 4ºC. Após a centrifugação, o RNA sedimentado no *pellet* foi mantido e o sobrenadante descartado. Em seguida, o RNA foi cuidadosamente lavado duas vezes consecutivas com etanol 75% para remover os reagentes utilizados durante a extração.

Após a purificação com etanol, o RNA foi seco a 40ºC e ressuspendido com água própria para aplicações de biologia molecular. Todos os reagentes, tubos e ponteiras utilizados no protocolo eram livres de RNases, DNases e pirógenos.

Avaliação da concentração, pureza e qualidade do RNA

A avaliação quantitativa e qualitativa do RNA foi realizada por espectrofotometria, utilizando o equipamento Nanodrop® One (Thermo Fisher Scientific), cujos limites de detecção variam de 1,6 ng/µL a 22.000 ng/µL. As leituras foram obtidas nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230 nm, que representam, respectivamente, os picos de absorção de ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas e contaminantes orgânicos, como fenol, carboidratos, EDTA e guanidina. A concentração de RNA foi estimada pela absorbância em 260 nm, enquanto a pureza foi avaliada pelas razões 260/280 (faixa de referência: 1,8 a 2,0) e 260/230 (valores aceitáveis > 1,7), conforme os critérios estabelecidos por Wieczorek, Delauriere e Schagat (2012).

A integridade e a qualidade das amostras de RNA, visando à obtenção de resultados confiáveis, foram avaliadas por fluorimetria utilizando o fluorímetro QUBiT 4.0 (Thermo Fisher Scientific). Para essa análise, foi utilizado o Qubit™ RNA IQ Assay Kit, cujo princípio baseia-se na utilização de dois corantes: um que interage com moléculas grandes e estruturalmente íntegras de RNA (mRNA, tRNA e rRNA), e outro que interage com moléculas de RNA pequenas e/ou degradadas. Com base em padrões fornecidos pelo próprio kit, o equipamento gera um *score* de qualidade (IQ) variando de 1 a 10, em que valores próximos a 1 indicam RNA

degradado, enquanto valores próximos a 10 indicam o RNA estruturalmente íntegro, sem evidências de degradação.

Em nota técnica disponibilizada pela fabricante (Thermo Fisher Scientific), os valores de IQ foram correlacionados à porcentagem de leituras mapeadas com sucesso por RNAseq, técnica empregada no sequenciamento de transcriptomas. Os resultados indicaram que amostras com valores de IQ superiores a 4 apresentaram, de modo geral, mais da metade das leituras mapeadas com sucesso via RNAseq. Assim, este valor foi considerado o mínimo aceitável para considerar o RNA com qualidade suficiente para este tipo de aplicação (THERMO SCIENTIFIC, 2018).

No entanto, devido à alta sensibilidade da técnica de PCR quantitativa (qPCR), optou-se pelo estabelecimento de um parâmetro mais robusto do que IQ > 4. Para isto, foram utilizadas amostras hepáticas de *C. mydas* mantidas em condições controladas de laboratório durante um período *post mortem* de 24 h. A qualidade de RNA de todas as amostras coletadas entre 0 a 24 h foi mensurada no fluorímetro QUBiT 4.0, sendo considerado como limite inferior de qualidade o valor médio de IQ obtido das amostras referentes a 24 h de degradação *post mortem* (IQ > 7,5).

Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), o RNA total extraído das amostras de tecido hepático de *C. mydas* foi submetido a tratamento com DNase e, sequencialmente, à reação de transcrição reversa utilizando o kit Quantitect Reverse Transcription® (Qiagen), conforme as especificações do fabricante.

Reações de PCR em tempo real (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas em duplicata no termociclador CFX Opus 96 Real-Time PCR System (BioRad), utilizando o kit SSOAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix kit (BioRad). O volume final de cada reação foi de 20 µL, com concentração de 0,5 µM para cada iniciador (detalhes dos primers nas **Tabela 9.7-1** e **Tabela 9.7-2**). O protocolo de ciclagem térmica consistiu em uma etapa inicial de ativação da polimerase e desnaturação do DNA (cDNA) à 95°C por 30 s, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60°C por 30 s (para

anelamento e extensão), com aquisição de sinal fluorescente ao final de cada ciclo. Após os 40 ciclos de amplificação, foi realizada a análise da curva de dissociação (melt curve) em rampa de temperatura de 65°C a 95°C, com incrementos de 0,5°C a cada 5 s.

A quantificação absoluta foi baseada em uma curva-padrão preparada a partir de fragmentos de DNA sintético (gBlocks™ Gene Fragments, IDT) contendo as sequências de todos os genes-alvo, com intervalo de 28,125 a 4.500.000 cópias por reação. Amostras com Cq acima de 30 ciclos ou com coeficiente de variação acima de 30% foram excluídas das análises por serem consideradas inadequadas.

Tabela 9.7-1. *Iniciadores senso (F) e anti-senso (R) selecionados para quantificação dos transcritos dos genes-alvo Receptor de hidrocarboneto aromático (AhR), Citocromo P450 1A (CYP1A4), Receptor de estrogênio (ESR1), Glutationa S-transferase alfa (GSTA), Uridina difosfo glicuroniltransferase 1 (UGT1) e Vitelogenina (VTG2) em tecido hepático de Larus dominicanus.*

Gene alvo	Iniciadores	Tm (°C)	%GC
Receptor de Hidrocarboneto Aromático (AhR)	F: CAGGACTACCTGGGCTTTCATC	64.1	54.5
	R:CGGAAGGCGTCTCTGTCATC	64	60
Citocromo P4501A4 (CYP1A4)	F:CTACGACCACAACGACCAAGAG	64.2	54.5
	R:GGTGCGGCTGGGAAGATAC	64.4	63.2
Receptor de estrógeno (ESR1)	F:CCTTCATCCATCATCACAGCCAACAG	67	50
	R:GAGCAGGTTCCCTCATCCCAAAG	66.4	56.5
Glutationa S-transferase alfa (GSTA)	F:TTTCAGCAAGTGCCAATGGTGGAG	67.5	50
	R:TTCAGGTCCTTCCCGTAGAGGTTG	67	54.2
Uridina difosfo glicuroniltransferase (UGT1A)	F:GCACTGGGTGGAGTTTGTGATGAG	66.9	54.2
	R:CGGCAAGGAGGAAGGCAATGA	66.7	57.1
Vitelogenina (VTG2)	F:TGACATCTCCGAGAACCTGCGATA	66.7	50
	R:GGTGTACCTGGACTTGAAGGGAATG	66.2	52

Tabela 9.7-2. *Iniciadores senso (F) e anti-senso (R) selecionados para quantificação dos transcritos dos genes alvo Receptor de hidrocarboneto aromático (AhR), Citocromo P450 1A (CYP1A5), Receptor de estrogênio (ESR1), Glutationa S-transferase alfa (GSTA), Uridina difosfo glicuroniltransferase 1 (UGT1) e Vitelogenina (VTG1) em tecido hepático de Puffinus puffinus.*

Gene alvo	Iniciadores	Tm (°C)	%GC
Receptor de hidrocarbonetos de arila (AhR)	F: GTCCGAATGATGAAGACAGGTGAGAGTG	60,0	50,0
	R: GGTCTTTGCGTGGCAATGATGTAATCC	60,0	48,1
Citocromo P450 1A (CYP1A5)	F: ACAGTTTGGTGATGTGGCTGCTG	59,9	52,2
	R: TCTGTAGGAAATGGAGGAATCGCTTGTTG	59,9	44,8
Receptor de estrogênio alfa (ESR1)	F: GCAGAGGTGGGCGAATGATGAAAC	60,2	54,2
	R: ACAGGGCTGGACTGTTCTTCTTGTTATG	60,1	46,2
	F: GACCTGAAGGAGAGAGCCCTGTAATG	59,9	53,8

PÚBLICA

Gene alvo	Iniciadores	Tm (°C)	%GC
Glutationa S-transferase alfa (GSTA)	R: TGCTGTATCACCCTGAACCTGACTG	60,1	52,0
UDP glucuronosiltransferase (UGT1)	F: CCACAGAATGATCTTCTAGCTCACCCTAAG	59,3	46,7
	R: GCGTTGTCCATCTGGTCTCCAAATAAAG	59,3	46,4
Vitelogenina 1 (VTG1)	F: ACCAGTGGAAGTGCTGAGAGTACAAC	60,0	50,0
	R: TTGGCTTTGGACCGTCTTGCTTTC	60,0	50,0

9.7.3 Biomarcadores de dano

Extração de dna pelo método salting out

Realizado de acordo com o item 9.3.1.

Detecção de adutos de BPDE-DNA

Realizado de acordo com o item 9.3.2.

9.7.4 Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados quanto à aderência ao modelo de distribuição normal (*i.e.* gaussiana) por meio dos testes de D'Agostino e Pearson, e quanto à homogeneidade das variâncias utilizando-se o teste de Bartlett ou o teste F.

Para investigar a influência de variáveis categóricas, como fatores biológicos, que variaram de acordo com a espécie estudada, ambientais (sazonalidade e ano de coleta) e níveis de contaminantes orgânicos, sobre as respostas dos biomarcadores, foram realizadas comparações entre grupos. Considerando os resultados das análises de distribuição dos dados e homocedasticidade, optou-se por aplicar: i) para dados não-paramétricos, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Dunns, para fatores com mais de dois níveis, e o teste U de Mann-Whitney para fatores com dois níveis; ii) para dados paramétricos, ANOVA com teste *post-hoc* de Tukey, para fatores com mais de dois níveis, e teste t não-pareado para fatores com dois níveis. Todos os testes foram realizados sem remoção de dados discrepantes (*outliers*).

Além das comparações entre grupos, foram realizadas análises pareadas de correlação de Spearman para verificar padrões de associação entre os biomarcadores analisados e variáveis contínuas, exceto para *S. leucogaster*.

Os gráficos e análises estatísticas de *L. dominicanus* e *P. puffinus* referem-se aos dados acumulados ao longo dos últimos oito anos, contemplando o 1º ciclo e o 2º ciclo de atividades, com resultados consolidados até dezembro de 2025.

Para *S. leucogaster*, os resultados apresentados correspondem exclusivamente aos dados gerados no ciclo atual de atividades.

As informações detalhadas sobre os espécimes analisados cujas amostras foram utilizadas nas análises de biomarcadores durante o período de referência do relatório estão apresentadas no ***Apêndice 08 – Biomarcadores - Anexo A***.

Os demais parâmetros analisados, que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, encontram-se descritos no ***Apêndice 8 – Biomarcadores - Anexo B***.

9.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO DE BIOMARCADORES EM AVES MARINHAS

Para as aves marinhas, as comparações entre grupos consideraram os seguintes fatores: sexo, sazonalidade, escore corporal, faixa etária, ano de coleta, níveis de ΣHPA, ΣPCB e ΣDDTs no tecido hepático, além de ΣDrins, HCB no tecido hepático e presença de óleo nas penas, avaliados exclusivamente para *P. puffinus*.

9.8.1 Larus dominicanus

Na comparação entre grupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos biomarcadores em função dos níveis de ΣHPA e ΣPCB analisados no tecido hepático. No entanto, indivíduos com níveis de ΣDDTs acima do limite de detecção (> LD) apresentaram menor atividade GST e menores níveis de transcritos de *AhR* e *ESR1* quando comparados àqueles com níveis de ΣDDTs abaixo do limite de detecção (< LD) (**Figura V-1**). Além das diferenças nas comparações entre grupos, os níveis de ΣDDTs apresentaram correlação negativa com a atividade GST.

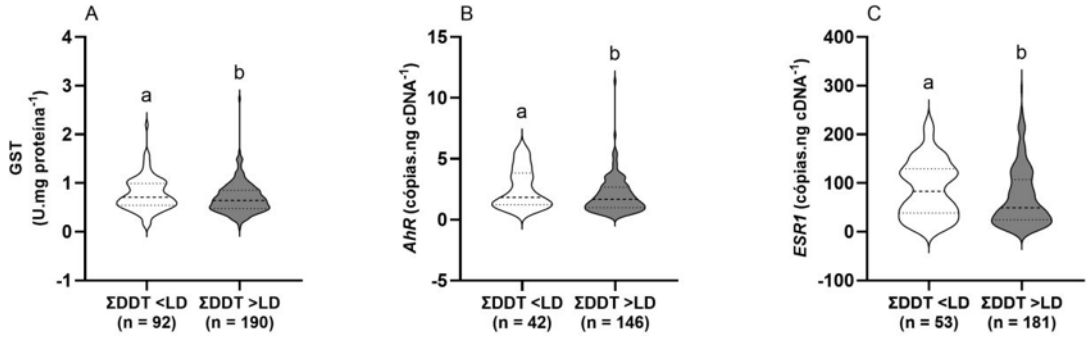


Figura 9.8-1. *(A) Atividade GST e níveis de transcritos de (B) AhR e (C) ESR1 em tecido hepático de Larus dominicanus agrupados de acordo com os níveis totais de DDTs no tecido hepático.*

O DDT e seu principal metabólito, DDE, são considerados compostos xenoestrogênicos capazes de interferir na fisiologia do sistema endócrino devido às suas propriedades de desregulação endócrina (WHO/UNEP, 2012; MONTEIRO et al., 2015). Nesse contexto, tem sido sugerida uma associação entre a exposição a metabólitos do DDT e uma tendência crescente de desordens relacionadas ao sistema endócrino em humanos e animais silvestres (WHO/UNEP, 2012).

Nos exemplares de *L. dominicanus*, o principal composto detectado desta classe foi o *p,p'*-DDE, presente em 60% das amostras, enquanto o DDD e DDT foram detectados em 5% e 2% das amostras, respectivamente. Dessa forma, sugere-se que os efeitos observados nos biomarcadores estejam majoritariamente associados à exposição ao *p.p'*-DDE.

O DDE tem sido caracterizado como um potente antagonista dos receptores andrógenos (AR) (XU et al., 2006), podendo interagir de forma aditiva ou multiplicativa (i.e. sinérgica) com outros poluentes ambientais desreguladores endócrinos. De fato, estudos pretéritos demonstraram que a exposição ao DDE produziu alterações no equilíbrio de hormônios sexuais, induzindo aumento na síntese de estrogênio (BORNMAN et al., 2018) e promovendo disfunções reprodutivas (HOFFMANN; KLOAS, 2016).

Estudos realizados em ratos demonstraram que a exposição crônica (12 semanas) a altas concentrações de DDTs resultou em redução dos níveis de transcritos de *ESR1* no ovário. Segundo os autores, essa redução poderia representar uma adaptação celular atuando na redução da sensibilidade celular ao xenoestrógeno (KALININA; KONONCHUK; GULYAEVA, 2017). No entanto, os

mecanismos pelos quais o DDT e seus metabólitos influenciam os níveis de transcritos de *ESR1* em *L. dominicanus* permanecem pouco compreendidos.

A hipótese de desregulação endócrina promovida por DDT em *L. dominicanus* é reforçada pela menor atividade GST e pelos menores níveis de transcritos de *AhR*, provavelmente via sinalização cruzada entre ESR1 e AhR. Nesse contexto, os agonistas do ESR1, como o DDT, podem modular a expressão de seus genes-alvo e, simultaneamente, diminuir, aumentar ou não alterar a expressão dos genes regulados pelo AhR (MADAK-ERDOGAN; KATZENELLENBOGEN, 2012; SZAEFER; LICZNERSKA; BAER-DUBOWSKA,

2024; LEMAIRE et al., 2006). Alguns estudos indicam que o oposto também é verdadeiro, ou seja, agonistas de *AhR* além de afetar seus genes-alvo, podem exercer efeitos inibitórios sobre a via de sinalização de ESR1 (MADAK-ERDOGAN; KATZENELLENBOGEN, 2012; SZAEFER; LICZNERSKA; BAER-DUBOWSKA, 2024).

Também foi observada correlação negativa entre os níveis de transcritos de *VTG1* e ΣPCB (**Figura 9.8-2**), sugerindo possível interferência de contaminantes organoclorados na regulação endócrina hepática. A expressão da vitelogenina pode ser negativamente modulada por ativadores do receptor AhR, possivelmente em decorrência de mecanismos de sinalização cruzada (*crosstalk*) entre *AhR* e receptor de estrógeno (*ER*), conforme discutido anteriormente. De acordo com essa hipótese, PCB que atuam como agonistas clássicos de AhR poderiam interferir na sinalização mediada por ER, reduzindo a expressão de genes relacionados ao estrógeno, como *VTG1* (BEMANIAN; MALE; GOKSØYR, 2004; CORNIUK et al., 2023; TIAN et al., 2015).

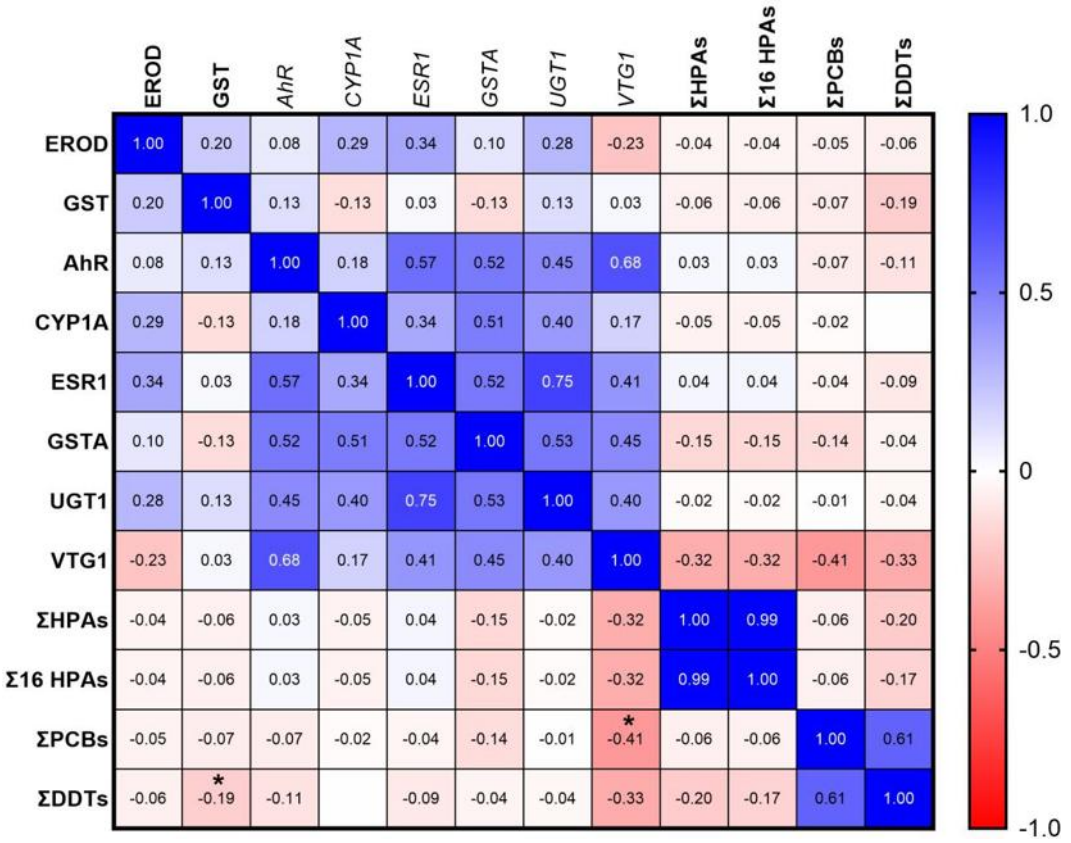


Figura 9.8-2. *Mapa de calor das correlações de Spearman para-a-par para biomarcadores bioquímicos e moleculares e níveis de HPA e organohalogenados bioacumulados no tecido hepático de Larus dominicanus. *Indicam correlações significativas (p < 0,05).*

Aves caquéticas apresentaram menor atividade EROD e GST quando comparadas àquelas com escore corporal magro, bom e ótimo (**Figura 9.8-3A** e **B**). De forma semelhante, os níveis de transcritos de *ESR1* foram inferiores em gaivotas caquéticas em relação às aves com escore corporal magro e ótimo (**Figura 9.8-3C**). Por outro lado, os níveis de transcritos de *UGT1* foram maiores nos animais caquéticos (**Figura 9.8-3D**).

PÚBLICA

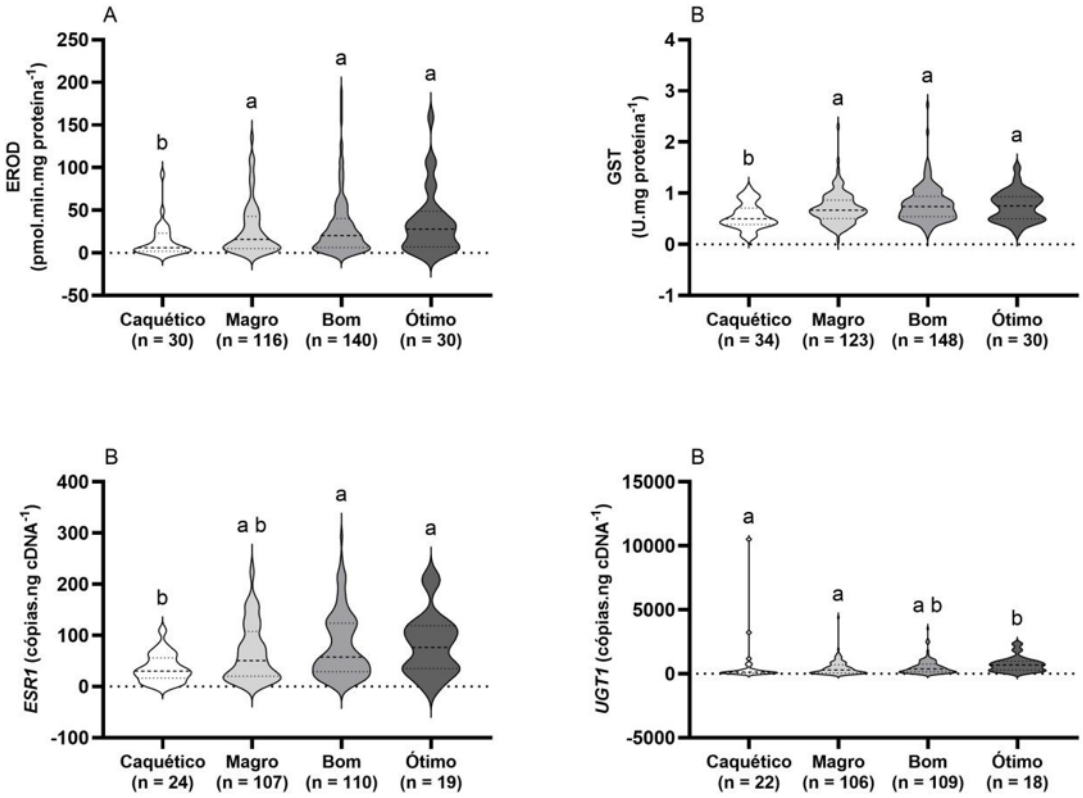


Figura 9.8-3. *Atividade (A) EROD e (B) GST e níveis de transcritos de (C) ESR1 e (D) UGT1 em tecido hepático de* ***Larus dominicanus*** *categorizados pelo escore corporal.*

Animais em estado corporal caquético ou magro encontram-se em uma condição metabólica semelhante à observada durante períodos de jejum prolongado ou inanição, sendo este último tradicionalmente dividido em três fases sequenciais (McCUE, 2010). Assim, os resultados observados no presente trabalho podem estar associados à diminuição das reservas energéticas, refletida pelo aumento do catabolismo proteico e pela diminuição da taxa metabólica característica da terceira fase da inanição (RODRÍGUEZ; TORTOSA; VILLAFUERTE, 2005; McCUE, 2010). De modo geral, postula-se que em situações de estresse fisiológico, como privação alimentar, anaerobiose, desidratação e baixas temperaturas, os organismos tendem a priorizar funções essenciais à sobrevivência, reduzindo atividades consideradas não essenciais (McCUE, 2010), incluindo aquelas relacionadas à biotransformação de xenobióticos analisadas neste trabalho.

O aumento dos níveis de transcritos de *UGT1* observado em *L. dominicanus* é similar ao aumento da expressão de múltiplas isoformas da família *UGT1* (como

Ugt1a1, *Ugt1a6* e *Ugt1a9*) descrito em camundongos com esteatose hepática induzida por jejum (DUVALDESTIN; MAHU; BERTHELOT, 1975). Nesses modelos, a modulação das isoformas de *UGT1* parece ser mediada via receptor nuclear PPARα (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxisoma Alfa) e pelo fator de transcrição Nrf2, em resposta à mobilização de ácidos graxos livres. No entanto, estudos com roedores também demonstram que a maior expressão de *UGT1* nem sempre resulta em aumento proporcional da atividade global de glucuronidação (XU et al., 2012).

Dessa forma, a caquexia/inanição deve ser considerada um importante fator fisiológico de confusão na interpretação de *UGT1, ESR1,* EROD e GST como biomarcadores de exposição em *L. dominicanus*

Os resultados de comparação entre grupos também evidenciaram influência significativa da idade sobre a resposta de diversos biomarcadores analisados. Os valores de atividade EROD, bem como os níveis de transcritos de *CYP1A*, *ESR1* e *UGT1*, foram mais elevados em animais adultos quando comparados aos valores médios observados em aves juvenis (**Figura 9.8-4**).

Os gaivotões *L. dominicanus* apresentam características morfológicas bastante distintas entre juvenis e adultos, principalmente relacionadas ao padrão de plumagem (NOVELLI, 1997). Quando adultos, em período de reprodução, que ocorre entre os meses de junho a novembro, observa-se maior deslocamento para ilhas próximas ao litoral (REIS, 2014), o que pode acarretar em alterações quali-quantitativas na dieta destes animais, conforme descrito para espécies do gênero *Larus* (ANNETT; PIEROTTI, 1989; LUDYNIA; GARTHE; LUNA-JORQUERA, 2005).

PÚBLICA

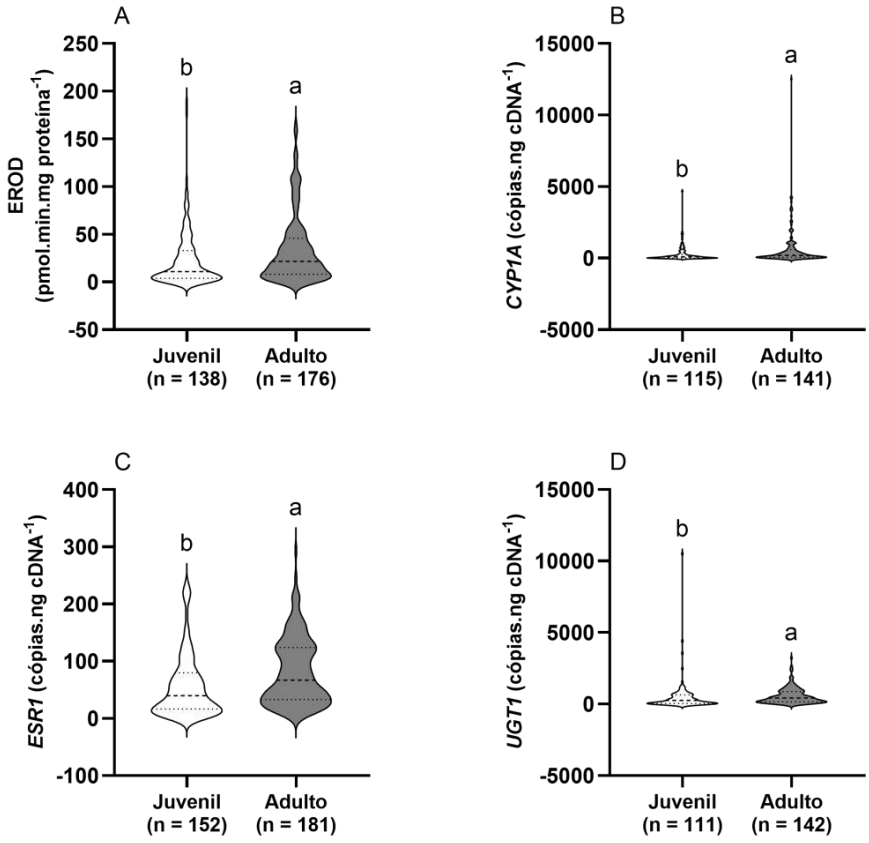


Figura 9.8-4. *Atividade (A) EROD e níveis de transcritos de (B) CYP1A (C) ESR1 e (D) UGT1 em tecido hepático de Larus dominicanus categorizados pela faixa etária.*

Este deslocamento também pode promover aumento da exposição trófica a misturas complexas de contaminantes ambientais de origem antrópica, potencialmente refletindo em maior atividade e expressão de enzimas envolvidas nos processos de biotransformação e desintoxicação de xenobióticos, conforme observado no presente trabalho.

No presente estudo, os níveis de ΣHPA, dos 16 HPA prioritários, ΣDDTs e ΣPCB totais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as faixas etárias avaliadas (**Figura 9.8-5**). No entanto, cabe ressaltar que, no ambiente, podem estar presentes grupos de compostos químicos não analisados no âmbito deste projeto, potencialmente capazes de influenciar alguns dos biomarcadores analisados, incluindo produtos de uso pessoal, fármacos, aditivos químicos, entre outros, oriundos do aporte de efluentes domésticos e industriais.

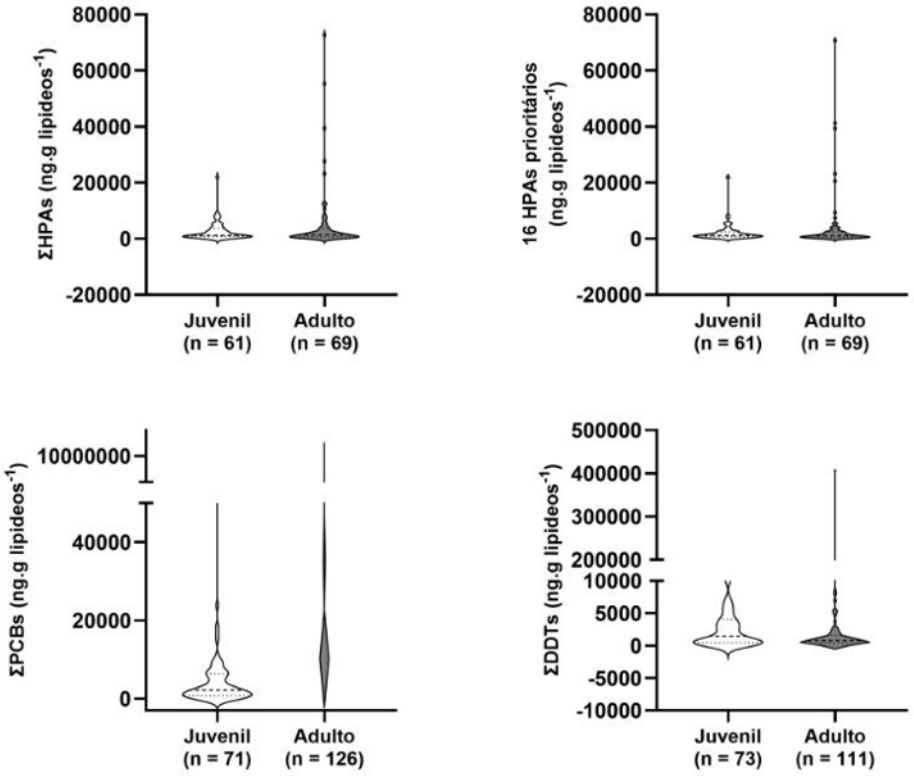


Figura 9.8-5. *Níveis de contaminantes em tecido hepático de Larus dominicanus. Os níveis de (A) ΣHPA, (B) 16 HPA prioritários (C) PCB e (D) ΣDDTs foram analisados em Larus dominicanus quanto à influência do fator faixa etária.*

Em relação às comparações entre as estações do ano, a atividade EROD foi menor em gaivotas amostradas no verão quando comparadas àquelas amostradas na primavera e no inverno (**Figura 9.8-6**). Esses resultados sugerem que variações sazonais na atividade enzimática podem ser influenciadas por fatores ambientais e fisiológicos. Nesse contexto, os maiores níveis de atividade EROD observados na primavera e no inverno podem refletir aumento na exposição a contaminantes, mudanças na dieta ou maior na demanda metabólica para manutenção da homeostase em temperaturas mais baixas (FOSSI; LEONZIO; FOCARDI, 1989; EBERT; BRANCO, 2009, RAJA-AHO et al., 2012).

Dessa forma, os resultados indicam que a atividade de EROD é sensível a variações ambientais e fisiológicas em *L. dominicanus*.

PÚBLICA

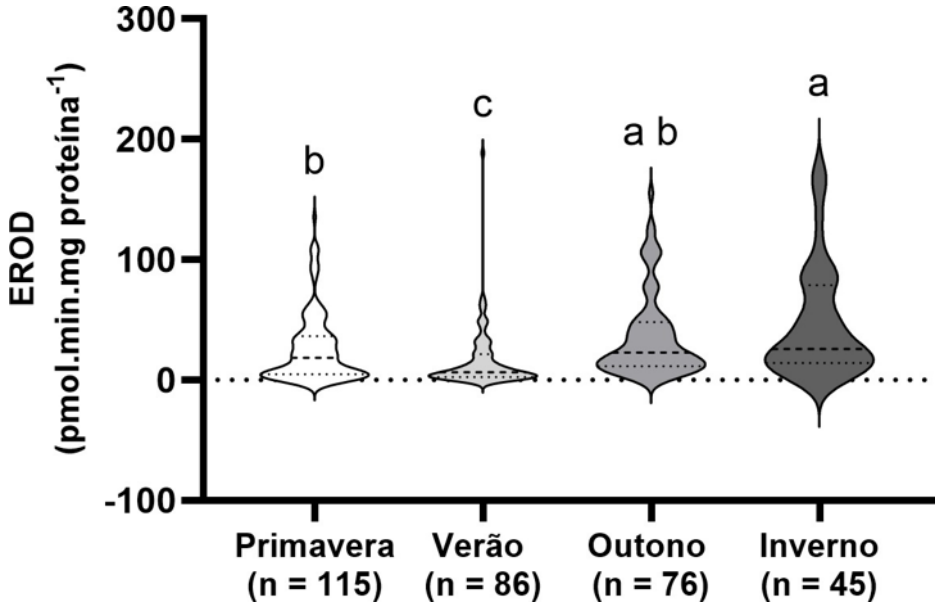


Figura 9.8-6. *Atividade EROD em tecido hepático de* ***Larus dominicanus*** *categorizados pela estação do ano*

Por fim, nas comparações entre os anos de amostragem, diversos biomarcadores avaliados apresentaram variação temporal significativa, conforme demonstrado na **Figura 9.8-7**. A atividade EROD foi maior em gaivotões amostrados em 2019 quando comparados àqueles coletados em 2023 (**Figura 9.8-7A**). Já as aves coletadas em 2020 apresentaram menor atividade GST em relação às amostradas em 2018 e 2019, bem como entre 2022 e 2024 (**Figura 9.8-7B**). Os níveis de transcritos de *CYP1A* foram mais elevados em gaivotas coletadas entre 2020 e 2022 em relação ao período de 2017 a 2019 (**Figura 9.8-7C**). Em contraste, os níveis de transcritos de *ESR1* foram maiores entre 2018 e 2020, quando comparados aos observados em 2022 e 2023 (**Figura 9.8-7D**). Para *UGT1*, os maiores níveis de transcritos foram observados em 2018 e 2019, em relação a 2022 (**Figura 9.8-7E**)

PÚBLICA

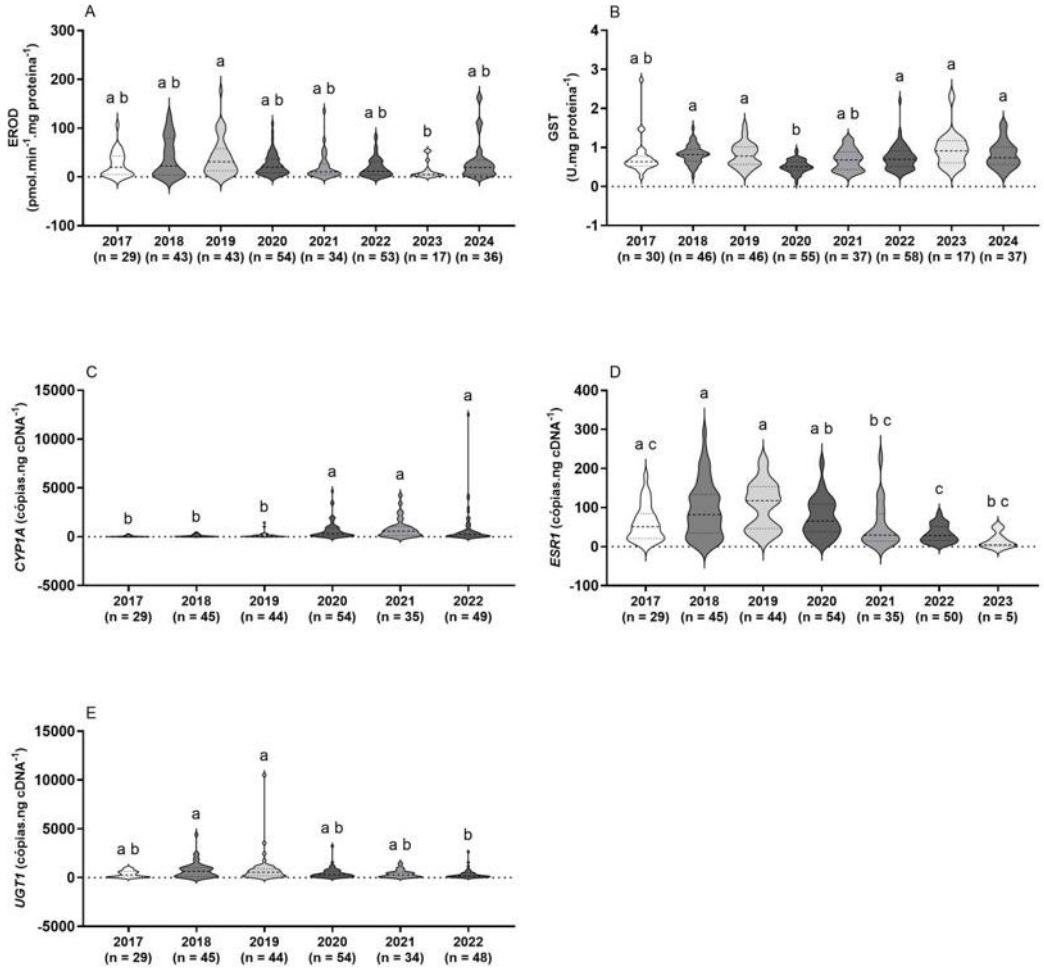


***Figura 9.8-7**. Atividade (A) EROD e (B) GST e níveis de transcritos de (C) CYP1A, (D) ESR1 e (E) UGT1 em tecido hepático de Larus dominicanus categorizados pelo ano de coleta.*

As análises de comparações entre grupos para o fator sexo não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas nos espécimes de *L. dominicanus* avaliados.

9.8.2 Puffinus puffinus

Nas análises em tecido hepático de *P. pufinus*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos biomarcadores em função dos níveis de ΣHPA e ΣDrins analisados no tecido hepático. Não foi possível realizar comparações entre grupos para ΣPCB e ΣDDTs, uma vez que o número amostral de indivíduos com concentrações desses contaminantes abaixo do limite de detecção (LD) foi insuficiente para análise estatística.

As comparações entre grupos indicaram que aves com níveis de HCB acima do LD apresentaram menores níveis de transcritos de *CYP1A5* e *UGT1* (**Figura 9.8-8B** e **C**), sugerindo possível efeito negativo do HCB sobre processos de biotransformação de xenobióticos. Por outro lado, a atividade GST foi maior em aves com níveis de HCB acima do LD (**Figura 9.8-8A**), sendo também observada correlação positiva entre HCB e a atividade GST (**Figura 9.8-9**).

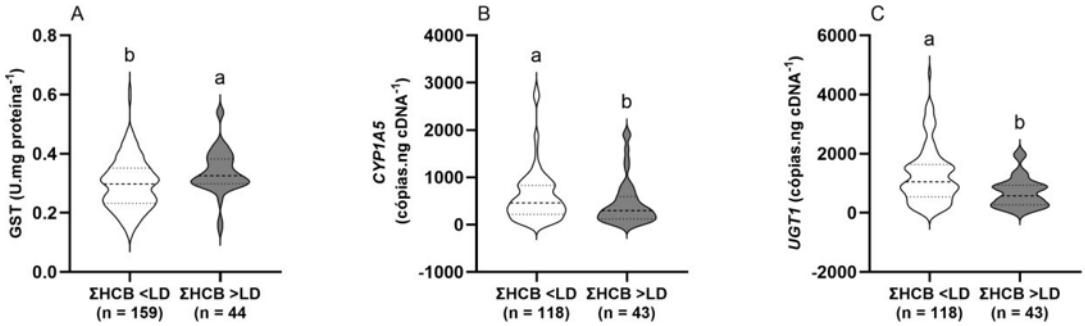


Figura 9.8-8. *(A) Atividade GST e níveis de transcritos de (B) CYP1A5 e (C) UGT1 em tecido hepático de Puffinus puffinus agrupados de acordo com os níveis totais de HCB no tecido hepático.*

O HCB é classificado como um composto organohalogenado sintético com atividade fungicida, amplamente utilizado até a década de 1980, quando seu uso agrícola foi banido. No entanto, o composto ainda apresenta aplicações industriais, podendo ser liberado no ambiente como subproduto da fabricação de produtos químicos orgânicos, incluindo tintas e borrachas (BERNTSSEN; MAAGE; LUNDEBYE, 2017). Devido à sua elevada volatilidade, persistência e alta lipofilicidade, o HCB é rapidamente absorvido em células animais, configurando-se como um contaminante de relevante preocupação ambiental.

Estudos in vitro e in vivo realizados com ratos indicam que o HCB é metabolizado por enzimas do sistema citocromo P450 e por conjugação com glutationa reduzida (GSH) endógena, mediadas pela ativação do receptor AhR (HAHN et al., 1989; RENNER, 1981; RENNER; NGUYEN, 1984). Nesse contexto, Ezendam et al. (2004) demonstraram que ratos expostos ao HCB via dieta apresentaram aumento nos níveis de transcritos de genes que codificam diversos citocromos, incluindo CYP1A1, CYP1B1 e CYP2A, além de enzimas de fase II, como GST, UGT e sulfotransferases, sugerindo seu envolvimento na biotransformação do composto.

No entanto, os resultados observados para os níveis de transcritos de CYP1A5 e UGT1 em *P. puffinus* contrastaram com aqueles observados para a atividade GST, sugerindo que, para esses biomarcadores, a exposição a HCB não está associada a um processo de indução. Em vez disso, os resultados podem indicar potencial redução da capacidade de biotransformação desse composto na espécie.

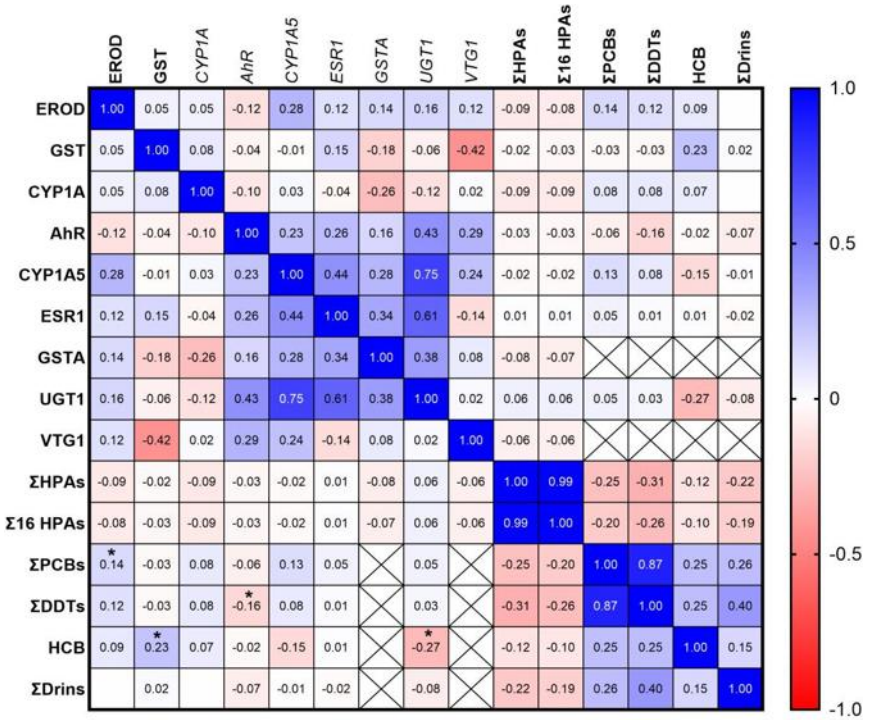


Figura 9.8-9. *Mapa de calor das correlações de Spearman para-a-par para biomarcadores bioquímicos e moleculares e níveis de HPA e organohalogenados bioacumulados no tecido hepático de Puffinus puffinus. * Indicam correlações significativas (p < 0,05).*

Adicionalmente, foi observada correlação positiva entre os níveis de ΣPCB e a atividade EROD (**Figura 9.8-9)**, indicando possível indução devido enzimática associada à presença de congêneres de PCB similares a dioxina (DL-PCB). As CYPs desempenham papel central na biotransformação de fase I, mediando etapas oxidativas iniciais do metabolismo de contaminantes organohalogenados, incluindo a inserção de grupos hidroxila (OH) em moléculas de PCB (HELGASON et al., 2010). A elevação da atividade de CYP após a exposição a PCB geralmente decorre do aumento da produção de RNA mensageiro, seguido pela tradução em proteínas com atividade catalítica. Esse processo, geralmente referido como indução, é regulado por receptores nucleares específicos, incluindo o *AhR*

(HELGASON et al., 2010). Parte dos PCB detectados no fígado de *P. puffinus* correspondeu à classe dos DL-PCB, sendo possível supor que os níveis observados tenham sido suficientes para modular a correlação positiva ΣPCB e a atividade EROD.

Além disso, foi observada correlação negativa entre os níveis de ΣDDTs e os níveis de transcritos de *AhR* (**Figura 9.8-9**). Embora diversos estudos tenham investigado os efeitos bioquímicos e moleculares dos DDTs, diferenças entre linhagens celulares, tecidos, espécies, congêneres avaliados e tempo de exposição dificultam comparações diretas entre os resultados (THOMPSON et al., 2019). Em linhagens de câncer de mama MCF-7, por exemplo, foram identificados genes induzidos por DDT (como *Acetilcolinesterase* e *GSTO1*), bem como genes reprimidos por DDT (como *CYP1A1*, *AhR* e *UGT1A6*). De forma semelhante, em placenta humana, a atividade EROD foi inibida após exposição a DDT e DDE em todas as concentrações testadas (WÓJTOWICZ et al., 2011), corroborando o efeito inibitório de o,p'-DDT observado em culturas de células Hepa (JEONG; KIM, 2002). Em conjunto, esses resultados sugerem que determinados DDTs e seus metabólitos podem exercer efeitos supressores sobre vias mediadas por *AhR*.

Em contrapartida, estudos em mamíferos apontam que um alto acúmulo de compostos estrogênicos, como o *p,p'*-DDT e o metabólito *p,p'*-DDE, podem exercer um efeito sinérgico sobre a sinalização de ER em associação com congêneres do tipo dioxina, por meio da ativação de *AhR* (YOSHINOUCHI et al., 2019). Assim, a correlação negativa observada no presente estudo pode refletir mecanismos de regulação negativa da via AhR associados à exposição crônica a DDTs e seus metabólitos.

Em relação à presença de óleo nas penas, a atividade EROD e os níveis de transcritos de *CYP1A5* foram significativamente maiores em aves oleadas quando comparadas às aves não oleadas (**Figura 9.8-10**). Esses resultados são consistentes com o esperado para citocromos P450, uma vez que a atividade EROD, catalisada predominantemente por isoformas de CYP1A, é considerada um biomarcador sensível à exposição a hidrocarbonetos aromáticos do petróleo (KING; ELLIOTT; WILLIAMS, 2021). A aplicabilidade da EROD como biomarcador está diretamente relacionada à modulação de *CYP1A* via ativação do receptor *AhR* por componentes do petróleo (KING; ELLIOTT; WILLIAMS, 2021). Em aves, estão

PÚBLICA

descritos os parálogos *CYP1A4* e *CYP1A5* (JÖNSSON et al., 2011), sendo que no presente projeto, foi quantificado os níveis de transcritos de *CYP1A5*, também regulado por *AhR* (KUBOTA et al., 2006).

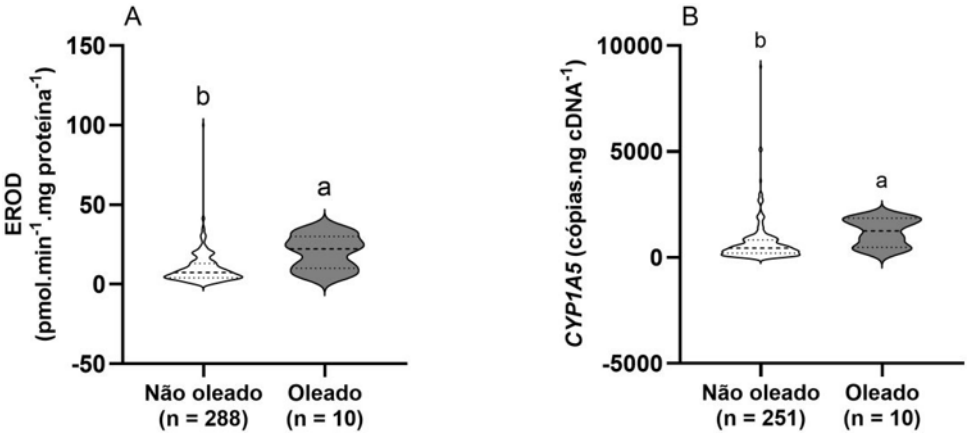


***Figura 9.8-10**. Atividade EROD e (B) níveis de transcritos de CYP1A5 em amostras de tecido hepático de Puffinus puffinus categorizadas pelo fator óleo nas penas.*

Corroborando os resultados observados neste estudo, diversos trabalhos já demonstraram aumento da expressão de CYP1A em resposta à exposição ao petróleo, tanto em cenários de derramamentos ambientais quanto em ensaios experimentais controlados. Nesse contexto, estudos reportaram maior expressão de CYP1A após derramamentos de petróleo (VARANASI, 1989; WHITEHEAD et al., 2012; BREWTON et al., 2013; DUBANSKY et al., 2013; CROWE et al., 2014; BROWN-PETERSON et al., 2015; XU et al., 2016, 2017), bem como em experimentos de exposição controlada ao petróleo proveniente do poço MC252, associado ao incidente da Deepwater Horizon no Golfo do México, em 2010 (ALEXANDER et al., 2017).

Considerando a sensibilidade de *CYP1A5* à exposição a contaminantes orgânicos, investigou-se também a influência de fatores sazonais sobre esse biomarcador em *P. puffinus.* Os níveis de transcritos de *CYP1A5* apresentaram variação sazonal, com valores mais altos no inverno e menores no verão (**Figura 9.8-11**). Entretanto, os tamanhos amostrais de ambos os grupos são limitados (n = 7 no verão e n = 14 no inverno), além da ausência de amostras no outono. Assim, essa variação deve ser interpretada com cautela, embora possa refletir mudanças

nas condições ambientais e no regime alimentar ao longo do ciclo migratório da espécie.

Puffinus puffinus é uma ave marinha migratória transequatorial, que se reproduz em colônias no Atlântico Norte, principalmente em ilhas costeiras da Grã-Bretanha e Irlanda, utilizando áreas do Atlântico Sul durante o período não reprodutivo. Após a reprodução, os indivíduos migram em direção à costa sul-americana, com registros no Brasil principalmente entre setembro e dezembro, e permanência na costa da América do Sul durante o verão austral, aproximadamente de dezembro a março. O retorno às colônias ocorre no fim do inverno e início da primavera boreal. Nesse período, as aves ocupam colônias em ilhas costeiras e nidificam em tocas, embora a postura geralmente ocorra entre abril e maio. (DEL HOYO; ELLIOTT; SARGATAL, 1992).

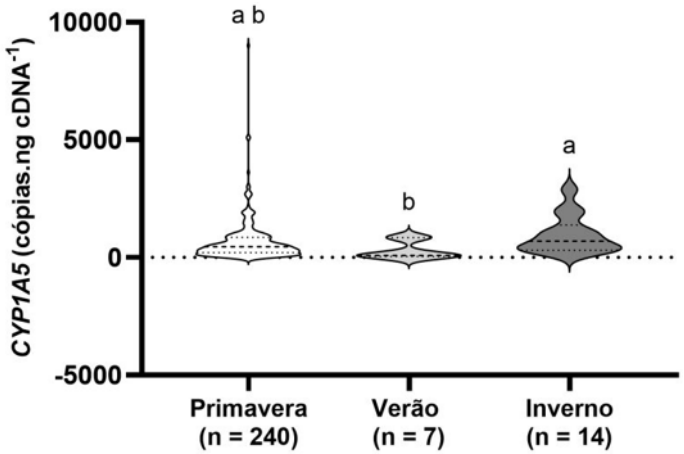


***Figura 9.8-11**. Níveis de transcritos de CYP1A5 em tecido hepático de Puffinus puffinus categorizados pela estação do ano.*

Durante a migração, ocorre elevado gasto energético, promovendo a mobilização das reservas lipídicas (GUGLIELMO, 2010), onde se acumulam muitos contaminantes lipofílicos, como HPA e PCB. A mobilização dessas reservas pode aumentar a liberação de contaminantes para a circulação sanguínea, elevando sua biodisponibilidade e, consequentemente, a expressão de genes envolvidos nos sistemas de biotransformação (VIJAYAN; ALURE; MAULA, 2006; KREITSBERG et al., 2023).

Nesse contexto, estudos conduzidos por Leat et al. (2013) destacaram a influência das áreas de migração sobre as concentrações de POPs em *Stercorarius*

skua. De forma semelhante, uma revisão recente conduzida por Serafini et al. (2024) identificou associação positiva entre os níveis hepáticos de transcritos de *CYP1A5* em *P. puffinus* durante o inverno e a presença de contaminantes organoclorados e HPA. Em conjunto, esses achados reforçam a hipótese de variação sazonal na resposta de detoxificação, particularmente durante períodos pós-migratórios. Além da variação sazonal, também foi observada variação temporal anual em diversos biomarcadores em *P. puffinus* (**Figura 9.8-12**).

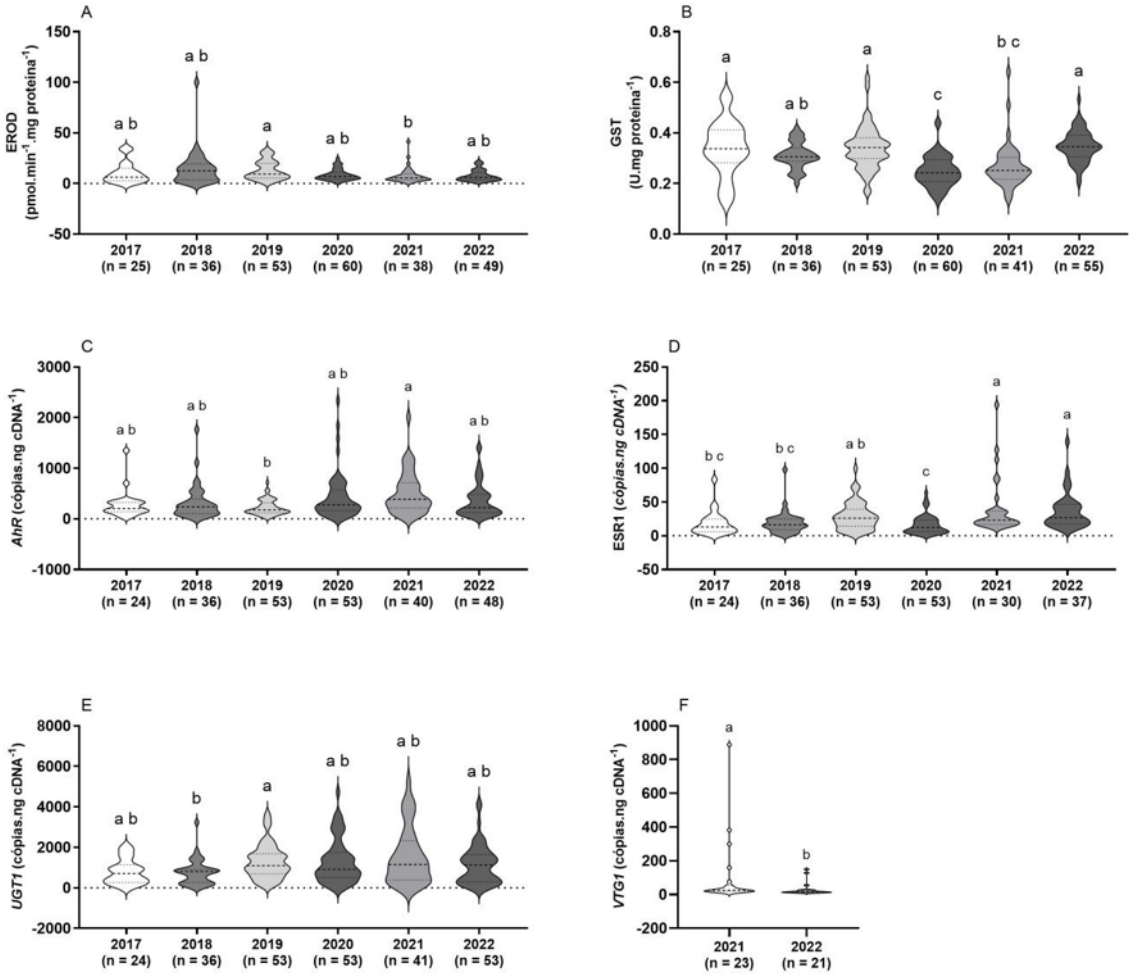


Figura 9.8-12. *Atividade (A) EROD e (B) GST e níveis de transcritos de (C) AhR, (D) ESR1, (E) UGT1 e (F) VTG1 em amostras de tecido hepático de Puffinus puffinus categorizadas pelo ano de coleta.*

A atividade EROD foi maior em aves coletadas em 2019 quando comparadas àquelas amostradas em 2021 (**Figura 9.8-12A**). Em contraste, a atividade GST foi

menor em aves coletadas em 2020 em relação às amostradas em 2017, 2019 e 2022 (**Figura 9.8-12B**).

Em relação aos biomarcadores moleculares, observou-se que os níveis de transcritos de *AhR* foram menores em aves coletadas em 2019 quando comparadas àquelas amostradas em 2021 (**Figura 9.8-12C**). De forma semelhante, aves coletadas em 2020 apresentaram menores níveis de transcritos de *ESR1* em relação às coletadas em 2021 e 2022 (**Figura 9.8-12D**). Para *UGT1*, maiores níveis de transcritos foram observados em aves coletadas em 2019 quando comparadas às amostradas em 2018 (**Figura 9.8-12E**). Adicionalmente, os níveis de transcritos de *VTG1* foram mais elevados em aves coletadas em 2021 quando comparadas àquelas amostradas em 2022 (**Figura 9.8-12F**). A intepretação global dessas flutuações temporais será aprofundada por meio de modelos estatísticos multivariados, previstos para o relatório final do segundo ciclo de atividades.

9.8.3 Sula leucogaster

Nas análises estatísticas da expressão proteica de CYP1A em tecido hepático de *S. leucogaster*, apenas o fator sazonalidade apresentou diferença estatisticamente significativa.

Atobás-pardo amostrados no outono apresentaram maiores níveis proteicos de CYP1A em comparação aos indivíduos coletados no verão e no inverno (**Figura 9.8-13**). Diferenças sazonais na expressão de CYP podem estar associadas a alterações metabólicas da espécie, como aquelas relacionadas às diferentes fases do ciclo reprodutivo. O atobá-pardo apresenta ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais do mundo e, apesar de não ser uma espécie migratória, nidifica em diversas Ilhas costeiras e oceânicas do Brasil, desde Santa Catarina até o Arquipélago de São Paulo e São Pedro, incluindo os arquipélagos de Fernando de Noronha, Abrolhos e Atol das Rocas (CUNHA et al., 2012; BRANCO et al., 2013; MANCINI; SERAFINI; BUGOLI, 2016). A reprodução ocorre de maneira contínua e dessincronizada, de modo que em uma mesma colônia podem ser observados praticamente todos os estágios reprodutivos em todos os meses, embora picos reprodutivos sejam observados (MARTINS; DIAS, 2003). A disponibilidade de

PÚBLICA

alimento é um fator preponderante na determinação do período reprodutivo (MARTINS; DIAS, 2003).

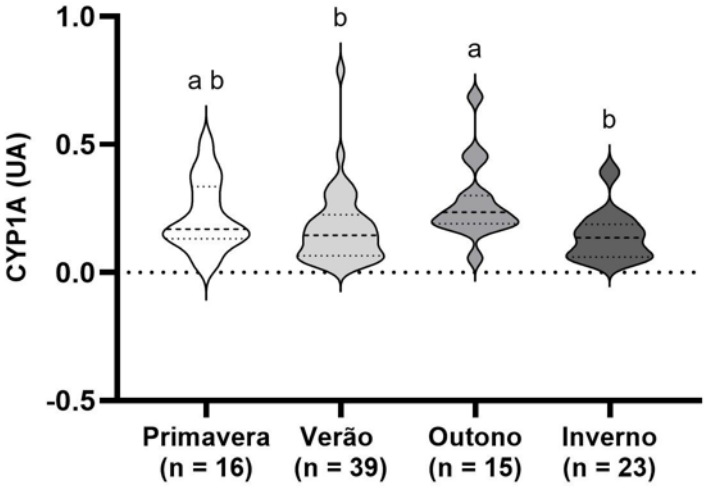


Figura 9.8-13. *Níveis proteicos de CYP1A (UA) em amostras de tecido hepático de Sula leucogaster categorizadas por estação do ano.*

Na Reserva Biológica Marinha do Arvoredo (Florianópolis, SC) foi demonstrado que a maioria dos atobás-pardos realiza a oviposição durante o outono e o inverno (abril a agosto), enquanto na primavera (outubro a dezembro) os filhotes estão nos ninhos, sendo cuidados pelos seus pais, e no verão os filhotes já estão jovens e saindo dos ninhos (VIEIRA; SERAFINI, 2015). Esse padrão pode contribuir para explicar as diferenças sazonais observadas nos níveis proteicos de CYP1A, uma vez que mudanças no estado fisiológico e na demanda metabólica associadas ao período reprodutivo podem influenciar a expressão de biomarcadores. Adicionalmente, alterações sazonais na composição da dieta, bem como no grau de exposição e biodisponibilidade de xenobióticos no ambiente, também podem contribuir para os padrões observados.

Por fim, os níveis de adutos de BPDE-DNA permaneceram abaixo do limite de detecção em todos os espécimes analisados. A ausência de quantificação deste biomarcador sugere que a exposição a HPA com potencial de gerar adutos não atingiu limiares detectáveis no tecido hepático de *S. leucogaster*. Alternativamente, este resultado pode refletir a eficiência dos mecanismos endógenos de

biotransformação e reparo de DNA, que atuaram de forma a manter as concentrações de adutos de BPDE-DNA abaixo da sensibilidade analítica do ensaio empregado.

9.9 CONCLUSÕES

Este capítulo apresenta as atividades de padronização e análise de biomarcadores realizadas no âmbito do PMP-BS entre janeiro e dezembro de 2025. Durante o período, foram recebidas 567 amostras provenientes do PMP-BS.

As atividades de padronização incluíram a otimização do ensaio para quantificação de adutos de BPDE-DNA em *S. leucogaster* e o estabelecimento do *baseline* para definição do limiar de transcrição gênica em *P. puffinus* e *L. dominicanus*.

O sequenciamento, a montagem e a anotação funcional dos transcriptomas hepáticos de *C. caretta*, *C. borealis* e *S. leucogaster* foram concluídos com sucesso, possibilitando o desenho de iniciadores específicos para os genes-alvo *GSTA*, *CYP1A4*, *AhR*, *ESR1*, *UGT1* e *VTG1*.

No período deste relatório, foram realizadas análises de biomarcadores bioquímicos e moleculares em amostras hepáticas de aves marinhas. Foram quantificados os níveis proteicos de CYP1A e de adutos de BPDE-DNA em *S. leucogaster*, bem como as atividades das enzimas EROD e GST e os níveis de transcritos de genes-alvo em *P. puffinus* e *L. dominicanus*. Os dados foram avaliados estatisticamente considerando fatores biológicos, espaciais e temporais.

Em *L. dominicanus*, os resultados indicaram possíveis indícios de desregulação endócrina associada à exposição a DDTs e PCB, evidenciada pela menor atividade GST e por alterações nos níveis de transcritos de *AhR*, *ESR1* e *VTG1*.

O estado nutricional revelou-se um fator de confusão na interpretação dos biomarcadores em *L. dominicanus*, sendo que indivíduos caquéticos apresentaram menor atividade EROD e GST e maiores níveis de transcritos de *UGT1*, possivelmente refletindo respostas adaptativas ao estresse energético.

Também foi observada influência da idade em *L. dominicanus*, com indivíduos adultos exibindo maior atividade EROD e maiores níveis de transcritos de *CYP1A*,

PÚBLICA

ESR1 e *UGT1* em comaração aos juvenis, possivelmente em função a mudanças na dieta e no padrão de deslocamento da espécie.

Em *P. puffinus*, as respostas de biomarcadores variaram conforme a classe de contaminantes bioacumulados. O HCB esteve associado à modulação diferencial das fases I e II de biotransformação, evidenciada por alterações nos níveis de transcritos de *CYP1A5* e na atividade GST, sugerindo potencial diminuição da capacidade de biotransformação desse composto na espécie. Adicionalmente, foi identificada correlação positiva entre PCB e atividade EROD, reforçando a indução enzimática por congêneres *dioxin-like*. Também foi identificada correlação negativa entre os níveis de ΣDDTs e os transcritos de *AhR*, sugerindo possíveis efeitos supressores de DDTs e seus metabólitos sobre vias mediadas por *AhR*.

Adicionalmente, indivíduos oleados de *P. puffinus* apresentaram maior atividade EROD e maiores níveis de transcritos de *CYP1A5* quando comparados aos não oleados, reforçando o potencial desses biomarcadores para o monitoramento de contaminação por HPA.

Foram observadas variações sazonais nos níveis de transcritos de *CYP1A5* em *P. puffinus*, indicando possível influência do ciclo migratório sobre as respostas de biomarcadores na espécie.

Em *S. leucogaster*, a expressão proteica de CYP1A apresentou variação sazonal, possivelmente associada ao ciclo reprodutivo da espécie.

Não foram detectados níveis quantificáveis de adutos de BPDE-DNA em *S. leucogaster*, sugerindo baixa exposição a HPA com potencial genotóxico nas áreas amostradas ou níveis abaixo da capacidade de detecção do método empregado.

Por fim, as variações interanuais e sazonais observadas nas respostas de alguns biomarcadores em aves reforçam a importância da continuidade do monitoramento para a consolidação de séries temporais de longo prazo e o desenvolvimento de modelos estatísticos mais robustos ao final do projeto.

9.10 PRÓXIMAS ETAPAS

As seguintes etapas de padronização de biomarcadores bioquímicos ainda necessitam ser finalizadas:

- a padronização da imunodetecção de CYP1A tecido hepático de *C. caretta* e *Lepidochelys olivacea*.

Para o próximo período de referência, está prevista a conclusão das etapas de sequenciamento, análise dos transcriptomas, bem como s padronização de biomarcadores moleculares em tecido hepático de *L. olivaceae* e *Sotalia guianensis*.

Também está prevista a realização de um teste piloto para avaliação de biomarcadores em tecidos hepático e tegumentar de *Tursiops truncatus* provenientes dos PMPs. Esta etapa dependerá da disponibilidade de amostras oriundas de carcaças coletadas como código 2.

Por fim, será dada continuidade às análises dos seguintes biomarcadores:

- biomarcadores bioquímicos (EROD e GST) para todas as espécies prioritárias;
- quantificação da expressão proteica de CYP1A em *C. mydas*, *C. borealis*, *L. dominicanus*, *P. puffinus* e *S. leucogaster*;
- biomarcadores moleculares em tecido hepático de *C. mydas*, *L. dominicanus* e *P. puffinus*.

9.11 BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, C.R.; HOOPER, M.J.; CACELA, D.; SMELKER, K.D.; CALVIN, C.S.; DEAN, K.M.; BERSIAN, S.J.; CUNNINGHAM, F.L.; HANSON-DORR, K.C.; HORAK, K.E.; et al. CYP1A protein expression and catalytic activity in double-crested cormorants experimentally exposed to Deepwater Horizon Mississippi Canyon 252 oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 146, p. 68-75, 2017.

ANDREWS, S. 2010. FastQC: **a quality control tool for high throughput sequence data**. Disponível online em: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc Acesso em: 14 jul. 2025.

ANNETT, C.; PIEROTTI, R. Chick Hatching as a Trigger for Dietary Switching in the Western Gull. **Colonial Waterbirds**, v. 12, p. 4-11, 1989.

PÚBLICA

BEGER, R.; YU, L.R.; DANIELS, J.; MATTES, W.B. Exploratory biomarkers: Analytical approaches and their implications. **Current Opinion in Toxicology**, v. 4, p. 59-65. 2017.

BEMANIAN, V.; MALE, R.; GOKSØYR, A. **Comparative Hepatology**, v. 3, n. 1, p. 2, 2004.

BERNTSSEN, M.H.G.; MAAGE, A.; LUNDEBYE, A.-K. **Chemical contamination of finfish with organic pollutants and metals**. In: SCHRENK, D.; CARTUS, A. (Ed.). Chemical contaminants and residues in food. Duxford (United Kingdom): Woodhead Publishing, p. 517-550. 2017.

BOECKMANN, B.; BAIROCH, A.; APWEILER, R.; BLATTER, M. C.; ESTREICHER, A.; GASTEIGER, E.; MARTIN, M. J.; MICHOUD, K.; O'DONOVAN, C.; PHAN, I.; PILBOUT, S.; SCHNEIDER, M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 365-370, 2003.

BORNMAN, M.; DELPORT, R.; FARÍAS, P.; ANECK-HAHN, N.; PATRICK, S.; MILLAR, R.P.; DE JAGER, C. Alterations in male reproductive hormones in relation to environmental DDT exposure. **Environment International**, v.113, p. 281-289, 2018.

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

BRANCO, J.O.; FRACASSO, H.A.A.; MORAES-ORNELLAS, V.S.; Reproduction and demographic trends of *Sula Leucogaster* at the Moleques do Sul Archipelago, Santa Catarina, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 13, 2013.

BREWTON, R.A.; FULFORD, R.; GRIFFITT, R.J. Gene expression and growth as indicators of effects of the BP deepwater horizon oil spill on spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**., v. 76, p. 1198-1209, 2013.

BROWN-PETERSON, N.J.; KRASNEC, M.; TAKESHITA, R.; RYAN, C.N.; GRIFFITT, K.J.; LAY, C.; MAYER, G.D.; BAYHA, K.M.; HAWKINS, W.E.; LIPTON, I.; MORRIS,

J.; GRIFFITT, R.J. A multiple endpoint analysis of the effects of chronic exposure to sediment contaminated with deepwater horizon oil on juvenile southern flounder and their associated microbiomes. **Aquatic Toxicology**, v. 165, p. 197-209, 2015.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the total environment**, v. 247, n. 2-3, p. 295-311, 2000.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T.L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 421, 2009.

CORNIUK, R.N. et al. Using plasma vitellogenin in loggerhead sea turtles to assess reproductive maturation and estrogen-like contaminant exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2023.

CROWE, K.M.; NEWTON, J.C.; KALTENBOECK, B.; JOHNSON, C. Oxidative stress responses of gulf killifish exposed to hydrocarbons from the Deepwater Horizon oil spill: potential implications for aquatic food resources. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, p. 370-374, 2014.

CUNHA, L.S.T.; TORRES, J.P.M.; MUÑOZ-ARNANZ, J.; JIMÉNEZ, B. Evaluation of the possible adverse effects of legacy persistent organic pollutants (POPs) on the brown booby (Sula leucogaster) along the Brazilian coast. **Chemosphere**, v. 87, p. 1039-1044, 2012.

DEL HOYO; J., ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. (Eds.) (1992). **Handbook of the Birds of the World**. vol. 1. Lynx Edicions, Barcelona.

DEN BESTEN, P.J. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 253-256, 1998.

DUBANSKY, B.; WHITEHEAD, A.; MILLER, J.T.; RICE, C.D.; GALVEZ, F. Multitissue molecular, genomic, and developmental effects of the deepwater horizon oil spill on resident gulf killifish (*Fundulus grandis*). **Environmental Science & Technology**, v. 47, p. 5074-5082, 2013.

DUVALDESTIN, P.; MAHU, J.-L.; BERTHELOT, P. Effect of fasting on substrate specificity of rat liver UDP-glucuronosyltransferase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 384, n. 1, p. 81–86, mar. 1975.

EBERT, L.A.; BRANCO, J.O. Variação sazonal na abundância de *Larus dominicanus* (Aves, Laridae) no Saco da Fazenda, Itajaí, Santa Catarina. **Iheringia - Série Zoologia**, v. 99, p. 437-441, 2009.

EZENDAM, J.; STAEDTLER, F.; PENNINGS, J.; VANDEBRIEL, R.J.; PIETERS, R.; HARLEMAN, J.; VOS, J.G. Toxicogenomics of subchronic hexachlorobenzene exposure in Brown Norway rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, p. 782-791, 2004.

FOSSI, C.; LEONZIO, C.; FOCARDI, S. Seasonal variation of mixed-function oxidase activity in a population of Yellow-legged Herring gull: relationship to sexual cycle and pollutants. **Marine Environmental Research**, v. 28, p. 35-39, 1989.

GUGLIELMO, C.G. Move that fatty acid: fuel selection and transport in migratory birds and bats. **Integrative and Comparative Biology**, v. 50, n. 3, p. 336-345, 2010.

HAHN, M.E.; GOLDSTEIN, J.A.; LINKO, P.; GASIEWICZ, A. Interaction of hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vitro and in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 270, p. 344-355, 1989.

HELGASON, L.B. et al. Biotransformation of PCB in Arctic seabirds: Characterization of phase I and II pathways at transcriptional, translational and activity levels. **Comparative biochemistry and physiology Part C**, v. 152, n. 1, p. 34-41, 2010.

HOFFMANN, F.; KLOAS, W. p,p′-Dichlordiphenyldichloroethylene (p,p′-DDE) can elicit antiandrogenic and estrogenic modes of action in the amphibian *Xenopus laevis*. **Physiology and Behavior**, v.167, p. 172-178, 2016.

HUGGETT, D.B.; BROOKS, B.W.; PETERSON, B.; FORAN, C.M.; SCHLENK D. Toxicity of selected beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, p. 229-235, 2002.

JEONG, H.G.; KIM, J.Y. Effects of o,p′-DDT on the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible CYP1A1 expression in murine Hepa-1c1c7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 11, p. 1685-1692, 2002.

JÖNSSON, M.E.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J.; BRUNSTRÖM, B. Cytochrome p450 1 genes in birds: evolutionary relationships and transcription profiles in chicken and Japanese quail embryos. **PLoS One**, v. 6, p. e28257, 2011.

KALININA, T.S.; KONONCHUK, V.V.; GULYAEVA, L.F. Expression of hormonal carcinogenesis genes and regulatory microRNAs in uterus and ovaries of DDT-treated female rats. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, p. 1118-1128, 2017.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KING, M.D.; ELLIOTT, J.E.; WILLIAMS, T.D. Effects of petroleum exposure on birds: a review. **Science of the Total Environment**, v. 755, p. 142834-142865, 2021.

KREILING, J.A.; CRETON, R.; REINISCH, C. Early embryonic exposure to polychlorinated biphenyls disrupts heat-shock protein 70 cognate expression in zebrafish. **Journal of toxicology and environmental health part A**, v. 70, p. 1005-1013, 2007.

KUBOTA, A.; IWATA, H.; GOLDSTONE, H.M.; KIM, E.Y.; STEGEMAN, J.J.; TANABE, S. Cytochrome P450 1A4 and 1A5 in common cormorant (*Phalacrocorax carbo*): evolutionary relationships and functional implications associated with dioxin and related compounds. **Toxicological Sciences**, v. 92, p. 394-408, 2006.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003.

LEAT, E.; BOURGEON, S.; MAGNUSDOTTIR, E.; GABRIELSEN, G.; GRECIAN, W.; HANSSEN, S.; BORGÅ K. Influence of wintering area on persistent organic pollutants in a breeding migratory seabird. **Marine Ecology Progress Series**, v. 491, p. 277-293, 2013.

LEMAIRE, G.; MNIF, W.; MAUVAIS, P.; BALAGUER, P.; RAHMANI, R. Activation of α- and β-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. **Life Sciences**, v. 79, p. 1160-1169, 2006.

LIVINGSTONE, D.R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 195-211, 1993.

LU, W.; ZHOU, Q.; CHEN, Y. Impact of RNA degradation on next-generation sequencing transcriptome data. **Genomics**, v. 114, n. 4, p. 110429, 2022.

LUDYNIA, K.; GARTHE, S.; LUNA-JORQUERA, G. Seasonal and regional variation in the diet of the Kelp Gull in northern Chile. **Waterbirds**, v. 28, p. 359-365, 2005.

MADAK-ERDOGAN, Z.; KATZENELLENBOGEN, B.S. Aryl Hydrocarbon Receptor Modulation of Estrogen Receptor α-Mediated Gene Regulation by a Multimeric Chromatin Complex Involving the Two Receptors and the Coregulator RIP140. **Toxicological Sciences**, v. 125, p. 401-411, 2012.

MANCINI, P.L.; SERAFINI, P.P.; BUGOLI, L. Breeding seabird populations in Brazilian oceanic islands: historical review, update and a call for census standardization. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 24, p. 94-115, 2016.

MARTINS, F.C.; DIAS, M.M. Cuidado parental de *Sula leucogaster* (Boddaert) (Aves, Pelecaniformes, Sulidae) nas Ilhas dos Currais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, p. 583-589, 2003.

McCUE, M.D. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 156, p. 1-18, 2010.

MONTEIRO, M.S.; PAVLAKI, M.; FAUSTINO, A.; RÊMA, A.; FRANCHI, M.; GEDIEL, L.; LOUREIRO, S.; DOMINGUES, I.; RENDÓN VON OSTEN, J.; MORTÁGUA VELHO MAIA SOARES, A. Endocrine disruption effects of p,p'-DDE on juvenile zebrafish. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 253-260, 2015.

NOVELLI, R. **Aves marinhas costeiras do Brasil (Identificação e Biologia)**. Cinco Continente Editora Ltda: Porto Alegre, RS. 1997. 91 p.

RAJA-AHO, S.; KANERVA, M.; EEVA, T.; LEHIKOINEN, E.; SUORSA, P.; GAO, K.; VOSLOO, D.; NIKINMAA, M. Seasonal variation in the regulation of redox state and some biotransformation enzyme activities in the barn swallow (*Hirundo rustica* L.). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 85, p. 148-158, 2012.

RENNER, G. Biotransformation of the fungicides hexachlorobenzene and pentachloronitrobenzene. **Xenobiotica**, v. 11, p. 435-446, 1981.

RENNER, G.; NGUYEN, P.T. Mechanisms of the reductive denitration of pentachloronitrobenzene (PCNB) and the reductive dechlorination of hexachlorobenzene (HCB). **Xenobiotica**, v. 14, p. 705-710, 1984.

RODRÍGUEZ, P.; TORTOSA, F.S.; VILLAFUERTE, R. The effects of fasting and refeeding on biochemical parameters in the red-legged partridge (*Alectoris rufa*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 140, p. 157-164, 2005.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T.

The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, v. 7, n. 1, 2006.

SERAFINI, P.P. et al. Biochemical and molecular biomarkers and their association with anthropogenic chemicals in wintering Manx shearwaters (*Puffinus puffinus*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 203, p. 116398, 2024.

SZAEFER, H.; LICZNERSKA, B.; BAER-DUBOWSKA, W. The Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Crosstalk: A Chemopreventive Target of Naturally Occurring and Modified Phytochemicals. **Molecules**, v. 29, p. 4283, 2024.

THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2018. Application Note: Qubit RNA IQ Assay: a fast and easy fluorometric RNA quality assessment. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Application-Notes/qubit-rna-iq-assay-fluorometric-rna-quality-assessment-app-note.pdf. Acesso em 24 de junho de 2019.

THOMPSON, L.A.; IKENAKA, Y.; SOBHY DARWISH, W.; NAKAYAMA, S.M.M.; MIZUKAWA, H.; ISHIZUKA, M. Effects of the organochlorine p,p'-DDT on MCF-7 cells: Investigating metabolic and immune modulatory transcriptomic changes. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 72, p.103249, 2019.

TIAN, J. et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Key Bridging Molecule of External and Internal Chemical Signals. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 16, p. 9518-9531, 2015.

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

VARANASI, U. **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment**. Boca Raton: Crc Press, 1989. 352 p.

VIEIRA, B.P.; SERAFINI, P.P. Guidelines for Managing and Monitoring Seabirds in the Arvoredo Marine Biological Reserve, Southern Brazil. **Monitoramento da conservação da biodiversidade**, v. 6, p. 174-189, 2015.

VIJAYAN, M.; ALURU, N.; MAULE, A.; JØRGENSEN, E. Fasting augments PCB impact on liver metabolism in anadromous Arctic char. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 431-9, 2006.

WALKER, C.H. Biochemical biomarkers in ecotoxicology – some recent developments. **Science of the Total Environment**, v. 171, p. 189-195. 1995.

WHITEHEAD, A.; DUBANSKY, B.; BODINIER, C.; GARCIA, T.I.; MILES, S.; PILLEY, C.; RAGHUNATHAN, V.; ROACH, J.L.; WALKER, N.; WALTER, R.B.; RICE, C.D.; GALVEZ, F. Genomic and physiological footprint of the deepwater horizon oil spill on resident marsh fishes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 20298-20302, 2012.

WHO, UNEP. State of the science of endocrine disrupting chemicals. **World Health Organization**, 2012.

WIECZOREK, D.; DELAURIERE, L.; SCHAGAT, T. **Methods of RNA Quality**

Assessment. 2012. <https://www.promega.com.br/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment/>. Acesso em: 08 dez. 2017.

WÓJTOWICZ, A.K.; HONKISZ, E.; ZIĘBA-PRZYBYLSKA, D.; MILEWICZ, T.; KAJTA, M. Effects of two isomers of DDT and their metabolite DDE on CYP1A1 and AhR function in human placental cells. **Pharmacological Reports**, v. 63, p. 1460-1468, 2011.

XU, L.C.; SUN, H.; CHEN, J.-F.; BIAN, Q.; SONG, L.; WANG, X.-R. Androgen receptor activities of p,p'-DDE, fenvalerate and phoxim detected by androgen receptor reporter gene assay. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 151-157, 2006.

XU, J. et al. UDP-Glucuronosyltransferase Expression in Mouse Liver Is Increased in Obesity- and Fasting-Induced Steatosis. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, n. 2, p. 259-266, 2012.

XU, E.G.; MAGER, E.M.; GROSELL, M.; PASPARAKIS, C.; SCHLENKER, L.S.; STIEGLITZ, J.D.; BENETTIE, D.; HAZARD E.S.; COURTNEY, S.M.; DIAMANTE, G.; FREITAS, J.; HARDIMAN, G.; SCHLENK, D. Time- and oil-dependent transcriptomic and physiological responses to deepwater horizon oil in Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) embryos and larvae. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 7842-7851, 2016.

YOSHINOUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; LEE, J.S.; HIRANO, M.; SUZUKI, K.T.; KIM, E.Y.; IWATA, H. In vitro assessment of effects of persistent organic pollutants on the transactivation of estrogen receptor α and β (*ERα* and *ERβ*) from the Baikal seal (*Pusa sibirica*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, p. 463-471, 2019.

10 AÇÕES DE COMUNICAÇÃO

10.1 EDUCAÇÃO AMBIENTAL

As ações de Educação Ambiental desenvolvidas no âmbito do Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) ao longo de 2025 consolidaram a educação ambiental e a cultura oceânica como importantes ferramentas de aproximação entre ciência, sociedade e conservação marinha nas Áreas SC/PR, SP e RJ. Somadas, as instituições executoras realizaram 820 ações de educação ambiental ao longo do litoral brasileiro, alcançando diretamente mais de 60 mil pessoas por meio de palestras, oficinas, exposições itinerantes, campanhas educativas, visitas monitoradas, mutirões ambientais, ações em escolas, eventos públicos e atividades de sensibilização em praias e espaços de grande circulação.

De forma integrada, as ações envolveram estudantes, professores, pescadores, trabalhadores portuários, turistas, comunidades tradicionais, gestores públicos e comunidade em geral, utilizando metodologias participativas e acessíveis para discutir temas relacionados à biodiversidade marinha, lixo no ambiente costeiro, impactos antrópicos, pesca incidental, conservação da fauna marinha e cultura oceânica. A utilização de materiais biológicos, coleções osteológicas, exemplares taxidermizados, experiências sensoriais e conteúdos audiovisuais fortaleceu a interação das atividades e ampliou o engajamento do público nas três áreas de atuação do projeto.

Na Área SC/PR, as instituições executoras realizaram 299 ações educativas, impactando aproximadamente 25 mil pessoas ao longo do litoral catarinense e paranaense. As atividades destacaram-se pela forte integração entre cultura oceânica, participação comunitária e valorização das identidades costeiras locais. Entre os principais destaques estiveram as visitas guiadas às unidades de estabilização e reabilitação de fauna marinha, ações em escolas, campanhas educativas em praias, participação em eventos públicos e projetos continuados de sensibilização ambiental. As equipes também investiram em estratégias voltadas à aproximação entre sociedade e rotinas técnicas do PMP-BS, utilizando atividades

relacionadas ao monitoramento, resgate e reabilitação de fauna como ferramentas educativas capazes de ampliar a conscientização ambiental e fortalecer o vínculo das comunidades com a conservação marinha.

Na Área SP, as instituições executoras promoveram 206 atividades educativas, alcançando diretamente mais de 25 mil pessoas em municípios do litoral paulista. As ações evidenciaram ampla capilaridade territorial e forte integração entre educação ambiental, comunicação científica e conservação marinha. As atividades envolveram escolas, universidades, praias, feiras ambientais e eventos científicos, utilizando espécies emblemáticas da fauna marinha, como tartarugas-marinhas, toninhas, golfinhos e baleias, como ferramentas de sensibilização e conexão emocional com o público. Outro aspecto relevante foi o investimento em ações voltadas à formação de multiplicadores, incluindo capacitações e atividades continuadas com professores, gestores públicos e profissionais ligados à gestão costeira.

Já na Área RJ, foram registradas 315 atividades educativas, alcançando diretamente mais de 13 mil pessoas em municípios do litoral fluminense. As ações destacaram-se pela ampla inserção territorial, forte presença em eventos públicos e democratização do acesso ao conhecimento científico relacionado à conservação marinha. As equipes desenvolveram atividades em escolas, praias, universidades e espaços comunitários, promovendo reflexões sobre descarte inadequado de resíduos, impactos das atividades humanas nos ecossistemas costeiros e importância do monitoramento contínuo da fauna marinha. Também tiveram destaque as ações voltadas à aproximação entre ciência e sociedade, utilizando as rotinas de pesquisa, monitoramento e reabilitação como ferramentas de comunicação e sensibilização ambiental.

Outro aspecto comum observado nas três áreas foi a crescente integração entre educação ambiental, divulgação científica e participação comunitária. As instituições executoras investiram em estratégias acessíveis e territorializadas, utilizando a fauna marinha como elemento de conexão emocional capaz de despertar interesse, sensibilização e engajamento social. Espécies como baleias, toninhas, tartarugas-marinhas, pinguins, golfinhos e lobos-marinhos desempenharam importante papel na construção das narrativas educativas desenvolvidas ao longo do período.

PÚBLICA

A forte presença das equipes em eventos ambientais, culturais e comunitários também contribuiu para ampliar significativamente o alcance das mensagens relacionadas à conservação marinha e fortalecer a visibilidade institucional do PMP-BS junto às populações costeiras. As atividades desenvolvidas nas áreas SC/PR, SP e RJ evidenciaram o potencial da educação ambiental como ferramenta estratégica para promoção da cultura oceânica, fortalecimento da participação social e disseminação de informações científicas acessíveis sobre conservação da biodiversidade marinha.

De maneira geral, as ações de Educação Ambiental realizadas no âmbito do PMP-BS em 2025 demonstraram elevada capacidade de mobilização social, fortalecimento institucional e aproximação entre ciência e sociedade. A atuação integrada das instituições executoras, associada à diversidade metodológica empregada e à forte presença territorial das atividades, contribuiu para consolidar o projeto como importante referência nacional em sensibilização ambiental costeiro-marinha e comunicação pública da ciência. O detalhamento das ações realizadas está disponível no ***Apêndice 09 – Ações de Educação Ambiental***.

Tabela 10.1-1 *– Quantidade de pessoas atingidas pelas ações de divulgação e educação ambiental desenvolvidas pelo PMP-BS no período de 01/01/2025 a 31/12/2025.*

Instituição	Quantidade de participantes		Total
	Com lista de presença	Sem lista de presença (estimado)	
Área SC/PR			
Trecho 1	0	2313	2313
Trecho 2	2270	5370	5370
Trecho 3	0	1099	1099
Trecho 4	0	4516	4516
Trecho 5	0	4029	4029
Trecho 6	2308	7767	7767
	4578	**20516**	**25094**
Área SP			
Trecho 7	141	3450	3591
Trecho 8	5922	19	5941
Trecho 9	684	1720	2404
Trecho 10	1116	12865	13981
	7863	**18054**	**25917**
Área RJ			
Trecho 11	0	1436	1436
Trecho 12	0	3298	3298

Instituição	Quantidade de participantes		Total
	Com lista de presença	Sem lista de presença (estimado)	
Trecho 13	0	2640	2640
Trecho 14	0	3389	3389
Trecho 15	0	2784	2784
	0	**13547**	**13547**

10.2 DIVULGAÇÃO

As ações de Comunicação Digital e Assessoria de Imprensa desenvolvidas no âmbito do Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) em 2025 consolidaram a comunicação como ferramenta estratégica para sensibilização ambiental, fortalecimento institucional e aproximação entre sociedade e conservação marinha nas áreas SC/PR, SP e RJ. Ao longo do período, as instituições executoras investiram fortemente em produção de conteúdo digital, campanhas educativas, relacionamento com veículos de imprensa e divulgação científica acessível, ampliando significativamente o alcance das informações relacionadas à fauna marinha e aos impactos ambientais nos ecossistemas costeiros.

As redes sociais mantiveram-se como principal canal de comunicação com o público nas três áreas de atuação, com forte utilização de reels, vídeos curtos, carrosséis informativos, stories e conteúdos audiovisuais voltados à divulgação de resgates, reabilitações, solturas, monitoramento de fauna e campanhas educativas. O uso de linguagem acessível, associado ao rigor técnico das informações divulgadas, possibilitou transformar conteúdos científicos em narrativas educativas de amplo alcance e elevado potencial de engajamento.

Na Área SC/PR, as ações de comunicação destacaram-se pelo forte investimento em narrativas audiovisuais e conteúdos emocionalmente conectivos relacionados à fauna marinha. Diversas publicações alcançaram dezenas e até centenas de milhares de visualizações, especialmente conteúdos relacionados a resgates, reabilitações e solturas de animais marinhos. Também houve forte repercussão de conteúdos relacionados a grandes cetáceos, toninhas, pinguins e lobos-marinhos, além de ampla inserção das equipes em veículos de comunicação regionais e nacionais. Outro destaque da área foi a integração entre redes sociais,

campanhas educativas e ações presenciais de sensibilização ambiental, fortalecendo a identidade institucional do PMP-BS junto às comunidades costeiras de Santa Catarina e Paraná.

Na Área SP, as instituições executoras registraram centenas de milhares de visualizações e interações nas redes sociais ao longo de 2025, demonstrando elevado interesse público por conteúdos relacionados à biodiversidade marinha e conservação costeira. As ações de comunicação tiveram forte integração com atividades de educação ambiental e divulgação científica, utilizando conteúdos relacionados a resgates, reabilitações, solturas e monitoramento de fauna como ferramentas de sensibilização ambiental. As publicações envolvendo baleias, tartarugas-marinhas, toninhas, pinguins e lobos-marinhos estiveram entre as de maior repercussão digital. Além disso, as equipes mantiveram forte presença em veículos de imprensa locais, regionais e nacionais, ampliando significativamente a visibilidade institucional do PMP-BS no litoral paulista.

Já na Área RJ, as ações de comunicação digital destacaram-se pela ampla presença nas redes sociais e forte repercussão de conteúdos relacionados à fauna marinha. Entre os principais resultados observados estiveram publicações que alcançaram dezenas de milhares de pessoas, como o conteúdo sobre o resgate do lobo-marinho-de-peito-branco e o reels do lobo-marinho “Joca”. As ações de assessoria de imprensa também tiveram importante papel na ampliação da visibilidade institucional do projeto, com ampla repercussão de pautas relacionadas a encalhes de grandes cetáceos, resgates de fauna marinha, solturas e impactos do lixo no ambiente costeiro em jornais, rádios, portais de notícias e emissoras de televisão.

Outro aspecto comum observado nas três áreas foi a crescente integração entre comunicação digital, educação ambiental e divulgação científica. As instituições executoras utilizaram as redes sociais não apenas para divulgar ocorrências envolvendo fauna marinha, mas também para apresentar bastidores das atividades técnicas desenvolvidas pelo PMP-BS, incluindo monitoramento, pesquisa, necropsia, atendimento veterinário e reabilitação de animais. Essa estratégia contribuiu para ampliar a transparência institucional, aproximar a sociedade das rotinas científicas do projeto e fortalecer o reconhecimento público sobre a importância da conservação marinha.

A realização de campanhas colaborativas, publicações integradas e compartilhamento de conteúdos entre equipes das diferentes áreas também fortaleceu a identidade institucional do PMP-BS e ampliou o alcance regional das informações divulgadas. As ações desenvolvidas ao longo de 2025 evidenciaram o potencial da comunicação digital e da assessoria de imprensa como ferramentas estratégicas para disseminação da cultura oceânica, sensibilização ambiental e fortalecimento da conexão entre ciência, sociedade e conservação marinha.

De maneira geral, as ações de Comunicação Digital e Assessoria de Imprensa realizadas no âmbito do PMP-BS em 2025 demonstraram elevado potencial de mobilização social e fortalecimento institucional. A atuação integrada das instituições executoras, associada ao uso estratégico de conteúdos audiovisuais, narrativas emocionais e divulgação científica acessível, contribuiu para ampliar significativamente o alcance das informações relacionadas à conservação da fauna marinha e consolidar o projeto como importante referência nacional em comunicação pública da ciência aplicada aos ecossistemas costeiros.

Tabela 10.2-1 *– Quantidade de reações em redes sociais relacionadas a publicações feitas pelas instituições do PMP-BS no período de 01/01/2025 a 31/12/2025.*

Instituição	Nº de Postagens	Curtidas	Compartilhamentos	Visualizações
Área SC/PR				
Trecho 1	70	23.725	5.843	495.479
Trecho 2	163	30.517	4.113	573.563
Trecho 3	346	156.459	23.263	2.236.335
Trecho 4	271	27.377	4.344	550.425
Trecho 5	649	36.728	6.056	591.711
Trecho 6	147	18.879	2.830	472.898
Total	**1.646**	**293.685**	**46.449**	**4.920.411**
Área SP				
Trecho 7	118	19.578	3.872	489.010
Trecho 8	143	15.849	1.427	510.104
Trecho 9	68	33.270	3.433	709.660
Trecho 10	65	9.334	1.169	232.556
Total	**394**	**78.031**	**9.901**	**1.941.330**
Área RJ				
Trechos 11 a 15	441	33.710	27.725	902.632
Total	**441**	**33.710**	**27.725**	**902.632**
Total Geral	**2.481**	**405.426**	**84.075**	**7.764.373**

10.3 DIVULGAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

Durante o período de janeiro a dezembro de 2025 as instituições responsáveis pelo PMP-BS encaminharam diversos pedidos para utilização de dados gerados no âmbito do PMP-BS para serem utilizados em trabalhos acadêmico-científicos. As informações de cada área serão apresentadas abaixo.

Santa Catarina e Paraná

No período de referência deste relatório as instituições vinculadas ao PMP-BS Área SC/PR, finalizaram 11 trabalhos científicos, que estão listados na **Tabela 10.3-1.**

***Tabela 10.3-1** – Trabalhos acadêmico-científicos finalizados pelas instituições do PMP-BS Área SC/PR, no período de 01/01/2025 a 31/12/2025.*

Título	Tipo	Local de publicação	Data de Publicação	Status
Oceanographic and climatic processes as predictors of Chelonia mydas strandings	Artigo Científico	Regional Studies in Marine Science	jan/25	Finalizado
Primeiro Registro de Nascimento de Elefante-Marinho-do-Sul (Mirounga leonina) no Brasil.	Resumo Congresso	IX Encopemaq - Encontro Nacional sobre Conservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos.	jun/25	Finalizado
Development of a health index for stranded marine tetrapods	Artigo Científico	PLOS One	mar/25	Finalizado
Seabird strandings on the Brazilian coast: What influences spatial and temporal patterns?	Artigo Científico	PLOS One	abr/25	Finalizado
Registros de encalhes de baleia-jubarte (Megaptera novaeangliae) realizados pelo Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) nos anos de 2019 a 2024 nos Estados do Paraná e Santa Catarina, litoral Sul do Brasil.	Resumo Congresso	IX Encopemaq - Encontro Nacional sobre Conservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos.	jun/25	Finalizado
Resgate, estabilização e soltura de uma toninha (Pontoporia blainvillei): um caso de sucesso no litoral norte de Santa Catarina	Resumo Congresso	IX Encopemaq - Encontro Nacional sobre Conservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos	jun/25	Finalizado

Título	Tipo	Local de publicação	Data de Publicação	Status
Investigação do Impacto das prospecções sísmicas em encalhes de cetáceos ao Largo da Costa Sudeste e Sul do Brasil	Resumo Congresso	IX Encopemaq - Encontro Nacional sobre Conservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos	jun/25	Finalizado
Captura Acidental como Fator de Seleção em Cetáceos: Uma Investigação do Comprimento de Espécimes na Bacia de Santos (2015-2024)	Resumo Congresso	IX Encopemaq - Encontro Nacional sobre Conservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos	jun/25	Finalizado
Tamanho de Maturação Sexual de Pontoporia blainvillei encalhadas no Litoral Centro-Norte de Santa Catarina (2016-2024)	Resumo Congresso	IX Encopemaq - Encontro Nacional sobre Conservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos	jun/25	Finalizado
10 anos de PMP-BS: riqueza e diversidade de mamíferos marinhos ao longo da costa Sudeste/Sul do Brasil	Resumo Congresso	IX Encopemaq - Encontro Nacional sobre Conservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos	jun/25	Finalizado
Descamação epidérmica em filhote de Toninha (Pontoporia blainvillei (Gervais & d'Orbigny) (Cetacea, Pontoporiidae))	Resumo Congresso	IX Encopemaq - Encontro Nacional sobre Conservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos	jun/25	Finalizado

São Paulo

No período de referência deste relatório as instituições vinculadas ao PMP-BS Área SP finalizaram seis trabalhos científicos que estão listados na **Tabela 10.3-2**.

***Tabela 10.3-2** – Trabalhos científicos finalizados pelas instituições do PMP-BS Área SP, no período de 01/01/2025 a 31/12/2025.*

Título	Tipo	Local de publicação	Data de publicação	Status
Animales marinos rescatados en las playas de San Pablo, el desafío de la TN (terapia Neural) sin Historia de Vida conocimiento" PISAC- Valle Sagrado-Cusco-Perú	Resumo Congresso	VI Encuentro latino americano de terapia neural: "100 años desde el amor y el	mar/25	Finalizado
Primeira etapa da reabilitação de tartaruga-cabeçuda (Caretta caretta) após interação com embarcação: relato de caso	Resumo Congresso	VI Congresso de Biologia da UEL	mai/25	Finalizado
Herpesvirus Diversity in Atlantic Procellariiformes	Artigo	Veterinary Sciences	nov/25	Finalizado

Título	Tipo	Local de publicação	Data de publicação	Status
Revisão da circulação fetal e alterações cardíacas em cetáceos costeiros no litoral sul e sudeste do Brasil	Resumo	VII Conferência Bienal WDA Latinoamérica em Belo Horizonte MG	set/25	Finalizado
Identification of ESBL-producing enterobactéria in stranded sea turtless on the Northern São Paulo, Brazil	Resumo	ABRAVAS	out/25	Finalizado
Recaptura de tartarugas marinhas como validador do sucesso de reabilitação	Resumo	ABRAVAS	out/25	Finalizado

Rio de Janeiro

No período de referência deste relatório as instituições vinculadas ao PMP-BS Área RJ finalizaram três trabalhos científicos que estão listados na **Tabela 10.3-3**.

***Tabela 10.3-3** - Trabalhos científicos finalizados pelas instituições do PMP-BS Área RJ, no período de 01/01/2025 a 31/12/2025.*

Título	Tipo	Local de publicação	Data de publicação	Status
Multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae ST70 harboring blaNDM in a migratory Penguin	Artigo	Revista Nature	jul/25	Finalizado
Perfil Clínico de Spheniscus magellanicus que vieram a óbiti até 24 horas após resgate	Resumo Congresso	ABRAVAS 2025	ago/25	Finalizado
Pesquisa e caracterização de bactérias de importância médica veterinária em tetrápodes marinhos encalhados na costa do estado do Rio de Janeiro	Dissertação	UFF - Universidade Federal Fluminense	set/25	Finalizado

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) manteve em 2025 a sua expressiva e contínua rotina de monitoramento ao longo da faixa litorânea que abrange os estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro. A estratégia que combina o monitoramento ativo terrestre executado com frequências diárias e semanais, o monitoramento embarcado e o atendimento aos acionamentos efetuados pela comunidade provou ser fundamental para assegurar uma cobertura espacial ampla e uma resposta ágil no resgate e manejo da fauna marinha.

Os dados consolidados ao longo do ano reforçam a forte influência da sazonalidade oceanográfica e climática sobre a dinâmica e o encalhe de tetrápodes marinhos. Espécies migratórias e oceânicas continuam a apresentar picos acentuados de encalhes em períodos específicos, notadamente durante os meses de inverno e primavera. Esses achados destacam a importância da manutenção da série histórica do projeto para a interpretação de variações populacionais e biogeográficas ao longo do tempo.

No âmbito dos exames de necropsia e diagnósticos de causa mortis, as interações antropogênicas se destacam como uma das principais fontes de impacto à fauna. A atividade pesqueira desponta como a principal causa de mortalidade de origem humana, sendo comprovada por evidências frequentes de enredamento em petrechos de pesca, traumatismos e afogamento decorrente de captura acidental (*bycatch*). Somado a isso, a ingestão de resíduos sólidos (especialmente plásticos) permanece como um fator severo e recorrente de debilidade e morte deste grupo.

O acompanhamento de eventuais incidentes de contaminação por óleo e a realização de análises de *fingerprint* químico em animais e resíduos oleosos continuam fornecendo dados indispensáveis para monitorar, identificar correlações diretas com as atividades de Exploração e Produção (E&P) de petróleo e gás desenvolvidas na Bacia de Santos.

O PMP-BS se consolida como uma das maiores e mais relevantes iniciativas de monitoramento e conservação da biodiversidade marinha do mundo. Seus

resultados contínuos cumprem com rigor as condicionantes do licenciamento ambiental e geram um acervo científico para conservação e gestão costeira.

PÚBLICA

EQUIPE TÉCNICA

COORDENAÇÃO GERAL

Profissional	André Silva Barreto
Empresa/Instituição	UNIVALI
Registro no conselho de Classe	21.500/03-D
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	358880
Função	Coordenação Geral do PMP-BS Área SC/PR
Responsável pela(s) Seção(ões)	1 – 11
Assinatura	Andre Silva Barreto:01203974710 UNIVALI Andre Silva Barreto:01203974710 I am approving this document 2026.10.29 16:45:05-03'00'



Ministério do Meio Ambiente
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

CADASTROS TÉCNICOS FEDERAIS
CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR

IBAMA MMA

Registro n.º: 358880 Data da consulta: 22/09/2026 CR emitido em: 22/09/2026 CR válido até: 22/12/2026

Dados básicos

CPF: XXX.039.747-XX

Nome: ANDRÉ SILVA BARRETO

Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental - CTF/AIDA

Código CBO	Ocupação	Área de Atividade
2211-05	Biólogo	Estudar seres vivos
2211-05	Biólogo	Inventariar biodiversidade
2211-05	Biólogo	Realizar consultoria e assessoria na área biológica e ambiental

Conforme dados disponíveis na presente data, a pessoa física acima possui Certificado de Regularidade, em conformidade com as obrigações cadastrais do CTF/AIDA.

A inscrição no CTF/AIDA constitui declaração, pela pessoa física, do cumprimento de exigências específicas de qualificação ou de limites de atuação que porventura sejam determinados pelo respectivo Conselho de Fiscalização Profissional.

O Certificado de Regularidade emitido pelo CTF/AIDA não desobriga a pessoa inscrita de obter licenças, autorizações, permissões, concessões, alvarás e demais documentos exigíveis por instituições federais, estaduais, distritais ou municipais para o exercício de suas atividades, especialmente os documentos de responsabilidade técnica, qualquer o tipo e conforme regulamentação do respectivo Conselho de Fiscalização Profissional, quando exigíveis.

O Certificado de Regularidade no CTF/AIDA não produz qualquer efeito quanto à qualificação e à habilitação técnica da pessoa física inscrita.

Fechar

Este site é protegido por reCAPTCHA Enterprise e sua Política de Privacidade e Termos de Serviço do Google se aplicam.

COORDENAÇÕES TEMÁTICAS

PUC-Rio (HPA e organohalogenados)

Profissional	Renato da Silva Carreira
Empresa/Instituição	PUC-Rio
Registro no conselho de Classe	Não se aplica
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	236563
Função	Coordenador (HPA e Organohalogenados)
Assinatura	

PUC-Rio (Elementos Traço)

Profissional	José Marcus de Oliveira Godoy
Empresa/Instituição	PUC-Rio
Registro no conselho de Classe	03211017, CRQ 3ª região
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	4955033
Função	Coordenador (Elementos Traço)
Assinatura	

UFSC (Biomarcadores)

Profissional	Afonso Celso Dias Bainy
Empresa/Instituição	UFSC
Registro no Conselho de Classe	Não se aplica
Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental	Não se aplica
Função	Coordenador (Biomarcadores)
Assinatura	

Petrobras (Atividades de exploração e produção de petróleo - E&P)

Profissional	Thiago Otto Corrêa Alves
Empresa/Instituição	Petrobras
Registro no conselho de Classe	CREA-SP 126477
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	6791016
Assinatura	

APÊNDICES

APÊNDICE 01 – OCORRÊNCIAS DE FAUNA ALVO

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 02 – HISTÓRICOS CLÍNICOS

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 03 – NECROPSIAS

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 04 – MODELOS LINEARES GENERALIZADOS

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 05 – ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 06 – HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E ORGANOHALOGENADOS

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 07 – ELEMENTOS TRAÇO

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 08 – BIOMARCADORES

(disponível em formato eletrônico)

PÚBLICA

APÊNDICE 09 – AÇÕES DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 10 – COORDENADAS

(disponível em formato eletrônico)

PÚBLICA