

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

***Relatório Técnico Anual Integrado
(2023) - Volume 3***

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

Janeiro/2025

Relatório Técnico Anual Integrado – 01/01/2023 a 31/12/2023

*Volume 3: Biomarcadores, Análises
de fingerprint, Resíduos Sólidos,
Ações de Comunicação e Seções
Finais*

*Relatório Técnico
Revisão 00
Janeiro/2025*

[illegible]

	Original	Rev.01	Rev.02	Rev.03	Rev.04	Rev.05	Rev.06	Rev.07	Rev.08
Data	08/01/2025								
Elaboração	UNIVALI/ Petrobras								
Verificação									
Aprovação									

SUMÁRIO

CONTROLE DE REVISÕES	3
SUMÁRIO.....	4
TABELAS	6
FIGURAS	9
APRESENTAÇÃO	14
8 BIOMARCADORES	16
8.1 Introdução.....	16
8.2 Recebimento e guarda de amostras.....	19
Distribuição espacial das amostras recebidas	21
8.3 Padronizações de biomarcadores bioquímicos	25
Padronização do método para ensaio de atividade glutatona s-transferase em amostras hepáticas de tetrápodes marinhos	26
Padronização do ensaio para quantificação da atividade etoxiresorufina o-deetilase em tecido hepático de tetrápodes marinhos	38
Padronização do ensaio para imunodeteção de cyp1a em tecido hepático de tetrápodes marinhos	48
8.4 Padronização da análise de biomarcadores moleculares	61
Desenho e teste de iniciadores para vitelogenina (VTG) e glutatona s-transferase alfa (GSTA)	61
Preparação de amostras para realização e montagem de transcriptoma de novas espécies prioritárias	73
8.5 Análise de biomarcadores bioquímicos enzimáticos em tetrápodes marinhos	78
Homogeneização das amostras	78
Determinação de proteínas totais	78
Quantificação de atividade GST	78
Quantificação de atividade EROD	79
Análises estatísticas preliminares	80
Resultados e discussão de biomarcadores bioquímicos em tetrápodes marinhos	81
Resultados e discussão de atividade GST e EROD em cetáceos	91
8.6 Conclusões.....	91
8.7 Referências	92
9 ANÁLISES DE FINGERPRINT	99
9.1 Atividades e empreendimentos em operação.....	100
9.2 Registros de incidentes ambientais	102
9.3 Registros de resíduos oleosos	106
9.4 Registros de fauna oleada.....	110
9.5 Considerações.....	116
10 REGISTROS DE RESÍDUOS SÓLIDOS.....	121
10.1 Registros por Trecho	121
11 AÇÕES DE COMUNICAÇÃO	127

11.1	Educação Ambiental.....	127
11.2	Divulgação.....	127
11.3	Divulgação Técnico-Científica	128
12	CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
13	EQUIPE TÉCNICA.....	133
	Coordenação Geral.....	133
	Colaboradores.....	136
14	APÊNDICES	141
	Apêndice 1 – Registros de Fauna	141
	Apêndice 2 – Históricos Clínicos.....	141
	Apêndice 3 – Necropsias	141
	Apêndice 4 – Modelos Lineares Generalizados	141
	Apêndice 5 – Análise de Redundância	141
	Apêndice 6 – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e organohalogenados.....	141
	Apêndice 7 – Elementos Traço	141
	Apêndice 8 – biomarcadores.....	141
	Apêndice 9 – Ações de Educação Ambiental	142
	Apêndice 10 – coordenadas.....	142

TABELAS

TABELA 8-1 - ESPÉCIES PRIORITÁRIAS E BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM AVES, QUELÔNIOS E MAMÍFEROS DOS PMPS. O PREENCHIMENTO VERDE INDICA QUE O BIOMARCADOR JÁ ESTÁ PADRONIZADO PARA A ESPÉCIE E O PREENCHIMENTO EM CINZA INDICA NECESSIDADE DE PADRONIZAÇÃO.	18
TABELA 8-2 - AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS PROVENIENTES DO PMP-BS DESTINADAS À ANÁLISE DE BIOMARCADORES DESDE O INÍCIO DAS ATIVIDADES ATÉ DEZ/2023. AS ESPÉCIES PRIORITÁRIAS PARA ANÁLISE DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E MOLECULARES ESTÃO SINALIZADAS EM AZUL.....	19
TABELA 8-3 - VALORES DE KMAPP E VMAX PARA O SUBSTRATO GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) UTILIZADO NO ENSAIO DE ATIVIDADE GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS, SULA LEUCOGASTER, CARETTA CARETTA, LEPIDOCHELYS OLIVACEA, E SOTALIA GUIANENSIS.	34
TABELA 8-4 - VALORES DE KMAPP E VMAX PARA O SUBSTRATO 1-CLORO-2,4-DINITROBENZENO (CDNB) UTILIZADO NO ENSAIO DE ATIVIDADE GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS, SULA LEUCOGASTER, CARETTA CARETTA, LEPIDOCHELYS OLIVACEA, E SOTALIA GUIANENSIS.	34
TABELA 8-5 - VALORES DE DETECÇÃO TEÓRICO (MABS/MIN), INTERVALO DE QUANTIFICAÇÃO (MABS/MIN) E VALOR DE PRECISÃO INTRA-ENSAIO (REPETIBILIDADE) E ENTRE ENSAIOS (REPRODUTIBILIDADE) PARA AS ESPÉCIES CALONECTRIS BOREALIS, SULA LEUCOGASTER, CARETTA CARETTA, LEPIDOCHELYS OLIVACEA E SOTALIA GUIANENSIS.	35
TABELA 8-6 CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE GST EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS, SULA LEUCOGASTER, CARETTA CARETTA, LEPIDOCHELYS OLIVACEA E SOTALIA GUIANENSIS.	37
TABELA 8-7 VALORES DE DETECÇÃO TEÓRICO (MRFU/MIM), INTERVALO DE QUANTIFICAÇÃO (MRFU/MIM) E VALOR DE PRECISÃO INTRA-ENSAIO (REPETIBILIDADE) E ENTRE ENSAIOS (REPRODUTIBILIDADE) DO ENSAIO EROD EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS, SULA LEUCOGASTER, CARETTA CARETTA, LEPIDOCHELYS OLIVACEA E SOTALIA GUIANENSIS.	46
TABELA 8-8 CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE EROD EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS, SULA LEUCOGASTER, CARETTA CARETTA, LEPIDOCHELYS OLIVACEA E SOTALIA GUIANENSIS.	48
TABELA 8-9 - RESUMO DAS COMBINAÇÕES DE CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO TESTADAS PARA IMUNODETECÇÃO DE CYP1A EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS E SULA LEUCOGASTER.	51
TABELA 8-10 - RESUMO DAS COMBINAÇÕES DE CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO TESTADAS PARA IMUNODETECÇÃO DE CYP1A EM TECIDO HEPÁTICO DE SOTALIA GUIANENSIS.	52
TABELA 8-11 - CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A IMUNODETECÇÃO DE CYP1A EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS, SULA LEUCOGASTER E SOTALIA GUIANENSIS.	60
TABELA 8-12 - SEQUÊNCIAS DE INICIADORES SELECIONADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES VITELOGENINA (VTG) E GLUTATIONA S-TRANSFERASE ALFA (GSTA) EM TECIDO HEPÁTICO DE LARUS DOMINICANUS, CHELONIA MYDAS E PUFFINUS PUFFINUS.	62

TABELA 8-13 - VALORES DE R² E EFICIÊNCIA CALCULADOS COM BASE EM UMA CURVA PADRÃO DE CDNA DE CHELONIA MYDAS, LARUS DOMINICANUS E PUFFINUS PUFFINUS.	68
TABELA 8-14 - SEQUÊNCIAS DE INICIADORES DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES VITELOGENINA (VTG-1-LIKE E VTG-2) EM TECIDO HEPÁTICO DE CHELONIA MYDAS.	70
TABELA 8-15 - IDENTIFICAÇÃO DOS ESPÉCIMES DE CHELONIA MYDAS CUJAS AMOSTRAS FORAM UTILIZADAS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS NOVOS INICIADORES.	70
TABELA 8-16 - CONCENTRAÇÃO, PUREZA E INTEGRIDADE DO RNA EXTRAÍDO DE TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS, SULA LEUCOGASTER, CARETTA CARETTA, LEPIDOCHELYS OLIVACEA E SOTALIA GUIANENSIS.	75
TABELA 9-1 – RELAÇÃO DE INCIDENTES DE DESCARGA NO MAR POR ATIVIDADES/EMPREENHIMENTOS DA PETROBRAS NA BACIA DE SANTOS ENTRE 01/01/2023 E 31/12/2023.	103
TABELA 9-2 - OCORRÊNCIAS DE RESÍDUOS OLEOSOS REGISTRADOS PELO PMP-BS ENTRE 01/01/2023 E 31/12/2023.	107
TABELA 9-3 – OCORRÊNCIAS DE FAUNA OLEADA NO PMP-BS ENTRE 01/01/2023 E 31/12/2023.	111
TABELA 9-4 – OCORRÊNCIAS DE RESÍDUOS OLEOSOS REGISTRADOS NO PMP-BS ENTRE OS ANOS DE 2017 E 2023.	116
TABELA 9-5 – REGISTROS DE FAUNA OLEADA AO LONGO DO PMP-BS NOS ANOS DE 2017 A 2023.	118
TABELA 10-1 QUANTIDADE E TIPO DE OCORRÊNCIAS DE RESÍDUOS SÓLIDOS POTENCIALMENTE RELACIONADOS ÀS ATIVIDADES LICENCIADAS (EXPLORAÇÃO, PRODUÇÃO E ESCOAMENTO DE ÓLEO E GÁS), POR ESTADO, MUNICÍPIO E PRAIA, PELO PMP-BS ÁREA SC/PR, DE 01/01/2023 A 31/12/2023.	122
TABELA 10-2– REGISTROS DE RESÍDUOS SÓLIDOS POTENCIALMENTE RELACIONADOS ÀS ATIVIDADES LICENCIADAS (EXPLORAÇÃO, PRODUÇÃO E ESCOAMENTO DE ÓLEO E GÁS), PELO PMP-BS ÁREA SC/PR, DE 01/01/2023 A 31/12/2023.	123
TABELA 10-3 – QUANTIDADE E TIPO DE OCORRÊNCIAS DE RESÍDUOS SÓLIDOS POR MUNICÍPIO E PRAIAS E POR TRECHO NO PMP-BS ÁREA SP NO PERÍODO DE 01/01/2023 A 31/12/2023.	124
TABELA 10-4– REGISTROS DE RESÍDUOS SÓLIDOS POTENCIALMENTE RELACIONADOS ÀS ATIVIDADES LICENCIADAS (EXPLORAÇÃO, PRODUÇÃO E ESCOAMENTO DE ÓLEO E GÁS), PELO PMP-BS ÁREA SP, DE 01/01/2023 A 31/12/2023.	125
TABELA 10-5 – QUANTIDADE E TIPO DE OCORRÊNCIAS DE RESÍDUOS SÓLIDOS POTENCIALMENTE RELACIONADOS ÀS ATIVIDADES LICENCIADAS (EXPLORAÇÃO, PRODUÇÃO E ESCOAMENTO DE ÓLEO E GÁS), POR MUNICÍPIO E PRAIAS, PELO PMP-BS ÁREA RJ, DE 01/01/2023 A 31/12/2023.	125
TABELA 10-6– REGISTROS DE RESÍDUOS SÓLIDOS POTENCIALMENTE RELACIONADOS ÀS ATIVIDADES LICENCIADAS (EXPLORAÇÃO, PRODUÇÃO E ESCOAMENTO DE ÓLEO E GÁS), PELO PMP-BS ÁREA RJ, DE 01/01/2023 A 31/12/2023.	126
TABELA 11-1 – QUANTIDADE DE PESSOAS ATINGIDAS PELAS AÇÕES DE DIVULGAÇÃO E EDUCAÇÃO AMBIENTAL DESENVOLVIDAS PELO PMP-BS NO PERÍODO DE 01/01/2023 A 31/12/2023.	127
TABELA 11-2 – QUANTIDADE DE REAÇÕES EM REDES SOCIAIS RELACIONADAS A PUBLICAÇÕES FEITAS PELAS INSTITUIÇÕES DO PMP-BS NO PERÍODO DE 01/01/2023 A 31/12/2023. ...	128

TABELA 11-3 – TRABALHOS ACADÊMICO-CIENTÍFICOS FINALIZADOS PELAS INSTITUIÇÕES DO PMP-BS ÁREA SC/PR, NO PERÍODO DE 01/01/2023 A 31/12/2023.....	129
TABELA 11-4 – TRABALHOS CIENTÍFICOS FINALIZADOS PELAS INSTITUIÇÕES DO PMP-BS ÁREA SP, NO PERÍODO DE 01/01/2023 A 31/12/2023.	130
TABELA 11-5 – TRABALHOS ACADÊMICO-CIENTÍFICOS FINALIZADOS/SUBMETIDOS PELAS INSTITUIÇÕES DO PMP-BS ÁREA RJ, NO PERÍODO DE 01/01/2023 A 31/12/2023.	130

FIGURAS

- FIGURA 8-1-** DISTRIBUIÇÃO DAS OCORRÊNCIAS DE CARCAÇAS DE AVES MARINHAS (COD. 2), A PARTIR DAS QUAIS FORAM COLETADAS AMOSTRAS DE FÍGADO PARA ANÁLISES DE BIOMARCADORES. CB, LD, PP E SU SÃO AS SIGLAS INDICADAS NA LEGENDA PARA CALONECTRIS BOREALIS, LARUS DOMINICANUS, PUFFINUS PUFFINUS E SULA LEUCOGASTER, RESPECTIVAMENTE.22
- FIGURA 8-2-** DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE QUELÔNIOS (COD. 2) A PARTIR DAS QUAIS FORAM COLETADAS AMOSTRAS DE FÍGADO PARA ANÁLISES DE BIOMARCADORES (CARETTA CARETTA E CHELONIA MYDAS). CC E CM SÃO AS SIGLAS INDICADAS NA LEGENDA PARA C. CARETTA E C. MYDAS, RESPECTIVAMENTE.23
- FIGURA 8-3 -** DISTRIBUIÇÃO DAS OCORRÊNCIAS DE CARCAÇAS DE LEPIDOCHELYS OLIVACEA (COD. 2), A PARTIR DAS QUAIS FORAM COLETADAS AMOSTRAS DE FÍGADO PARA ANÁLISES DE BIOMARCADORES.....24
- FIGURA 8-4 -** DISTRIBUIÇÃO DAS OCORRÊNCIAS DE CARCAÇAS DE BOTO CINZA, SOTALIA GUIANENSIS (COD. 2), A PARTIR DAS QUAIS FORAM COLETADAS AMOSTRAS DE FÍGADO PARA ANÁLISES DE BIOMARCADORES.25
- FIGURA 8-5 - A)** CURVAS CINÉTICAS DE ATIVIDADE GST EM TECIDO HEPÁTICO DE CARETTA CARETTA E LEPIDOCHELYS OLIVACEA CONSTRUÍDAS COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO GLUTATIONA REDUZIDA (GSH). CONDIÇÕES DO ENSAIO: CDNB 1 mM, TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO (0,1 M, pH 7,0), 30°C. **B)** CURVAS CINÉTICAS DE ATIVIDADE GST EM TECIDO HEPÁTICO DE C. CARETTA E L. OLIVACEA CONSTRUÍDAS COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO 1-CLORO-2,4-DINITROBENZENO (CDNB). CONDIÇÕES DO ENSAIO: GSH 2,5 mM, TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO (0,1 M, pH 7,0), 30°C. KMAPP E VMAX OBTIDOS POR MEIO DE REGRESSÃO NÃO LINEAR DOS DADOS AJUSTADOS AO MODELO DE MICHAELIS-MENTEN.....32
- FIGURA 8-6 A)** CURVAS CINÉTICAS DE ATIVIDADE GST EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS, SULA LEUCOGASTER E SOTALIA GUIANENSIS CONSTRUÍDAS COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO GLUTATIONA REDUZIDA (GSH). CONDIÇÕES DO ENSAIO: CDNB 1 mM, TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO (0,1 M, pH 7,0), 37°C. **B)** CURVAS CINÉTICAS DE ATIVIDADE GST EM TECIDO HEPÁTICO DE C. BOREALIS, S. LEUCOGASTER E S. GUIANENSIS CONSTRUÍDAS COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DO SUBSTRATO ENZIMÁTICO 1-CLORO-2,4-DINITROBENZENO (CDNB). CONDIÇÕES DO ENSAIO: GSH 2 mM (C. BOREALIS), 2,5 mM (S. LEUCOGASTER E S. GUIANENSIS), TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO (0,1 M, pH 7,0), 37°C. KMAPP E VMAX OBTIDOS POR MEIO DE REGRESSÃO NÃO LINEAR DOS DADOS AJUSTADOS AO MODELO DE MICHAELIS-MENTEN.33
- FIGURA 8-7** RELAÇÃO ENTRE A ABSORBÂNCIA POR MINUTO (MABS/MIN) EM DECORRÊNCIA DA FORMAÇÃO DO CONJUGADO GS-DNB E A MASSA DE PROTEÍNAS TOTAIS (MG) DE TECIDO HEPÁTICO DE A) CARETTA CARETTA, B) LEPIDOCHELYS OLIVACEA, C) CALONECTRIS BOREALIS, D) SULA LEUCOGASTER E E) SOTALIA GUIANENSIS. LINHA SÓLIDA REPRESENTA REGRESSÃO LINEAR, COM INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) REPRESENTADO POR LINHAS PONTILHADAS AZUIS.37

- FIGURA 8-8 (A) CURVA CINÉTICA DE ATIVIDADE EROD EM TECIDO HEPÁTICO DE (A) CARETTA CARETTA, (B) LEPIDOCHELYS OLIVACEA, (C) CALONECTRIS BOREALIS, (D) SULA LEUCOGASTER E (E) SOTALIA GUIANENSIS CONSTRUÍDA COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DO SUBSTRATO 7-ETOXIRESORUFINA (7-ER), SENDO K_{MAPP} E V_{MAX} OBTIDOS POR MEIO DE REGRESSÃO NÃO LINEAR DOS DADOS AJUSTADOS AO MODELO DE INIBIÇÃO POR SUBSTRATO. A V_{MAX} CALCULADA PELO PROGRAMA É A V_{MAX} ESTIMADA NA AUSÊNCIA DE INIBIÇÃO POR SUBSTRATO.....44**
- FIGURA 8-9 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NADPH NA ATIVIDADE EROD EM TECIDO HEPÁTICO DE (A) CARETTA CARETTA, (B) LEPIDOCHELYS OLIVACEA, (C) CALONECTRIS BOREALIS, (D) SULA LEUCOGASTER E (E) SOTALIA GUIANENSIS. MÉDIA \pm DP CALCULADOS COM BASE EM RÉPLICAS TÉCNICAS.....45**
- FIGURA 8-10 RELAÇÃO ENTRE A FLUORESCÊNCIA POR MINUTO (MRFU/MIN) EM DECORRÊNCIA DA FORMAÇÃO DA RESORUFINA E A MASSA DE PROTEÍNAS MICROSSOMAS (MG) DE TECIDO HEPÁTICO DE (A) CARETTA CARETTA, (B) LEPIDOCHELYS OLIVACEA, (C) CALONECTRIS BOREALIS, (D) SULA LEUCOGASTER E (E) SOTALIA GUIANENSIS. LINHA SÓLIDA REPRESENTA REGRESSÃO LINEAR, COM INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) REPRESENTADO POR LINHAS PONTILHADAS AZUIS.47**
- FIGURA 8-11- IMUNODETECÇÃO DE CYP1A EM TECIDO HEPÁTICO DE SULA LEUCOGASTER E CALONECTRIS BOREALIS, UTILIZANDO ANTICORPO PRIMÁRIO CP-226 (CAYMAN CHEMICAL®) E TECIDO HEPÁTICO DE SOTALIA GUIANENSIS, UTILIZANDO ANTICORPO PRIMÁRIO AB126887 (ABCAM).....53**
- FIGURA 8-12 IMUNODETECÇÃO DE CYP1A EM TECIDO HEPÁTICO DE SULA LEUCOGASTER UTILIZANDO CARGAS PROTEICAS CRESCENTES, DE 2,5 A 60 μ G. BANDA DE INTERESSE SINALIZADA COM UMA SETA AZUL.54**
- FIGURA 8-13 ANÁLISES GRÁFICAS DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE EMITIDO E AS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS MICROSSOMAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO DE CYP1A EM AMOSTRAS HEPÁTICAS DE SULA LEUCOGASTER. A) VARIAÇÃO DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE COM A MASSA DE PROTEÍNAS DE 2,5 A 60 μ G. B) VARIAÇÃO DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE COM A MASSA DE PROTEÍNAS DE 2,5 A 30 μ G. C) VARIAÇÃO DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE COM A MASSA DE PROTEÍNAS DE 2,5 A 20 μ G. D) RELAÇÃO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE DE CYP1A NORMALIZADO PELO SINAL FLUORESCENTE DE PROTEÍNA TOTAL EM RELAÇÃO A MASSA NOMINAL DE PROTEÍNAS APLICADA NO POÇO.....55**
- FIGURA 8-14 IMUNODETECÇÃO DE CYP1A EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS, UTILIZANDO CARGAS PROTEICAS CRESCENTES DE 2,5 A 60 μ G. BANDA DE INTERESSE SINALIZADA COM UMA SETA AZUL.56**
- FIGURA 8-15 - ANÁLISES GRÁFICAS DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE EMITIDO E AS CARGAS DE PROTEÍNAS MICROSSOMAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO DE CYP1A EM AMOSTRAS HEPÁTICAS DE CALONECTRIS BOREALIS. A) VARIAÇÃO DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE COM A MASSA DE PROTEÍNAS DE 2,5 A 60 μ G. B) VARIAÇÃO DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE COM A MASSA DE PROTEÍNAS DE 2,5 A 40 μ G. C) VARIAÇÃO DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE COM A MASSA DE PROTEÍNAS DE 2,5 A 30 μ G. D) RELAÇÃO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE DO CYP1A NORMALIZADO PELO SINAL FLUORESCENTE DE PROTEÍNA TOTAL EM RELAÇÃO A MASSA NOMINAL DE PROTEÍNAS APLICADA NO POÇO.56**

- FIGURA 8-16 - IMUNODETECÇÃO CYP1A EM TECIDO HEPÁTICO DE SOTALIA GUIANENSIS UTILIZANDO CARGAS PROTEICAS CRESCENTES, DE 2,5 A 50 µg. BANDA DE INTERESSE SINALIZADA COM UMA SETA AZUL.57**
- FIGURA 8-17 - ANÁLISES GRÁFICAS DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE EMITIDO E AS CARGAS DE PROTEÍNAS MICROSSOMAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO DE CYP1A EM AMOSTRA DE TECIDO HEPÁTICO DE SOTALIA GUIANENSIS. A) VARIAÇÃO DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE COM A MASSA DE PROTEÍNAS DE 2,5 A 50 µg. B) VARIAÇÃO DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE COM A MASSA DE PROTEÍNAS DE 2,5 A 40 µg. C) VARIAÇÃO DO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE COM A MASSA DE PROTEÍNAS DE 2,5 A 20 µg. D) RELAÇÃO SINAL QUIMIOLUMINESCENTE DO CYP1A NORMALIZADO PELO SINAL FLUORESCENTE DE PROTEÍNA TOTAL EM RELAÇÃO A MASSA NOMINAL DE PROTEÍNAS APLICADA NO POÇO.58**
- FIGURA 8-18 MEMBRANAS DE WESTERN BLOTTING COM AMOSTRAS DE MICROSSOMA DE TECIDO HEPÁTICO DE SULA LEUCOGASTER (Su) E CALONECTRIS BOREALIS (Cb), INCUBADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPO PRIMÁRIO (CP-226, CAYMAN CHEMICAL) E SECUNDÁRIO (ANTI-COELHO; RPN2108, AMERSHAM).....59**
- FIGURA 8-19 - MEMBRANAS DE WESTERN BLOTTING COM AMOSTRAS DE MICROSSOMA DE TECIDO HEPÁTICO DE SOTALIA GUIANENSIS (Sg) E TECIDO TEGUMENTAR DE MEGAPTERA NOVAEANGLIAE (Mn), INCUBADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-CYP1A (ABCAM, CÓDIGO AB126887) E SECUNDÁRIO (ANTI-CABRA; ABCAM, CÓDIGO AB205723). CP, CONTROLE POSITIVO.60**
- FIGURA 8-20 - CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE GSTA EM TECIDO HEPÁTICO DE CHELONIA MYDAS, LARUS DOMINICANUS E PUFFINUS PUFFINUS. EIXO X (TEMPERATURA); EIXO Y (DERIVADA NEGATIVA DA FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, -dF/dT). O PONTO MÁXIMO DE CADA LINHA REPRESENTA A TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO DO PRODUTO. A PRESENÇA DE UM PICO ÚNICO SUGERE A PRESENÇA DE UM ÚNICO PRODUTO.66**
- FIGURA 8-21 - CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE VTG EM TECIDO HEPÁTICO DE CHELONIA MYDAS E PUFFINUS PUFFINUS. EIXO X (TEMPERATURA); EIXO Y (DERIVADA NEGATIVA DA FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, -dF/dT). O PONTO MÁXIMO DE CADA LINHA REPRESENTA A TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO DO PRODUTO. A PRESENÇA DE UM PICO ÚNICO SUGERE A PRESENÇA DE UM ÚNICO PRODUTO.....67**
- FIGURA 8-22 - PRODUTOS DAS REAÇÕES DE QPCR PARA OS GENES DE GLUTATIONA S-TRANSFERASE ISOFORMA ALFA EM CHELONIA MYDAS (GSTA, Cm), LARUS DOMINICANUS (GSTA, Ld) E PUFFINUS PUFFINUS (GSTA, Pp) E DE VITELOGENINA EM PUFFINUS PUFFINUS (VTG1, Pp) SUBMETIDOS À ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 3%. A PRESENÇA DE UMA ÚNICA BANDA INDICA FORMAÇÃO DE UM ÚNICO PRODUTO, ATESTANDO A ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES DESENHADOS.69**
- FIGURA 8-23 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR CONVENCIONAL OBTIDOS COM OS PARES DE INICIADORES DESENHADOS PARA DETECÇÃO DE VITELOGENINA 1-LIKE E VITELOGENINA 2 (VTG1-LIKE, VTG2A E VTG2B) EM AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO DE CHELONIA MYDAS.72**

- FIGURA 8-24 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE RNA EM GEL DE AGAROSE 1,2% COM FORMALDEÍDO DAS AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO DE C. CARETTA, L. OLIVACEA, C. BOREALIS, S. LEUCOGASTER E S. GUIANENSIS.....77**
- FIGURA 8-25 - REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO CONJUGADO GS-DNB A PARTIR DA REAÇÃO ENTRE 1-CLORO-2,4-DINITROBENZENO (CDNB) E GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), CATALISADA POR GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) (ADAPTADO DE HABIG E JAKOBY, 1981).....79**
- FIGURA 8-26 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ATIVIDADE GST E EROD EM TECIDO HEPÁTICO DE SULA LEUCOGASTER EM DIFERENTES CONDIÇÕES. (A) ATIVIDADE GST ENTRE INDIVÍDUOS JUVENIS E ADULTOS. (B) ATIVIDADE GST ENTRE INDIVÍDUOS FÊMEAS E MACHOS. (C) ATIVIDADE EROD EM RELAÇÃO AO ESCORE CORPORAL. (D) ATIVIDADE GST AO LONGO DOS ANOS. (E) ATIVIDADE EROD NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO. (F) ATIVIDADE GST NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.....82**
- FIGURA 8-27 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ATIVIDADE GST E EROD EM TECIDO HEPÁTICO DE PUFFINUS PUFFINUS EM DIFERENTES CONDIÇÕES. (A) ATIVIDADE EROD ENTRE INDIVÍDUOS NÃO-OLEADOS E OLEADOS. (B) ATIVIDADE EROD AO LONGO DOS ANOS. (C) ATIVIDADE GST AO LONGO DOS ANOS.85**
- FIGURA 8-28 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ATIVIDADE (A) GST E (B) EROD EM TECIDO HEPÁTICO DE CALONECTRIS BOREALIS EM INDIVÍDUOS FÊMEAS E MACHOS.86**
- FIGURA 8-29 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ATIVIDADE GST E EROD EM TECIDO HEPÁTICO DE LARUS DOMINICANUS EM DIFERENTES CONDIÇÕES. (A) ATIVIDADE EROD ENTRE INDIVÍDUOS JUVENIS E ADULTOS. (B) ATIVIDADE EROD NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO. (C) ATIVIDADE EROD AO LONGO DOS ANOS. (D) ATIVIDADE GST AO LONGO DOS ANOS.88**
- FIGURA 8-30 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ATIVIDADE GST E EROD EM TECIDO HEPÁTICO DE CHELONIA MYDAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES. (A) ATIVIDADE EROD ENTRE INDIVÍDUOS NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE RESÍDUOS SÓLIDOS NO TRATO GASTROINTESTINAL. (B) ATIVIDADE EROD EM RELAÇÃO AO COMPRIMENTO CURVILÍNEO DA CARAPAÇA. (C) ATIVIDADE EROD EM RELAÇÃO AO ESCORE CORPORAL. (D) ATIVIDADE GST EM RELAÇÃO AO ESCORE CORPORAL. (E) ATIVIDADE EROD AO LONGO DOS ANOS E F) ATIVIDADE GST AO LONGO DOS ANOS.90**
- FIGURA 9-1 – MAPA COM A AGBS, UNIDADES DE PRODUÇÃO DA PETROBRAS E DE OUTRAS OPERADORAS NA BACIA DE SANTOS.101**
- FIGURA 9-2 – RESÍDUOS OLEOSOS REGISTRADOS NA ÁREA DE ABRANGÊNCIA DO PMP-BS ENTRE 01/01/2023 E 31/12/2023 E RESPECTIVOS CÓDIGOS DE AMOSTRA.109**
- FIGURA 9-3 - LOCAIS DE REGISTRO DE FAUNA OLEADA ENCONTRADA PELO PMP-BS ÁREA SC/PR NO PERÍODO DE 01/01/2023 A 31/12/2023.....113**
- FIGURA 9-4 - LOCAIS DE REGISTRO DE FAUNA OLEADA ENCONTRADA PELO PMP-BS ÁREA SP NO PERÍODO DE 01/01/2023 A 31/12/2023.....114**
- FIGURA 9-5 - LOCAIS DE REGISTRO DE FAUNA OLEADA ENCONTRADA PELO PMP-BS ÁREA RJ NO PERÍODO DE 01/01/2023 A 31/12/2023.114**

FIGURA 9-6 – REGISTROS DOS 5 ANIMAIS OLEADOS REGISTRADOS NO PMP-BS NO PERÍODO DE 01/01/2023 A 31/12/2023 E RESPECTIVOS II (IDENTIFICADOR DO INDIVÍDUO).	115
FIGURA 9-7 – SÉRIE HISTÓRICA COM REGISTROS DE RESÍDUOS OLEOSOS PELO PMP-BS.	117
FIGURA 9-8 – SÉRIE HISTÓRICA COM REGISTRO DE FAUNA OLEADA PELO PMP-BS.	119
FIGURA 10-1 - REGISTRO DE OCORRÊNCIAS DE RESÍDUOS SÓLIDOS APÓS AJUSTE METODOLÓGICO (2019 A 2023) NA ÁREA DE ABRANGÊNCIA DO PMP-BS.	122

APRESENTAÇÃO

O Projeto de Monitoramento de Praias (PMP-BS) é um dos projetos regionais concebidos e executados para atender demanda 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) e de elementos traço, realizadas a partir de tecidos extraídos de animais encontrados mortos no monitoramento de praias. Até setembro de 2023 as análises de HPA estavam sob responsabilidade do Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP) e as de elementos-traço sob responsabilidade do Laboratório de Elementos Traços do Centro de Estudos Ambientais da Unesp (Universidade Estadual Paulista/UNESP). Após essa data, ambas as análises passaram a ser executadas por laboratórios da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio).

Neste ano, houve ainda a incorporação do capítulo de Biomarcadores, conforme proposta do 2º ciclo (Carta SMS/LCA/MPL-E&P-FC 0115/2021), e considerações acrescentadas a partir dos Pareceres Técnicos 129/2021-COPROD/CGMAC/DILIC e 242/2021-COPROD/CGMAC/DILIC. 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).

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 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 três volumes que apresentam os seguintes conteúdos:

- Volume 1: Resumo Executivo, Introdução, descrição dos resultados das atividades do Monitoramento de Praias (riqueza e abundância das espécies, quantitativos do monitoramento terrestre e embarcado, padrões dos acionamentos) e do Atendimento Veterinário (reabilitação, necropsias, índice de saúde), análises dos parâmetros biológicos (estrutura etária, maturidade);
- Volume 2: Análises espaço-temporal integradas sobre padrões de encalhes e de índice de saúde, análises de HPA, organohalogenados e de elementos traço;
- Volume 3: Biomarcadores, registros de fauna oleada, resíduos oleosos e sólidos, ações de comunicação, considerações finais e equipe técnica.

8 BIOMARCADORES

8.1 INTRODUÇÃO

O Projeto de Padronização de Técnicas e Execução de Análises de Biomarcadores Bioquímicos e Moleculares em Amostras obtidas em Espécies de Aves, Quelônios e Mamíferos Marinhos compõe uma prestação de serviços executada pelo Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica – LABCAI, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, em atendimento às demandas dos processos de licenciamento ambiental da Petrobras na Bacia de Santos. O projeto visa desenvolver, adaptar e padronizar biomarcadores para avaliar a ocorrência de potenciais efeitos de contaminantes orgânicos sobre as espécies de tetrápodes marinhos registradas pelo PMP-BS. Após padronizados, os biomarcadores são analisados em amostras de tecido hepático de cetáceos, aves e tartarugas marinhas. A coleta de amostras de fígado para a análise de biomarcadores é feita durante a necropsia de carcaças frescas (código 2), que não receberam nenhum tipo de tratamento ou passaram por procedimentos veterinários.

Biomarcadores são definidos como alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou fisiológicas medidas em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos dentro de um organismo servindo como indicativos de exposição e/ou efeito de xenobióticos (isto é, substâncias estranhas ao organismo) (LAM; GRAY, 2003; LIVINGSTONE, 1993; WALKER, 1995). Os biomarcadores podem fornecer informações precoces dos efeitos da contaminação em menores níveis de organização biológica, como células e tecidos de organismos, antes da ocorrência de mortalidade e danos em níveis superiores de organização, como populações, comunidades e ecossistemas (CAJARAVILLE et al., 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Dentre os biomarcadores frequentemente analisados em estudos ambientais, destacam-se as enzimas envolvidas na biotransformação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e organohalogenados. Estas enzimas estão presentes nas células de todos os organismos vivos e são responsáveis por catalisar reações intracelulares de oxidação e conjugação, tornando o contaminante mais fácil de ser eliminado pelo organismo. Deste modo, a quantificação de HPAs e organohalogenados bioacumulados nos tecidos dos tetrápodes amostrados é de suma importância para o entendimento da possível relação entre os efeitos biológicos – detectados pelos biomarcadores – e a exposição aos contaminantes ambientais.

Entre os anos de 2016 e 2021, que abrangeu o 1º ciclo de atividades desta prestação de serviços, foram avaliados biomarcadores em tecido hepático de três espécies prioritárias: as aves *Larus dominicanus* e *Puffinus puffinus* e a tartaruga verde, *Chelonia mydas*. Dentre os resultados mais expressivos, foi observado um aumento nas respostas de biomarcadores bioquímicos nas tartarugas que apresentaram resíduos sólidos em seu trato gastrointestinal, que podem estar associadas à presença de contaminantes presentes nos resíduos, ou mesmo à uma possível maior contaminação das presas e/ou locais onde os animais foram expostos aos resíduos. Durante o primeiro ciclo, foram amostrados indivíduos de *P. puffinus* que estavam oleados, cujos resultados de biomarcadores evidenciaram uma maior atividade do sistema de biotransformação de xenobióticos, quando comparados aos animais não oleados. Dentre os contaminantes bioacumulados, o naftaleno foi o HPA mais frequente e abundante nestas espécies, que também apresentaram níveis significativos de organohalogenados, cujos maiores valores foram encontrados em *P. puffinus*.

No contexto de contínuo aperfeiçoamento das estratégias de biomonitoramento ambiental através do uso de biomarcadores, foram realizadas algumas alterações no conjunto de parâmetros analisados nas amostras das espécies prioritárias do PMP-BS, tanto nas analisadas do 1º ciclo como nas novas espécies incluídas no 2º

ciclo (**Tabela 8-1**). Para a seleção dos novos biomarcadores incluídos no 2º ciclo foram utilizados os seguintes critérios: especificidade do biomarcador; tecido alvo necessário para as análises; quantidade e qualidade de amostra disponível para os ensaios; reprodutibilidade das metodologias; complexidade técnica dos ensaios bioquímicos e moleculares; e estrutura laboratorial e técnica disponível no LABCAI/UFSC.

Tabela 8-1 - Espécies prioritárias e biomarcadores bioquímicos em aves, quelônios e mamíferos dos PMPs. O preenchimento verde indica que o biomarcador já está padronizado para a espécie e o preenchimento em cinza indica necessidade de padronização.

Espécie	EROD *	GST *	CYP1A-WB *	DNAad **, *	AhR *	CYP1A *	UGT *	ESR *	GSTA **, *	VTG **, *
<i>Larus dominicanus</i>										
<i>Puffinus puffinus</i>										
<i>Sula leucogaster</i> **										
<i>Calonectris borealis</i> **										
<i>Chelonia mydas</i>										
<i>Caretta caretta</i> **										
<i>Lepidochelys olivacea</i> **										
<i>Sotalia guianensis</i> *										N.A.

*Atividade etoxiresorufina O-deetilase (EROD); atividade glutathione S-transferase (GST); quantificação de citocromo 1A (CYP1A-WB); adutos de DNA (DNAad); transcritos do receptor para aril hidrocarbonetos (AhR); transcritos do citocromo P450 família 1A (CYP1A); transcritos de UDP-glicuronosiltransferase (UGT); transcritos do receptor de estrógeno (ESR); transcritos de glutathione S-transferase alfa (GSTA); transcritos de vitelogenina (VTG).

** Novas espécies e biomarcadores bioquímicos e moleculares propostos para o 2º ciclo.

N.A. Não se aplica.

Desta maneira, no 2º ciclo foi dada continuidade às análises dos biomarcadores bioquímicos EROD, GST e CYP1A, uma vez que essas moléculas já são amplamente conhecidas e aplicadas como biomarcadores de exposição a

contaminantes orgânicos em estudos e programas de biomonitoramento ambiental em todo o globo (KING; ELLIOTT; WILLIAMS, 2021; GARDNER; OBERDORSTER, 2005; CASINI et al., 2018). Para os biomarcadores moleculares no 2º ciclo, tiveram continuidade as análises da transcrição dos genes *CYP1A*, *UGT* e *ESR*, pois estão diretamente envolvidos com o metabolismo de HPA e desregulação endócrina em diferentes espécies de vertebrados. Por se tratar de espécies ovíparas foi incluída a análise da transcrição dos genes *GST-alfa* e *Vitelogenina* como biomarcadores moleculares para aves e tartarugas marinhas. Por fim, foi incluída também a quantificação de adutos no DNA (DNAad), como biomarcador bioquímico de exposição a HPA.

8.2 Recebimento e guarda de amostras

Até 31 de dezembro de 2023, encontravam-se sob guarda do LABCAI amostras de 4.361 indivíduos provenientes do PMP-BS pertencentes a 67 espécies (**Tabela 8-2**). Destas, destinam-se para análise de biomarcadores bioquímicos e moleculares as amostras dos indivíduos de espécies prioritárias. O sumário dos indivíduos amostrados foi elaborado de acordo com os dados disponíveis no SIMBA em 31/12/2023.

Tabela 8-2 - Amostras de indivíduos provenientes do PMP-BS destinadas à análise de biomarcadores desde o início das atividades até dez/2023. As espécies prioritárias para análise de biomarcadores bioquímicos e moleculares estão sinalizadas em azul.

PMP-BS – SIMBA (31/12/2023)		
	Classe Reptilia	
Grupo taxonômico	Espécie	Número de indivíduos amostrados
Ordem Testudinata	<i>Chelonia mydas</i>	1.365
	<i>Caretta caretta</i>	63
	<i>Lepidochelys olivacea</i>	05
	<i>Eretmochelys imbricata</i>	05
	<i>Dermochelys coriacea</i>	04
	Classe Aves	
Grupo taxonômico	Espécie	Número de indivíduos amostrados

Ordem Sphenisciformes	<i>Spheniscus magellanicus</i>	1.262
Ordem Charadriiformes	<i>Larus dominicanus</i>	311
	<i>Thalasseus acutiflavus</i>	19
	<i>Sterna hirundinacea</i>	14
	<i>Sterna sp.</i>	12
	<i>Sterna hirundo</i>	10
	<i>Thalasseus maximus</i>	06
	<i>Haematopus palliatus</i>	04
	<i>Himantopus melanurus</i>	03
	<i>Rynchops niger</i>	02
	<i>Charadrius semipalmatus</i>	01
	<i>Stercorarius antarcticus</i>	01
	<i>Charadrius collaris</i>	01
	<i>Sterna trudeaui</i>	01
	<i>Stercorarius parasiticus</i>	01
	<i>Stercorarius sp.</i>	01
Ordem Procellariiformes	<i>Puffinus puffinus</i>	278
	<i>Procellaria sp.</i>	01
	<i>Procellaria aequinoctialis</i>	37
	<i>Procellaria cinerea</i>	01
	<i>Puffinus gravis</i>	26
	<i>Calonectris diomedea borealis</i>	22
	<i>Thalassarche melanophrys</i>	21
	<i>Calonectris sp.</i>	19
	<i>Calonectris diomedea</i>	09
	<i>Thalassarche chlororhynchos</i>	08
	<i>Puffinus griseus</i>	05
	<i>Pterodroma mollis</i>	05
	<i>Macronectes giganteus</i>	03
	<i>Oceanites oceanicus</i>	02
	<i>Pachyptila sp.</i>	02
	<i>Pachyptila desolata</i>	02
	<i>Pterodroma incerta</i>	02
	<i>Puffinus sp.</i>	02
	<i>Halobaena caerulea</i>	01
	<i>Fulmarus glacialis</i>	01
	<i>Calonectris edwardsii</i>	01
	<i>Pterodroma sp.</i>	01
Ordem Suliformes	<i>Sula leucogaster</i>	195
	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	131
	<i>Fregata magnificens</i>	98
Ordem Pelecaniformes	<i>Phimosus infuscatus</i>	03
	Classe Mammalia	
Grupo taxonômico	Espécie	Número de indivíduos amostrados
Ordem Cetacea	<i>Pontoporia blainvillei</i>	185
Subordem Odontoceti	<i>Sotalia guianensis</i>	130
	<i>Stenella frontalis</i>	23
	<i>Tursiops truncatus</i>	11
	<i>Kogia breviceps</i>	05
	<i>Steno bredanensis</i>	05
	<i>Mesoplodon sp.</i>	01
	<i>Delphinus delphis</i>	03
	<i>Lagenodelphis hosei</i>	03
	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	02
	<i>Stenella longirostris</i>	03

	<i>Stenella attenuata</i>	01
	<i>Grampus griseus</i>	01
	<i>Kogia sima</i>	01
	<i>Phocoena dioptrica</i>	01
	<i>Ziphius sp.</i>	01
Ordem Cetacea	<i>Megaptera novaeangliae</i>	04
Subordem Mysticeti		
	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	02
Ordem Carnivora	<i>Arctocephalus australis</i>	11
	<i>Arctocephalus tropicalis</i>	02
TOTAL: 67 espécies		
TOTAL: 4.361 indivíduos cujas amostras estão disponibilizadas no SIMBA em 31/12/2023		

Todas as 496 amostras coletadas no âmbito do PMP-BS e enviadas para o LABCAI/UFSC no período de referência (janeiro a dezembro de 2023) foram consideradas adequadas para análise de biomarcadores. As amostras estão armazenadas em freezer -80°C.

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 coletadas nos diferentes trechos do PMP-BS.

A distribuição geográfica de ocorrência das amostras das espécies prioritárias de aves (*C. borealis*, *P. puffinus*, *L. dominicanus* e *S. leucogaster*) coletadas no âmbito do PMP-BS e encaminhadas ao LABCAI está indicada na **Figura 8-1**.

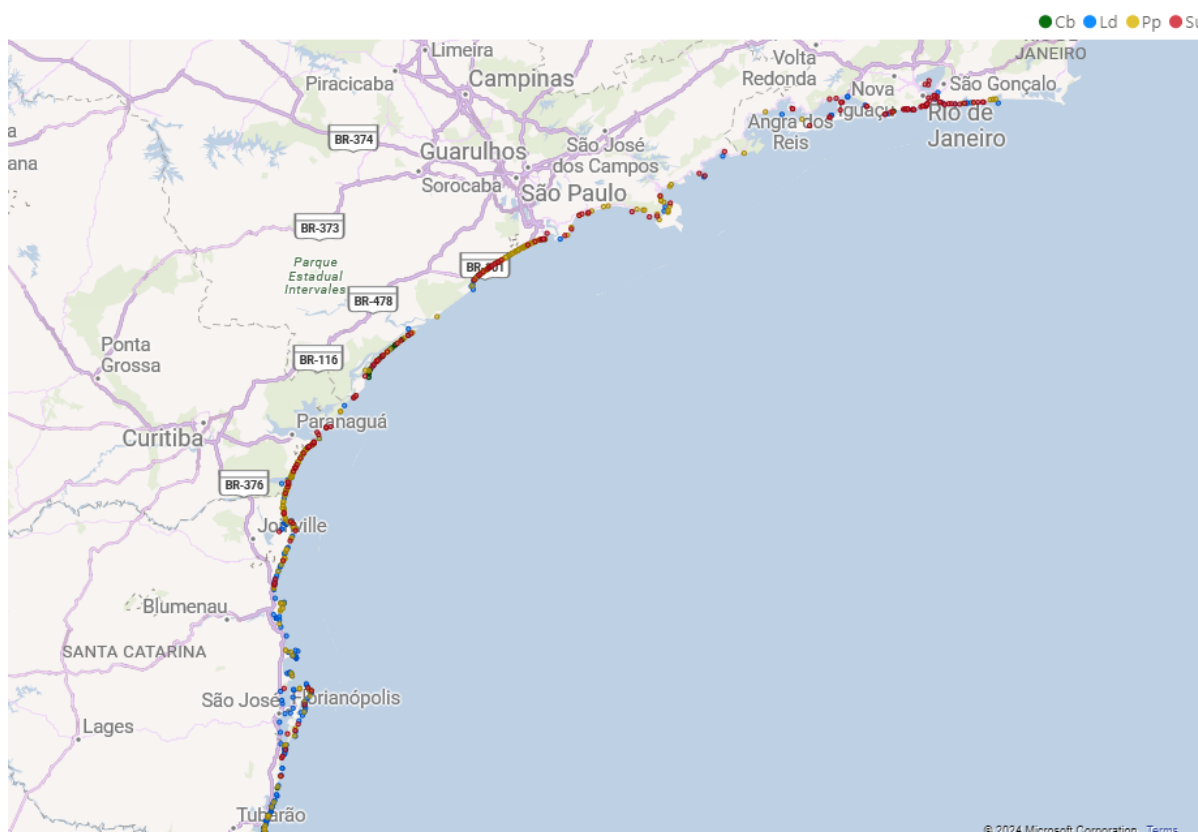


Figura 8-1- Distribuição das ocorrências de carcaças de aves marinhas (cod. 2), a partir das quais foram coletadas amostras de fígado para análises de biomarcadores. Cb, Ld, Pp e Su são as siglas indicadas na legenda para *Calonectris borealis*, *Larus dominicanus*, *Puffinus puffinus* e *Sula leucogaster*, respectivamente.

A distribuição geográfica de ocorrência das amostras das espécies prioritárias de quelônios (*C. caretta* e *C. mydas*) coletadas no âmbito do PMP-BS e armazenadas no LABCAI está indicada na **Figura 8-2**. A distribuição das ocorrências de carcaças de tartaruga *L. olivacea* (cod. 2) estão apresentadas na **Figura 8-3**.

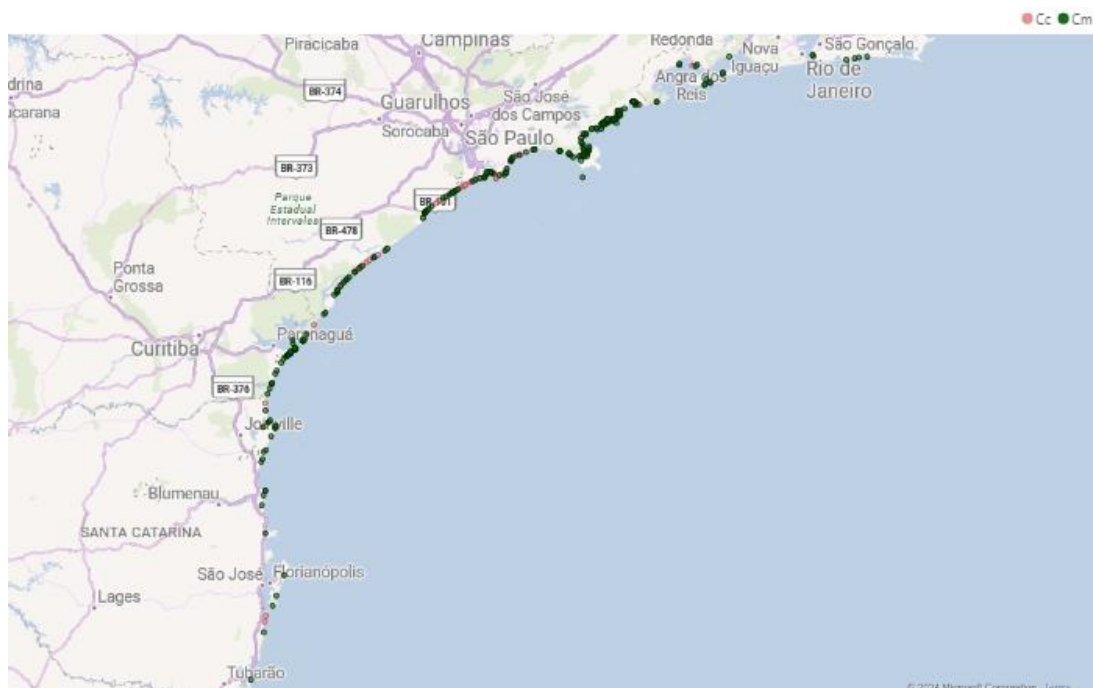


Figura 8-2- Distribuição da ocorrência de quelônios (cod. 2) a partir das quais foram coletadas amostras de fígado para análises de biomarcadores (*Caretta caretta* e *Chelonia mydas*). Cc e Cm são as siglas indicadas na legenda para *C. caretta* e *C. mydas*, respectivamente.

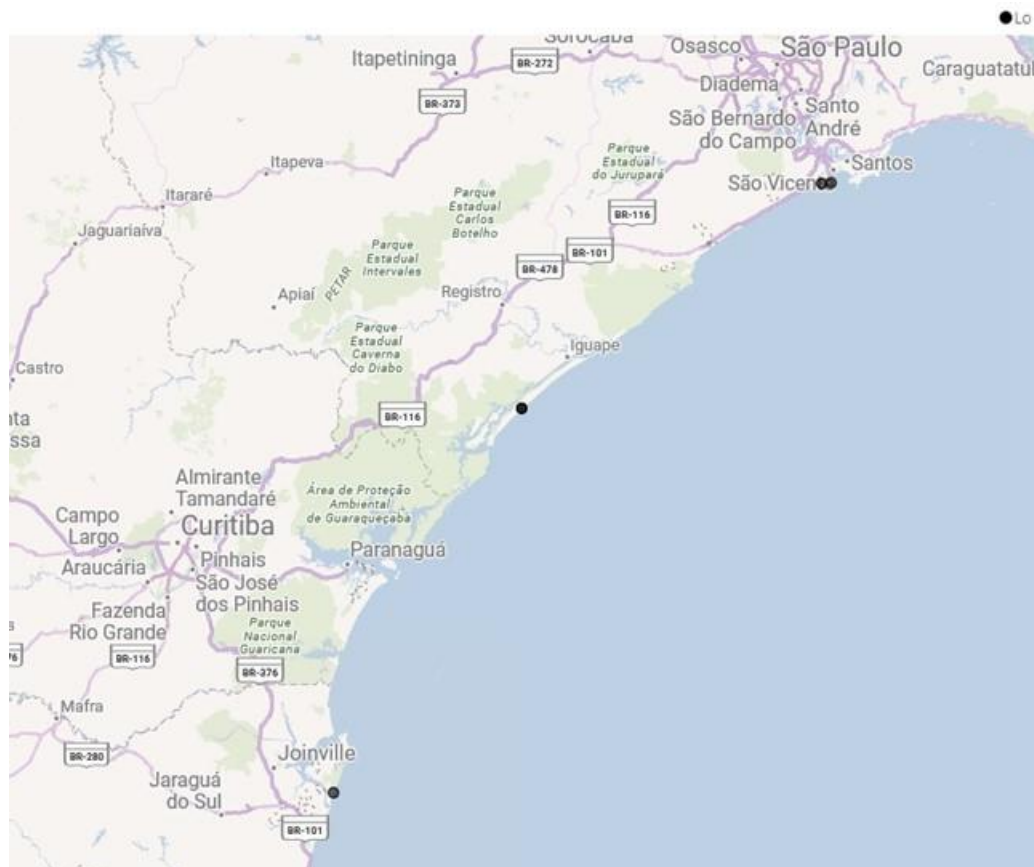


Figura 8-3 - Distribuição das ocorrências de carcaças de *Lepidochelys olivacea* (cod. 2), a partir das quais foram coletadas amostras de fígado para análises de biomarcadores.

A distribuição geográfica de ocorrência de carcaças de cetáceos (*S. guianensis*), cujas amostras de tecido hepático foram coletadas no âmbito do PMP-BS para a análise de biomarcadores, está indicada na **Figura 8-4**.

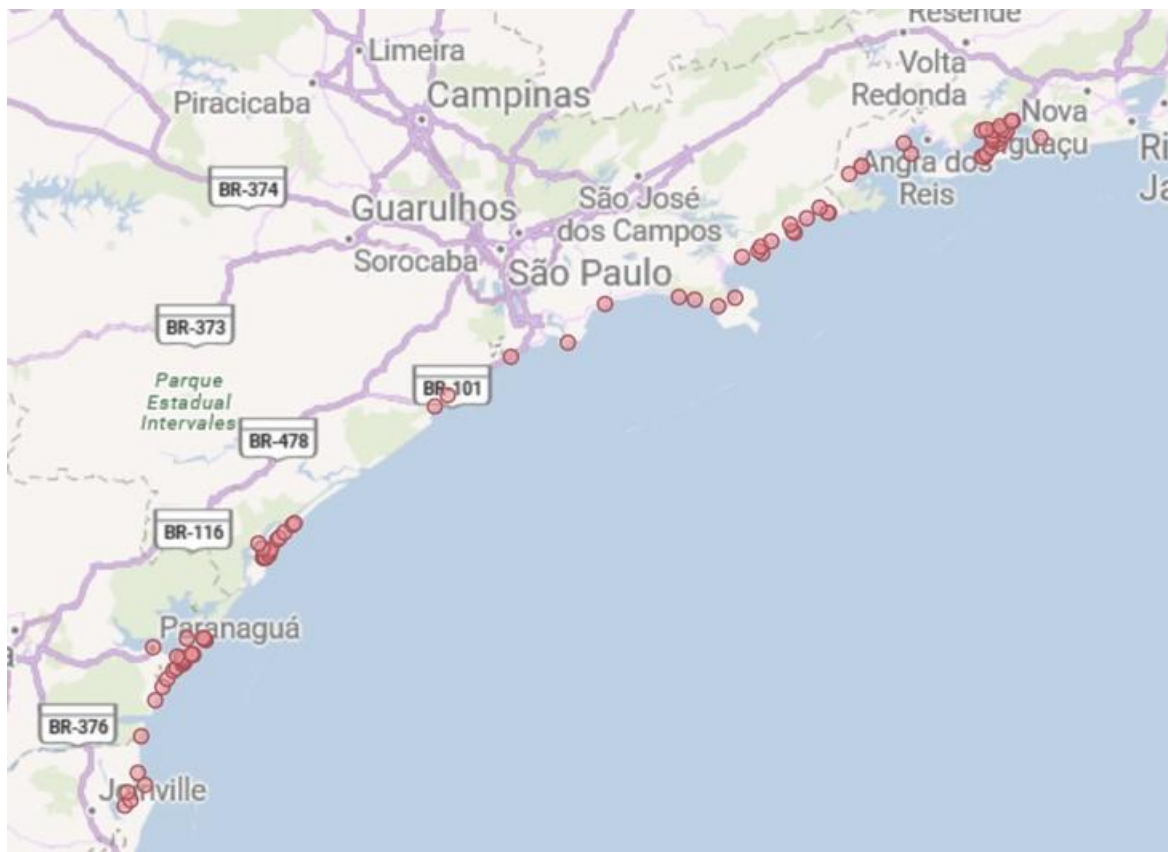


Figura 8-4 - Distribuição das ocorrências de carcaças de boto cinza, *Sotalia guianensis* (cod. 2), a partir das quais foram coletadas amostras de fígado para análises de biomarcadores.

8.3 Padronizações de biomarcadores bioquímicos

As atividades de padronização de análises bioquímicas se estendem além do período de referência (janeiro a dezembro de 2023) e compreendem:

- (a) a padronização do ensaio de atividade da enzima glutathione S-transferase (GST), incluindo o estabelecimento do limite de detecção e a avaliação dos parâmetros reprodutibilidade e repetibilidade deste ensaio em amostras de tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis*;
- (b) a padronização do ensaio de atividade da enzima etoxiresorufina O-deetilase (EROD), incluindo o estabelecimento do limite de detecção e a avaliação dos parâmetros reprodutibilidade e repetibilidade deste

ensaio em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis*;

(c) padronizações bioquímicas para imunodeteção de CYP1A em tecido hepático de *C. borealis* e *S. leucogaster*.

Para as etapas de padronização, foram utilizadas amostras compostas por quantidades iguais de amostras individuais obtidas dos espécimes recebidos no âmbito do PMP-BS. A padronização foi realizada para cada espécie separadamente.

Padronização do método para ensaio de atividade glutathione S-transferase em amostras hepáticas de tetrápodes marinhos

Homogeneização das amostras

Amostras de 100 mg de tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis* 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 do inibidor de proteases PMSF. Os tecidos foram homogeneizados com o homogeneizador TissueTearor™ (BioSpec™). Durante todo o procedimento, as amostras foram mantidas sobre o gelo.

O homogeneizado foi centrifugado a 9.000 xg por 30 minutos a 4°C para obtenção da fração citosólica (fração S9). A preparação da fração microssomal (MIC), que corresponde à membrana do retículo endoplasmático, foi realizada através de uma segunda centrifugação da fração S9 a 100.000 xg por 60 minutos a 4°C com a ultracentrífuga Hitachi CP100WX. A fração sobrenadante desta segunda centrifugação (fração SN) foi acondicionada em novo microtubo e armazenada em ultrafreezer a -80°C e a fração microssomal foi ressuspensa em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4), contendo 1 mM EDTA, 0,1 M KCl e glicerol 20%. A fração sobrenadante (SN) foi utilizada para os ensaios de atividade GST, e a fração MIC foi usada para os ensaios EROD e de quantificação da expressão da proteína CYP1A.

Determinação de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais na fração citosólica (fração SN) das amostras homogeneizadas foi realizada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976). O método utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue (G-250), que reage com os aminoácidos das proteínas, mostrando uma coloração que varia do tom marrom para o azulado. A intensidade da cor da reação aumenta de acordo à medida que existe uma maior concentração de proteínas na amostra.

A determinação de proteínas totais foi realizada com o kit Bio-Rad Protein Assay® (Bio-Rad®) de acordo com as instruções do fabricante. Em uma microplaca com 96 poços foram adicionados, em duplicata, de 0,75 a 1,5 µL de cada amostra e 200 µL do reagente de Bradford filtrado, totalizando um volume final de até 201,5 µL. Após incubação de cinco minutos, foi realizada uma leitura simples das amostras a 595 nm, utilizando o espectrofotômetro de placas SpectraMax® M5 (Molecular Devices®). As absorbâncias das amostras foram comparadas a uma curva padrão de albumina sérica bovina produzida no mesmo ensaio das amostras. A concentração de proteínas totais foi expressa em mg.mL⁻¹.

Determinação das condições de ensaio da atividade glutational s-transferase

Para determinar as condições do ensaio GST em tecido hepático, foram construídas duas curvas de cinética enzimática para cada espécie. As curvas cinéticas foram utilizadas para determinar os parâmetros cinéticos de velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten aparente (K_{mapp}) para os substratos CDNB e GSH. A determinação da atividade GST seguiu o método descrito por Habig et al. (1974) com modificações para microplaca, onde o *pool* de amostras (i.e. amostra composta) foi incubado a 30 °C (quelônios) ou 37 °C (aves e mamíferos) com 100 µL do meio de GSH. Após a incubação por 5 minutos, 100 µL do meio de CDNB foi adicionado à reação e a formação do produto GS-DNB foi acompanhada

durante 5 minutos em 340 nm no espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices®). Para ambos os ensaios, foi utilizado um *pool* formado a partir de volumes iguais de frações sobrenadantes das amostras previamente homogeneizadas de cada uma das espécies (**Tabela 8-1**).

Primeiramente, foram realizados os ensaios de atividade GST com uma concentração fixa de CDNB (1 mM) e concentrações crescentes de GSH (0,0117; 0,0234; 0,0469; 0,0938; 0,1875; 0,375; 0,75; 1,5; 3 e 6 mM). Para quelônios, foi incluída uma concentração adicional de 8 mM de GSH. Uma segunda curva de cinética enzimática da GST foi construída com concentração fixa de GSH no meio de reação, determinada a partir dos cálculos de cinética enzimática da primeira curva (2 mM para *C. borealis* e 2,5 mM para *S. leucogaster*, *S. guianensis*, *C. caretta* e *L. olivacea*) e concentrações crescentes de CDNB (0,00244; 0,00488; 0,00976; 0,0195; 0,0390; 0,0781; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25 e 2,5 mM). A concentração final de etanol no ensaio foi de 7,5%. Para obtenção de K_{mapp} e V_{max} , ambas as curvas de cinética enzimática foram submetidas à regressão não linear com a equação de Michaelis-Menten por meio do programa GraphPad Prism 9.4.

A atividade GST foi calculada com a fórmula:

$$mU.mgprt^{-1} = (mAbs.min) \times (Vol.total)/(Vol.amostra) \times (mg.prt) \times \varepsilon$$

Onde,

mU.mgprt⁻¹ = atividade GST por massa (mg) de proteína

mAbs.min = taxa de formação de GS-DNB ($\varepsilon = 9,6 \text{ mM.cm}^{-1}$)

Vol. total = volume total da reação

Vol. amostra = volume da amostra

mg.prt = concentração de proteína em mg.mL^{-1}

ε = coeficiente de extinção molar

Estabelecimento do limite de detecção e do intervalo ótimo de quantificação para ensaio de atividade glutatona s-transferase

1) Estabelecimento do limite de detecção teórico

O **limite de detecção teórico** é definido como a média do valor do sinal do branco ($mAbs.min^{-1}$) somadas a duas vezes o desvio padrão (DP). Acima desse

valor, a diferença é considerada estatisticamente significativa em relação ao branco ($p < 0,05$) (GAGNÉ, 2014). O limite de detecção teórico da atividade GST em *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis* foi estabelecido com base em uma octuplicata de brancos com tampão de homogeneização, submetidas às condições ótimas de ensaio definidas a partir dos experimentos descritos na seção anterior e seguindo metodologia previamente descrita. O cálculo da média e do desvio padrão foi realizado com base nos valores de $\text{mAbs} \cdot \text{min}^{-1}$.

2) Estabelecimento do intervalo ótimo de quantificação do método

Além da determinação do **limite de detecção teórico**, foi realizado um ensaio de atividade GST com concentrações crescentes de amostras, de 0,625 a 80 μg de proteínas totais nas condições padronizadas do ensaio para cada uma das espécies. Essa curva não é propriamente uma curva de calibração, pois a massa endógena de GST na amostra de proteínas totais do fígado não é conhecida (i.e., não há padrão puro). Entretanto, a variação do sinal da GST ($\text{mAbs} \cdot \text{min}^{-1}$) é proporcional à massa de proteínas totais, pois a GST é uma proteína. A vantagem do uso dessa matriz complexa é incluir na avaliação da metodologia o efeito da matriz.

Esse ensaio permite determinar o **limite de detecção operacional da metodologia** a ser utilizado em futuras análises. O limite de detecção operacional da metodologia é baseado na relação linear entre o sinal do biomarcador e a massa de proteínas (i.e. inclinação da reta); a ruptura da linearidade no limite inferior da reta, mas acima do limite de detecção teórico, mostra o **limite de detecção operacional da metodologia** e a ruptura da linearidade no limite superior da reta indica o **limite superior de quantificação**. Entre esses dois limites está o **intervalo ótimo de quantificação** no qual a relação $\text{mAbs} \cdot \text{min}^{-1}$ varia linearmente com a massa de proteínas da amostra. Portanto, nesse ensaio é avaliada a linearidade da relação entre a massa de proteínas e os valores de $\text{mAbs} \cdot \text{min}^{-1}$ por meio de uma análise de regressão linear. Os valores de $\text{mAbs} \cdot \text{min}^{-1}$ abaixo do limite de detecção operacional da metodologia ou acima do limite superior de quantificação não devem

representar fielmente valores de atividade das amostras avaliadas. Desta forma, análises futuras devem considerar apenas valores de $\text{mAbs} \cdot \text{min}^{-1}$ entre esses dois limites (GAGNÉ, 2014).

Tais limites estabelecidos são válidos para futuras análises na mesma matriz tecidual e sob as mesmas condições de ensaio. Os valores de $\text{mAbs} \cdot \text{min}^{-1}$ que se situarem dentro do intervalo ótimo de quantificação e acima do limite de detecção serão considerados adequados.

Avaliação dos valores de precisão do método para o ensaio de atividade glutational s-transferase

Para garantir a obtenção de dados confiáveis, é necessário que o método utilizado seja robusto para assegurar que o mesmo resultado possa ser obtido, independentemente do momento de análise (GAGNÉ, 2014). Portanto, para a avaliação da robustez dos métodos de ensaio de determinação da atividade GST em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis* foram utilizados valores de precisão intra-ensaio (repetibilidade) e entre ensaios (reprodutibilidade). Os testes foram realizados com o *pool* das frações citosólicas obtido após a homogeneização individual das amostras.

Para o estabelecimento dos valores da **precisão da repetibilidade** do ensaio GST foram analisados os valores de absorbância de oito réplicas técnicas de um mesmo *pool* de amostras. Esses ensaios permitem avaliar o erro embutido na análise de uma amostra, decorrente de procedimentos de manipulação das amostras e pipetagem durante o ensaio.

Para o cálculo de **precisão da reprodutibilidade** do ensaio, foram realizados oito experimentos distintos, com reagentes pesados independentemente e meios de reação preparados separadamente, sempre seguindo as condições e procedimentos previamente padronizados para a espécie. Esses ensaios representam, hipoteticamente, a realização de análises em momentos diferentes do presente

trabalho, e permitem avaliar um potencial erro embutido no procedimento de pesagem e preparação de reagentes, além de diferenças na calibração dos equipamentos.

O valor de precisão foi calculado de acordo com Gagné (2014), utilizando a fórmula abaixo:

$$P = 100 - [(dp/md)*100]$$

Sendo,

P = valor de precisão do método

dp = desvio padrão

md = média aritmética

Resultados e discussão da padronização do método para o ensaio de atividade glutational s-transferase

As curvas cinéticas de atividade GST hepático em função do substrato GSH para quelônios mostram visualmente um platô em torno de 2 mM (**Figura 8-5A**), enquanto as curvas de atividade GST em função do substrato CDNB não indicam ocorrência de um platô (**Figura 8-5B**).

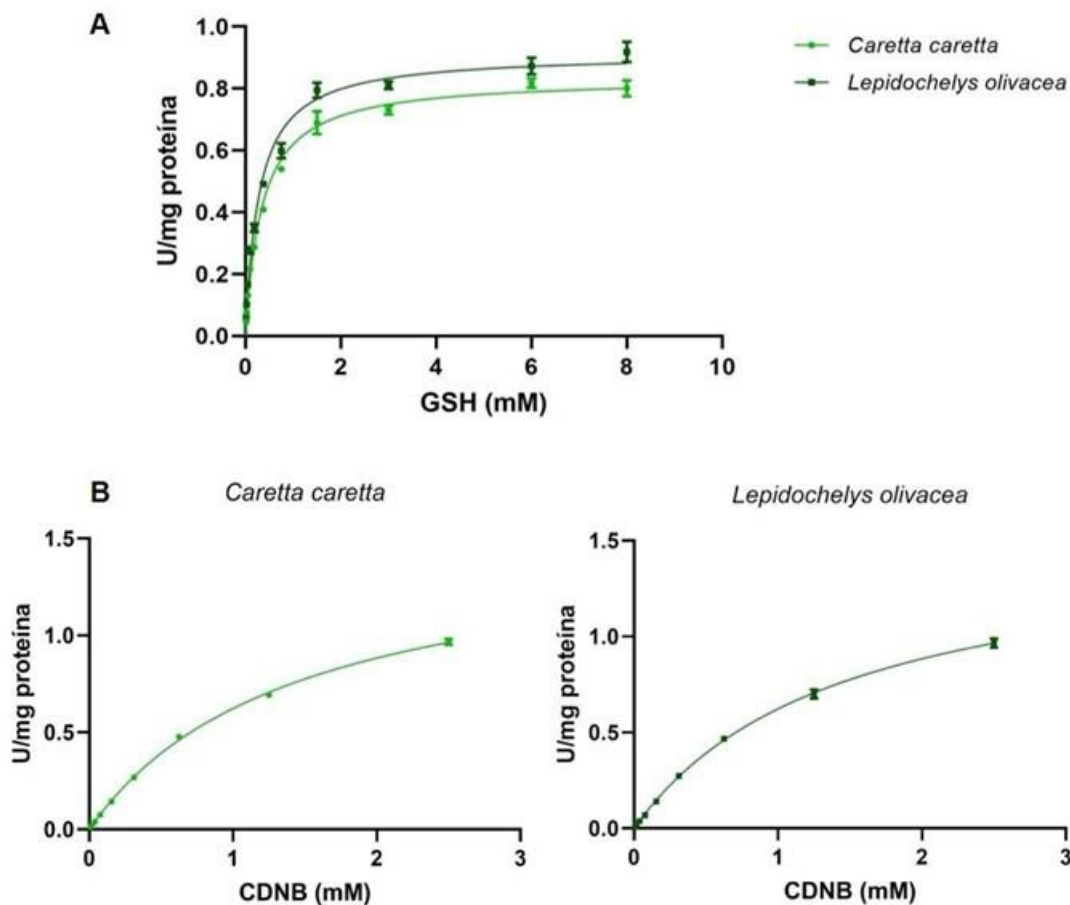


Figura 8-5 - A) Curvas cinéticas de atividade GST em tecido hepático de *Caretta caretta* e *Lepidochelys olivacea* construídas com concentrações crescentes do substrato enzimático glutationa reduzida (GSH). Condições do ensaio: CDNB 1 mM, tampão fosfato de potássio (0, 1 M, pH 7,0), 30°C. B) Curvas cinéticas de atividade GST em tecido hepático de *C. caretta* e *L. olivacea* construídas com concentrações crescentes do substrato enzimático 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Condições do ensaio: GSH 2,5 mM, tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), 30°C. K_m e V_{max} obtidos por meio de regressão não linear dos dados ajustados ao modelo de Michaelis-Menten.

Para *S. leucogaster*, *C. borealis* e *S. guianensis*, as curvas cinéticas de atividade GST hepático em função do substrato GSH também mostraram visualmente um platô em torno de 2 mM (**Figura 8-6A**). Por outro lado, similarmente ao observado para quelônios, as curvas cinéticas de atividade GST em função do substrato CDNB para *S. leucogaster*, *C. borealis* e *S. guianensis* (**Figura 8-6B**) não sugerem um platô, indicando que a concentração máxima utilizada ainda não seria saturante.

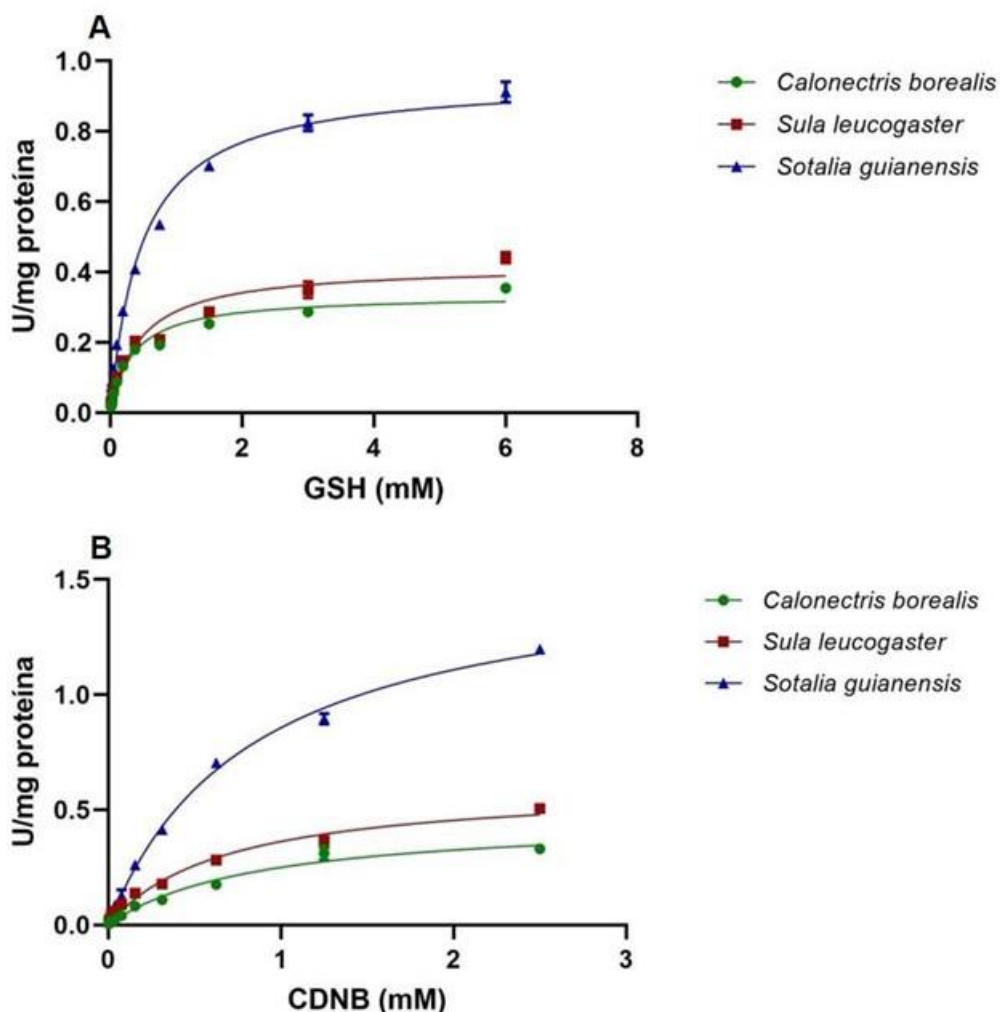


Figura 8-6 A) Curvas cinéticas de atividade GST em tecido hepático de *Calonectris borealis*, *Sula leucogaster* e *Sotalia guianensis* construídas com concentrações crescentes do substrato enzimático glutationa reduzida (GSH). Condições do ensaio: CDNB 1 mM, tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), 37°C. B) Curvas cinéticas de atividade GST em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis* construídas com concentrações crescentes do substrato enzimático 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Condições do ensaio: GSH 2 mM (*C. borealis*), 2,5 mM (*S. leucogaster* e *S. guianensis*), tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), 37°C. K_{mapp} e V_{max} obtidos por meio de regressão não linear dos dados ajustados ao modelo de Michaelis-Menten.

Os valores de K_{mapp} e V_{max} obtidos por meio de regressão não linear dos dados ajustados ao modelo de Michaelis-Menten para o substrato GSH são apresentados na **Tabela 8-3**.

Tabela 8-3 - Valores de K_{mapp} e V_{max} para o substrato glutatona reduzida (GSH) utilizado no ensaio de atividade glutatona S-transferase (GST) em tecido hepático de *Calonectris borealis*, *Sula leucogaster*, *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea*, e *Sotalia guianensis*.

Cinética enzimática – GST (substrato GSH)		
Espécie	K_{mapp} (mM)	V_{max} (U/mg proteína)
<i>Calonectris borealis</i>	0,3459	0,3342
<i>Sula leucogaster</i>	0,4510	0,4179
<i>Caretta caretta</i>	0,3495	0,8355
<i>Lepidochelys olivacea</i>	0,2878	0,9133
<i>Sotalia guianensis</i>	0,4722	0,9502

Os valores de K_{mapp} e V_{max} obtidos por meio de regressão não linear dos dados ajustados ao modelo de Michaelis-Menten para o substrato CDNB são apresentados na **Tabela 8-4**.

Tabela 8-4 - Valores de K_{mapp} e V_{max} para o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) utilizado no ensaio de atividade glutatona S-transferase (GST) em tecido hepático de *Calonectris borealis*, *Sula leucogaster*, *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea*, e *Sotalia guianensis*.

Cinética enzimática – GST (substrato CDNB)		
Espécie	K_{mapp} (mM)	V_{max} (U/mg proteína)
<i>Calonectris borealis</i>	0,8600	0,4648
<i>Sula leucogaster</i>	0,6791	0,6083
<i>Caretta caretta</i>	1,4360	1,5170
<i>Lepidochelys olivacea</i>	1,4470	1,5230
<i>Sotalia guianensis</i>	0,8330	1,5700

Para enzimas que se ajustam ao modelo de Michaelis-Menten, concentrações ótimas para o ensaio enzimático podem ser estimadas a partir dos K_m aparentes (K_{mapp}) obtidos para ambas as curvas cinéticas. Wilkinson (1971) recomenda que para o estabelecimento de condições de ensaio enzimático, o substrato seja utilizado em concentrações de cinco a dez vezes o valor de K_m .

Com base nessas diretrizes, na avaliação gráfica e nos valores de K_m estimados nesse estudo, sugere-se a utilização do substrato GSH em concentrações de 2 mM para *C. borealis* e 2,5 mM para *S. leucogaster*, *S. guianensis*, *C. caretta* e *L. olivacea*.

Em relação ao substrato CDNB, a concentração final de etanol necessária para solubilizar o reagente CDNB e atingir a concentração requerida de substrato seria maior que 7,5% de etanol. Essa concentração é superior aos 5% de etanol utilizado

nos ensaios de Keen, Habig e Jakoby (1976) e Habig e Jakoby (1981) e poderia inibir a própria atividade GST. Dessa forma, para todas as espécies avaliadas, a concentração de CDNB sugerida para os ensaios é a máxima possível, de 2,5 mM.

Além da determinação das concentrações ideais de substratos, os ensaios aqui descritos também permitiram determinar os limites de detecção teórico e operacional do método, bem como avaliar os valores de precisão intra e entre ensaios.

Com base nas oito réplicas técnicas do branco, foi possível determinar o limite de detecção teórico do ensaio de atividade GST para *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis*. Esse limite de detecção teórico indica que qualquer valor abaixo do limite de detecção teórico pode ser confundido tecnicamente com o branco de reação (**Tabela 8-5**).

Tabela 8-5 - Valores de detecção teórico (mABS/min), intervalo de quantificação (mABS/min) e valor de precisão intra-ensaio (repetibilidade) e entre ensaios (reprodutibilidade) para as espécies *Calonectris borealis*, *Sula leucogaster*, *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea* e *Sotalia guianensis*.

Limites de detecção – GST				
Espécie	Limite teórico (mABS/min)	Intervalo de quantificação (mABS/min)	Repetibilidade (%)	Reprodutibilidade (%)
<i>Calonectris borealis</i>	136,85	145,28 – 793,34	96,39	90,54
<i>Sula leucogaster</i>	183,41	195,07 – 940,05	95,62	87,62
<i>Caretta caretta</i>	157,79	297,26 – 1939,29	97,11	88,34
<i>Lepidochelys olivacea</i>	156,87	163,41 – 1969,83	95,88	88,40
<i>Sotalia guianensis</i>	183,41	208,20 – 751,49	94,87	90,32

O ensaio com massa crescente de proteína mostrou a existência de relação linear entre 2,5 e 40 µg de proteínas totais ($r^2 = 0,98$) para *C. caretta* (**Figura 8-7 A**) e entre 0,625 e 40 µg de proteínas totais ($r^2 = 0,98$) para *L. olivacea* (**Figura 8-7 B**). Para aves e mamíferos, o ensaio com massa crescente de proteína mostrou a existência de relação linear entre 0,625 e 40 µg de proteínas totais ($r^2 = 0,99$) para *C. borealis* (**Figura 8-7 C**), entre 1,25 e 40 µg de proteínas totais ($r^2 = 0,99$) para *S. leucogaster* (**Figura 8-7 D**) e entre 0,625 e 10 µg de proteínas totais ($r^2 = 0,99$) para *S. guianensis* (**Figura 8-7 E**).

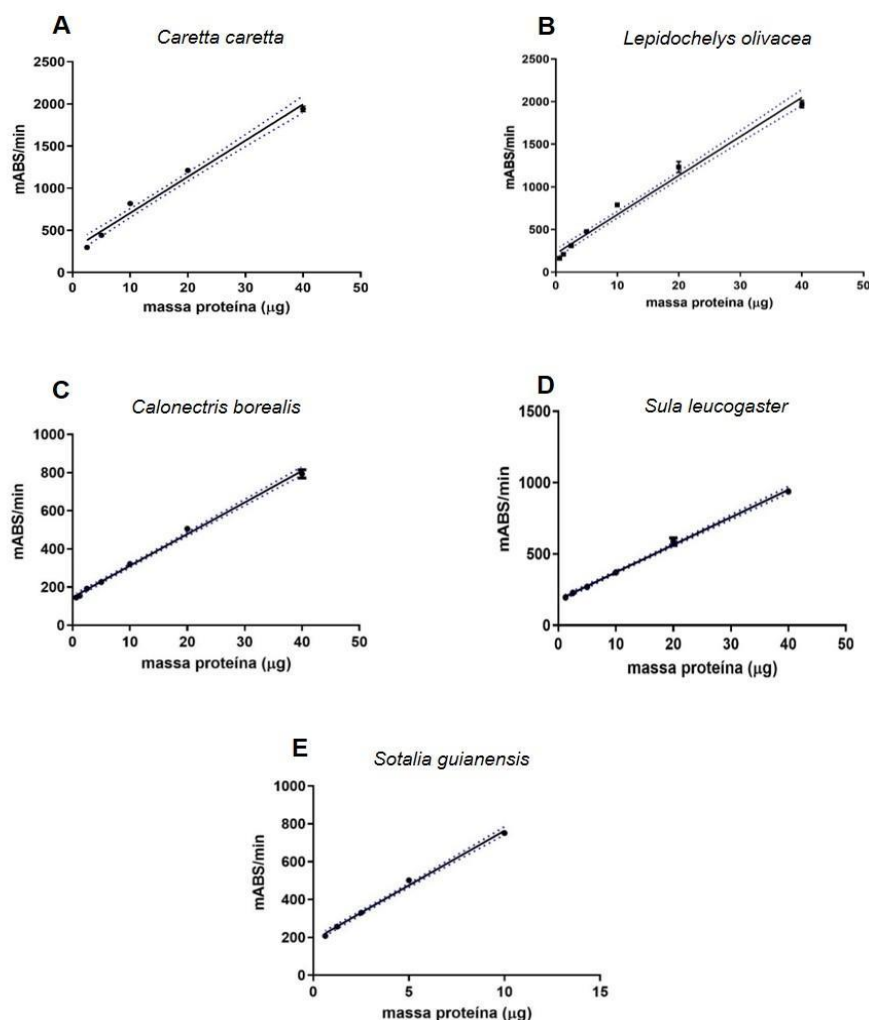


Figura 8-7 Relação entre a absorbância por minuto (mABS/min) em decorrência da formação do conjugado GS-DNB e a massa de proteínas totais (μg) de tecido hepático de A) *Caretta caretta*, B) *Lepidochelys olivacea*, C) *Calonectris borealis*, D) *Sula leucogaster* e E) *Sotalia guianensis*. Linha sólida representa regressão linear, com intervalo de confiança (95%) representado por linhas pontilhadas azuis.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios descritos acima, foram propostos limites teóricos e operacionais de quantificação (**Tabela 8-6**). Além do estabelecimento dos limites de detecção teóricos e operacionais, os ensaios desenvolvidos permitiram identificar os valores de precisão intra-ensaio (repetibilidade) e os valores de precisão entre ensaios (reprodutibilidade) (**Tabela 8-6**). Em geral, estudos hematológicos e imunológicos consideram valores de precisão intra-ensaio acima de 90% e entre ensaios acima de 85% satisfatórios (COZMA et al., 2015). Assim, os valores de precisão obtidos para os ensaios de atividade GST em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis* foram considerados satisfatórios.

Com base nas etapas e resultados de padronização descritas acima, as condições finais de ensaio para a determinação de atividade GST em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis* são apresentadas na **Tabela 8-6**.

Tabela 8-6 Condições ótimas de ensaio para determinação de atividade GST em tecido hepático de *Calonectris borealis*, *Sula leucogaster*, *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea* e *Sotalia guianensis*.

Condições finais de ensaio – GST					
Espécie	Tampão	GSH (mM)	CDNB (mM)	Massa proteína (μg)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
<i>Calonectris borealis</i>	Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0	2,0	2,5	10	37
<i>Sula leucogaster</i>	Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0	2,5	2,5	10	37
<i>Caretta caretta</i>	Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0	2,5	2,5	10	30
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0	2,5	2,5	10	30
<i>Sotalia guianensis</i>	Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0	2,5	2,5	5	37

Padronização do ensaio para quantificação da atividade etoxiresorufina o-deetilase em tecido hepático de tetrápodes marinhos

Homogeneização das amostras

Amostras de 100 mg de tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis* foram homogeneizados. A fração microssomal (MIC) foi utilizada para a análise de atividade EROD.

Determinação de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas na fração MIC das amostras foi realizada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Determinação das condições de ensaio da atividade etoxiresorufina o-deetilase

A determinação de atividade EROD foi realizada no espectrofluorímetro SpectraMax® M5 (Molecular Devices®), utilizando microplacas pretas (Perkin Elmer). Resumidamente, o *pool* de amostras de cada espécie foi incubado com 140 µL de 7- etoxiresorufina (7-ER) por 10 min a 30°C para *C. caretta* e *L. olivacea* e a 37°C para *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis* (WHITE et al., 1994; CHANG; WAXMAN, 2006; WANWIMOLRUK; WANWIMOLRUK, 2006). Após a incubação, 40 µL de NADPH foram adicionados em cada poço para iniciar a reação. O protocolo foi adaptado de Burke e Mayer (1974). O par de excitação e emissão (ex/em) foi ajustado para 530nm/585nm com filtro (*cutoff*) em 550 nm e fotomultiplicador ajustado no nível alto (High) para *C. caretta* e *L. olivacea* e no nível intermediário (*medium*) para *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis* para otimizar a detecção de resorufina. A reação foi monitorada por até 20 min e o coeficiente angular da reta RFU.min⁻¹ foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática.

Para a determinação dos parâmetros V_{max} e K_m relativo ao substrato 7-ER, foram realizados ensaios de atividade EROD com concentração fixa de NADPH (1 mM) e concentrações crescentes de 7-ER (0,015625; 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 μ M – para *C. caretta* e *L. olivacea*; 0,003906; 0,007813; 0,015625; 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; e 8 μ M – para *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis*). A curva de cinética enzimática foi avaliada por meio de regressão não linear com as equações de Michaelis-Menten e do modelo de inibição por substrato, usando o programa GraphPad Prism 9.4.

Para avaliar o efeito da coenzima NADPH, foram utilizadas concentrações fixas de 7-ER, determinadas a partir dos resultados de cálculos de cinética enzimática da curva de 7-ER (*C. caretta* [2 μ M], *L. olivacea* [2,5 μ M], *C. borealis* [2,5 μ M], *S. leucogaster* [1,25 μ M] e *S. guianensis* [0,85 μ M]) e concentrações crescentes de NADPH (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mM).

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 massa de proteína ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), usando a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade EROD} = \frac{(\text{RFU} \times \text{min}^{-1}) \times (\text{coef. resorufina})}{\text{mg proteína}}$$

Estabelecimento do limite de detecção e do intervalo ótimo de quantificação para ensaio de atividade etoxiresorufina o-deetilase

1) Estabelecimento do limite de detecção teórico

O **limite de detecção teórico** das condições de ensaio para tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis* foi estabelecido com base nos valores dos brancos, conforme descrito por Gagné (2014). Segundo o autor, o limite de detecção teórico pode ser calculado como o valor médio dos brancos somado a duas vezes o desvio padrão.

O valor médio de brancos foi calculado com base em uma octuplicata de brancos com tampão de microssoma, submetidas às condições ótimas de ensaio definidas a partir dos experimentos descritos na seção anterior e seguindo a metodologia previamente descrita. A formação do produto resorufina foi acompanhada durante 60 min no espectrofotômetro (SpectraMax® M5, Molecular Devices®) e a leitura foi feita a 30°C para *C. caretta* e *L. olivacea* e 37°C para *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis*. O cálculo de média e desvio padrão foi realizado com base nos valores de mRFU.min⁻¹.

2) Estabelecimento do intervalo ótimo de quantificação do método

Além da determinação do **limite de detecção teórico**, foi realizado um ensaio de atividade EROD com concentrações crescentes de amostras, abrangendo um intervalo de 20 a 150 µg de proteínas microssomais para *C. caretta* e *L. olivacea*, de 1,25 a 80 µg de proteínas microssomais para as espécies *S. leucogaster* e *S. guianensis* e de 5 a 100 µg de proteínas microssomais para *C. borealis* sob as condições de ensaio padronizadas previamente. Essa não é propriamente uma curva de calibração, pois a massa endógena de CYP1A na amostra de proteínas totais do fígado não é conhecida (*i.e.* não há padrão puro). Entretanto, a variação do sinal da EROD (mRFU.min⁻¹) é proporcional à massa de proteínas totais, pois o CYP1A é uma proteína. A vantagem do uso dessa matriz complexa é incluir na avaliação da metodologia o efeito da matriz.

Esse ensaio permite determinar o **limite de detecção operacional da metodologia** a ser utilizado em futuras análises. O limite de detecção operacional da metodologia é baseado na relação linear entre o sinal do biomarcador e a massa de proteínas. Mais especificamente, a ruptura da linearidade no limite inferior da reta, mas acima do limite de detecção teórico, mostra o **limite de detecção operacional da metodologia** e a ruptura da linearidade no limite superior da reta indica o **limite superior de quantificação**. Entre esses dois limites está o **intervalo ótimo de quantificação**, em que a relação mRFU.min⁻¹ varia linearmente com a massa de

proteínas da amostra. Portanto, nesse ensaio é avaliada a linearidade da relação entre a massa de proteínas e os valores de mRFU.min⁻¹ por meio de uma análise de regressão linear. Os valores de mRFU.min⁻¹ abaixo do limite de detecção operacional da metodologia e acima do limite superior de quantificação não devem representar fielmente valores de atividade das amostras avaliadas. Desta forma, análises futuras devem considerar apenas valores de mRFU.min⁻¹ entre esses dois limites (GAGNÉ, 2014). O critério de linearidade foi o parâmetro r^2 acima de 0,97. Na regressão linear, os pontos que implicavam desvio da linearidade para abaixo de 0,97 foram excluídos do intervalo ótimo de quantificação.

Tais limites estabelecidos são válidos para futuras análises na mesma matriz tecidual e sob as mesmas condições de ensaio. Desta forma, valores de fluorescência que se situarem dentro do intervalo ótimo de quantificação e acima do limite de detecção serão considerados adequados.

Avaliação dos valores de precisão do método para o ensaio de atividade etoxiresorufina o-deetilase

A obtenção de dados confiáveis requer uma robustez do método utilizado, independentemente do momento de análise (GAGNÉ, 2014). Portanto, para avaliar a robustez dos métodos de ensaio de determinação da atividade EROD em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis* foram utilizados valores de precisão intra-ensaio (repetibilidade) e entre ensaios (reprodutibilidade). Para o cálculo da **precisão da repetibilidade**, os testes foram realizados com o *pool* das frações microssomais obtido após a homogeneização individual das amostras.

Para estabelecimento dos valores da **precisão da repetibilidade** do ensaio EROD foram analisados os valores de fluorescência de oito réplicas técnicas de um mesmo *pool* de amostras. Esses ensaios permitem avaliar o erro embutido na análise de uma amostra, decorrente de procedimentos de manipulação das amostras e

pipetagem durante o ensaio. O ensaio foi realizado seguindo as condições já determinadas para a espécie e os protocolos padronizados.

Para o cálculo da **precisão da reprodutibilidade** do ensaio, foram realizados oito experimentos distintos com reagentes pesados de forma independente e meios de reação preparados separadamente, sempre seguindo as condições e procedimentos previamente padronizados para cada espécie. Esses ensaios representam, hipoteticamente, a realização de análises em momentos diferentes do presente trabalho e permitem avaliar um potencial erro embutido no procedimento de pesagem e preparação de reagentes, além de diferenças na calibração dos equipamentos.

O valor de precisão foi calculado de acordo com Gagné (2014), utilizando a fórmula abaixo:

$$P = 100 - [(dp/md)*100]$$

Sendo,

P = valor de precisão do método

dp = desvio padrão

md = média aritmética

Resultados e discussão da padronização do método para o ensaio de atividade etoxiresorufina o-deetilase

A **Figura 8-8** apresenta a curva cinética de atividade EROD em função do substrato 7-ER para as cinco espécies padronizadas. Para *C. caretta*, é possível observar uma diminuição da atividade da enzima em concentrações de 7-ER acima de 2 µM (**Figura 8-8A**). Embora o modelo de Michaelis-Menten seja amplamente utilizado para estudos de cinética enzimática, o resultado da cinética de atividade EROD em *C. caretta* se ajustou melhor ao modelo de inibição por substrato. Similarmente, o resultado da cinética de atividade EROD em *L. olivacea* também se ajustou melhor ao modelo de inibição por substrato, embora a diminuição da

atividade EROD em concentrações altas de 7-ER não seja tão evidente (**Figura 8-8B**).

Para *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis*, é possível observar uma diminuição da atividade da enzima em concentrações de 7-ER acima de 2 µM, sendo o modelo de inibição por substrato também mais apropriado para descrever a cinética enzimática nestas três espécies (**Figura 8-8C, D, E**).

O cálculo da concentração ótima para substratos que se ajustaram ao modelo de inibição por substrato utiliza a fórmula $\sqrt{K_m \times K_i}$, embora também sejam utilizadas análises empíricas através da visualização gráfica. Com base na fórmula citada anteriormente, a concentração ótima de 7-ER para ensaios futuros de atividade EROD é de: *C. caretta* - 2,65 µM, *L. olivacea* - 5,5 µM, *C. borealis* - 2,5 µM, *S. leucogaster* - 1,25 µM e *S. guianensis* - 0,85 µM.

No entanto, para *C. caretta*, a partir de 2 µM já não há um incremento na atividade com o aumento de substrato. Assim, para evitar utilizar uma concentração de 7-ER muito próxima do ponto de inversão, em que começa a ocorrer inibição por substrato, optou-se por estabelecer a concentração de 2 µM para futuros ensaios de atividade EROD em *C. caretta*. De maneira similar, em *L. olivacea*, não há um incremento na atividade após a concentração de 2,5 µM, optando-se por estabelecer 2,5 µM para futuros ensaios de atividade EROD nessa espécie.

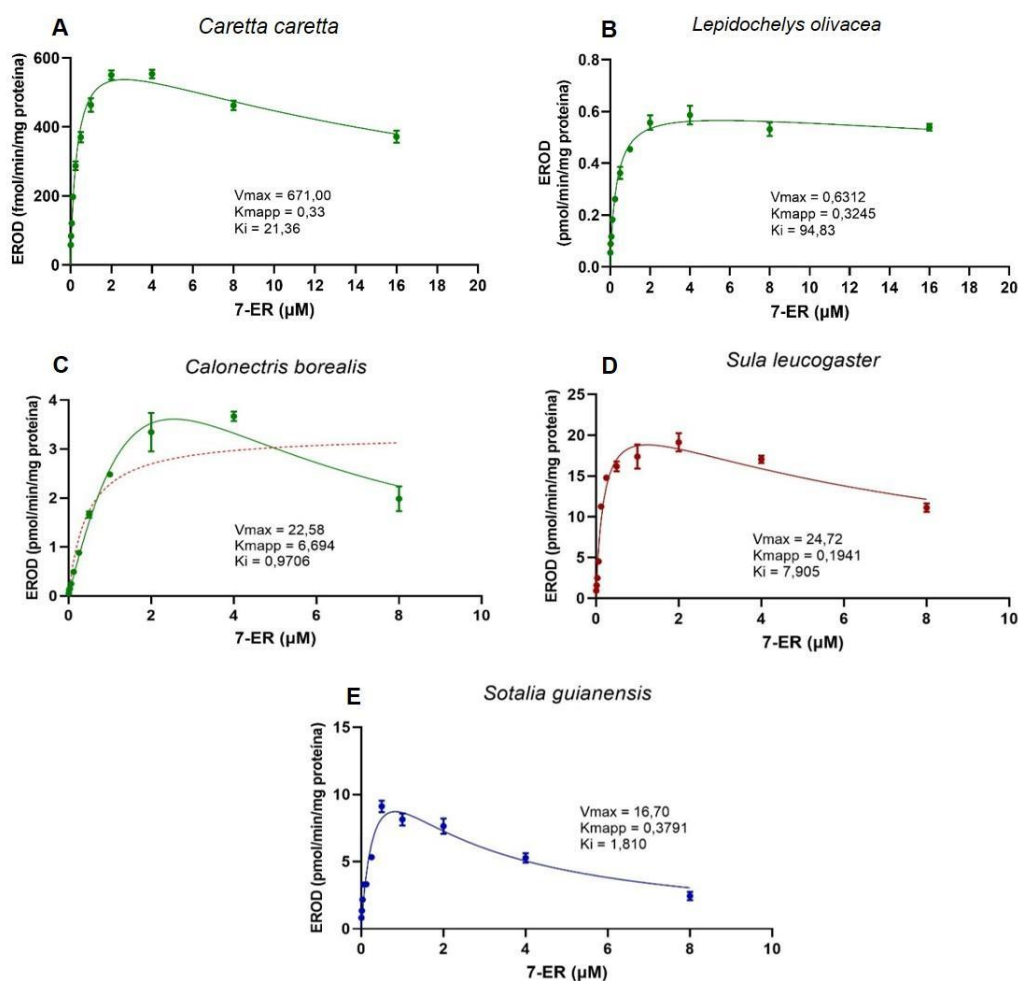
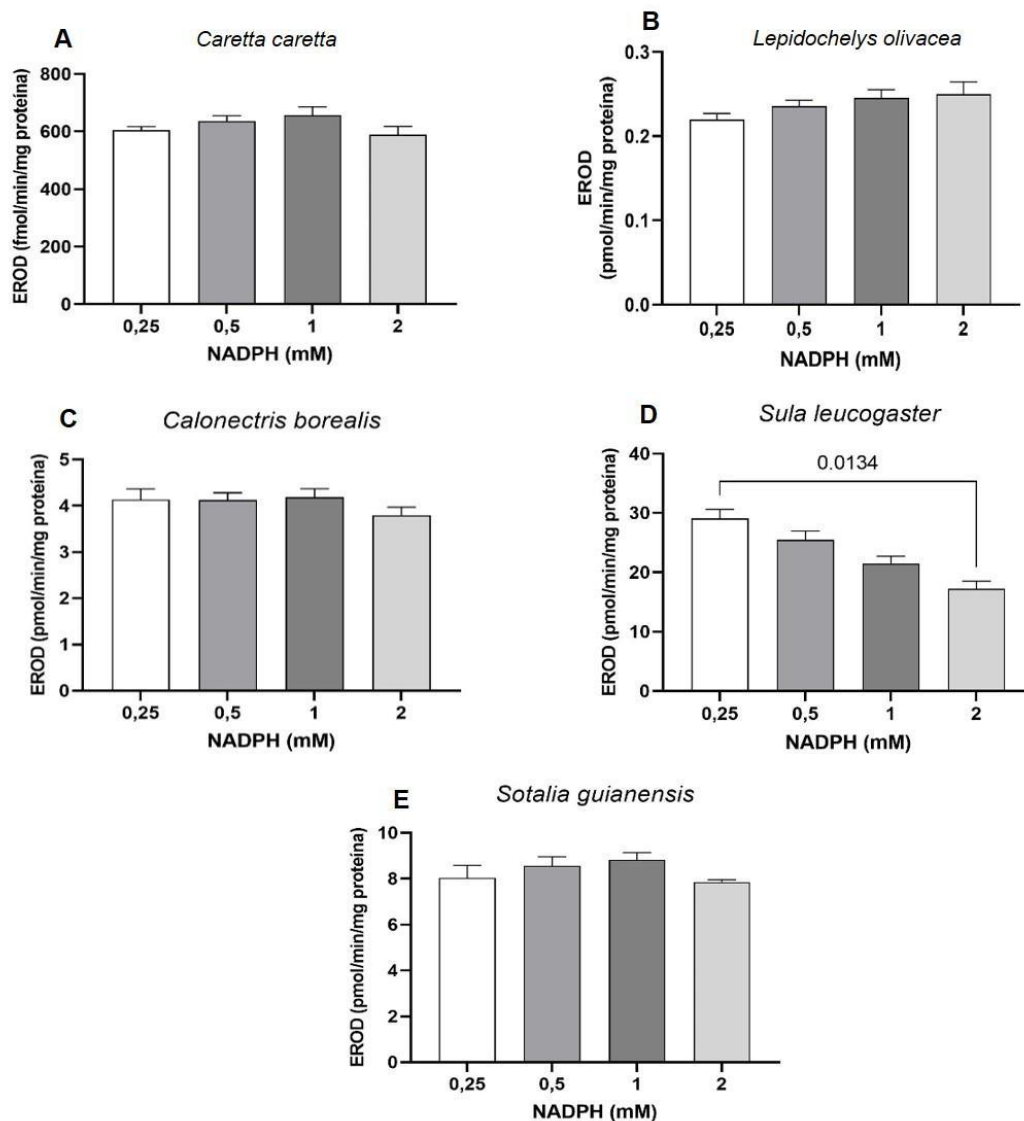


Figura 8-8 (A) Curva cinética de atividade EROD em tecido hepático de A) *Caretta caretta*, B) *Lepidochelys olivacea*, C) *Calonectris borealis*, D) *Sula leucogaster* e E) *Sotalia guianensis* construída com concentrações crescentes do substrato 7-etoxiresorufina (7-ER), sendo K_{mapp} e V_{max} obtidos por meio de regressão não linear dos dados ajustados ao modelo de inibição por substrato. A V_{max} calculada pelo programa é a V_{max} estimada na ausência de inibição por substrato.

No ensaio com concentrações crescentes de NADPH, os resultados mostraram que não houve diferença significativa nos valores de atividade EROD hepática de *C. caretta*, *L. olivacea*, *C. borealis* e *S. guianensis* (**Figura 8-9**). Para *S. leucogaster*, houve uma redução significativa no valor médio de atividade EROD quando foi

utilizado 2 mM de NADPH em comparação com a atividade média no ensaio com 0,25 mM.

Figura 8-9 Efeito de diferentes concentrações de NADPH na atividade EROD em tecido



hepático de (A) *Caretta caretta*, (B) *Lepidochelys olivacea*, (C) *Calonectris borealis*, (D) *Sula leucogaster* e (E) *Sotalia guianensis*. Média \pm DP calculados com base em réplicas técnicas.

Com base nestes resultados, sugere-se a utilização de NADPH em concentração final de 0,5 mM nos ensaios futuros de quantificação de atividade EROD em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis*, evitando assim a utilização das concentrações extremas (0,25 mM e 2 mM) e otimizando a quantidade de reagente utilizado.

Além da determinação das concentrações ideais de substratos, foram determinados os limites de detecção teórico e operacional da técnica, bem como os valores de precisão intra e entre ensaios. A partir das oito réplicas técnicas do branco, foi possível determinar o limite de detecção teórico do ensaio de atividade EROD em tecido hepático das cinco espécies (**Tabela 8-7**). Esse limite de detecção teórico indica que qualquer valor abaixo do estimado pelo limite pode ser confundido tecnicamente com o branco de reação.

Tabela 8-7 Valores de detecção teórico (mRFU/min), intervalo de quantificação (mRFU/min) e valor de precisão intra-ensaio (repetibilidade) e entre ensaios (reprodutibilidade) do ensaio EROD em tecido hepático de *Calonectris borealis*, *Sula leucogaster*, *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea* e *Sotalia guianensis*.

Limites de detecção – EROD				
Espécie	Limite teórico (mRFU/min)	Intervalo de quantificação (mRFU/min)	Repetibilidade (%)	Reprodutibilidade (%)
<i>Calonectris borealis</i>	51,77	104,41 – 2.892,58	93,22	94,35
<i>Sula leucogaster</i>	38,06	116,12 – 14.559,25	90,88	92,78
<i>Caretta caretta</i>	189,16	257,18 – 544,27	96,45	96,94
<i>Lepidochelys olivacea</i>	183,59	272,96 – 994,41	91,41	94,54
<i>Sotalia guianensis</i>	26,57	513,80 – 3.988,96	94,90	96,37

Além da definição do limite teórico, o ensaio com massa crescente de proteína mostrou a existência de relação linear entre a carga de proteínas e valor de mRFU/min entre 20 e 150 µg de proteínas microssomais para *C. caretta* e *L. olivacea* ($r^2 = 0,98$ e $0,99$, respectivamente), entre 10 e 100 µg ($r^2 = 0,99$) para *C. borealis*, entre 2,5 e 80 µg ($r^2 = 0,99$) para *S. leucogaster*, e entre 10 e 80 µg de proteínas ($r^2 = 0,99$) para *S. guianensis* (**Figura 8-10**).

No entanto, para *C. caretta* e *L. olivacea* os valores de mRFU/min abaixo de 40 µg de proteínas foram menores que o limite de detecção teórico. Com base nos resultados descritos acima, foram definidos os limites de quantificação em mRFU/min para cada uma das espécies (**Tabela 8-7**).

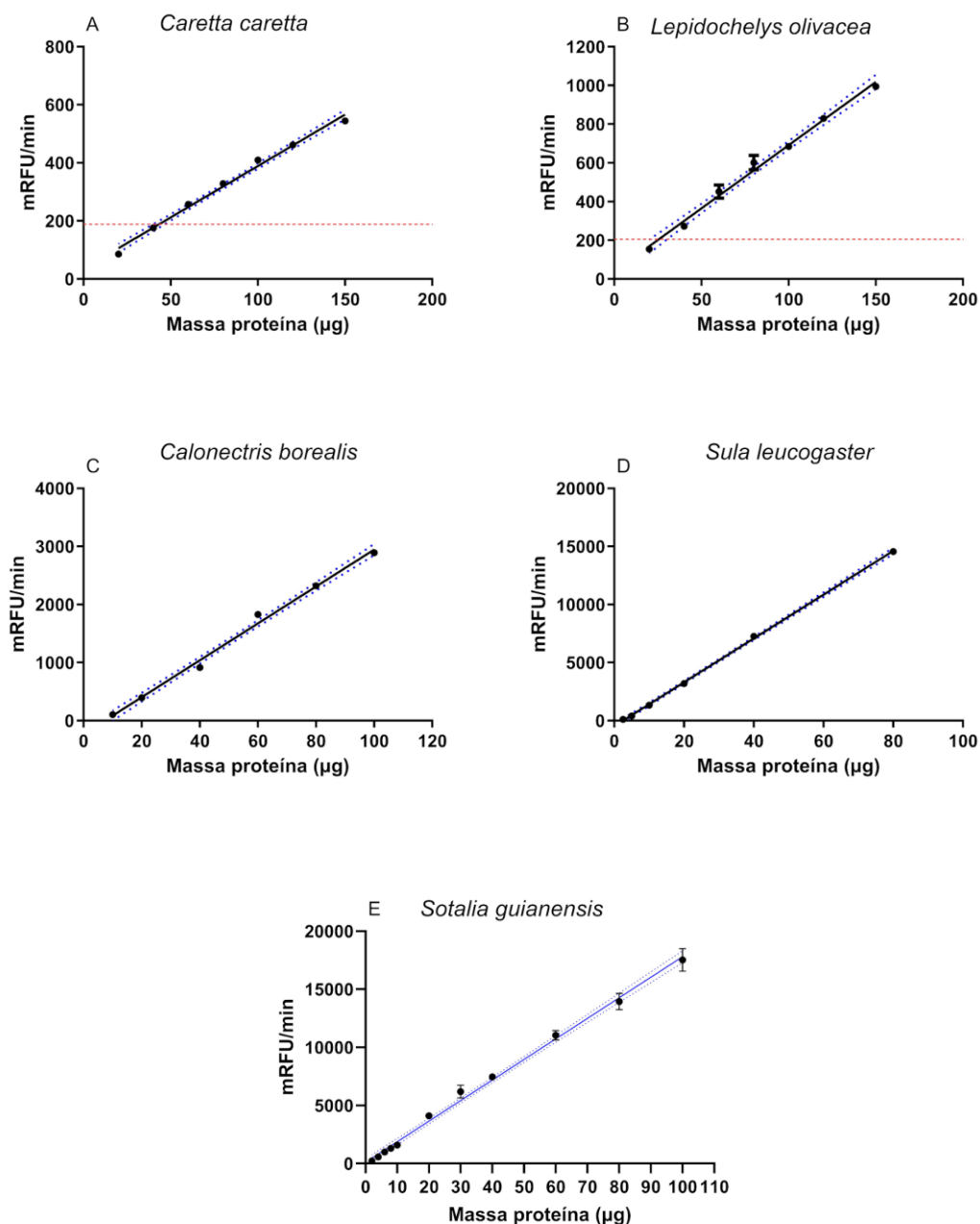


Figura 8-10 Relação entre a fluorescência por minuto (mRFU/min) em decorrência da formação da resorufina e a massa de proteínas microssomais (µg) de tecido hepático de (A) *Caretta caretta*, (B) *Lepidochelys olivacea*, (C) *Calonectris borealis*, (D) *Sula leucogaster* e (E) *Sotalia guianensis*. Linha sólida representa regressão linear, com intervalo de confiança (95%) representado por linhas pontilhadas azuis.

Além do estabelecimento dos limites de detecção teóricos e operacionais, também foi possível determinar os valores de precisão intra-ensaio (repetibilidade) nas três espécies analisadas (**Tabela 8-7**). Em geral, estudos hematológicos e imunológicos consideram satisfatórios valores de precisão intra-ensaio acima de 90% e entre ensaios acima de 85% (COZMA et al., 2015). Dessa forma, os valores de precisão obtidos para os ensaios de atividade EROD em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis* foram considerados satisfatórios.

Com base nas etapas e resultados de padronização descritas anteriormente, as condições finais de ensaio para a quantificação de atividade EROD em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis* são apresentadas na **Tabela 8-8**.

Tabela 8-8 Condições ótimas de ensaio para quantificação de atividade EROD em tecido hepático de *Calonectris borealis*, *Sula leucogaster*, *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea* e *Sotalia guianensis*.

Condições finais de ensaio EROD					
Espécie	Tampão	NADPH (mM)	7-ER (µM)	Massa proteína (µg)	Temperatura (°C)
<i>Calonectris borealis</i>	Tris 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4	0,5	2,50	40	37
<i>Sula leucogaster</i>	Tris 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4	0,5	1,25	20	37
<i>Caretta caretta</i>	Tris 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4	0,5	2	100	30
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Tris 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4	0,5	2,50	100	30
<i>Sotalia guianensis</i>	Tris 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4	0,5	0,85	20	37

Padronização do ensaio para imunodetecção de cyp1a em tecido hepático de tetrápodes marinhos

A imunodetecção da proteína CYP1A, através da técnica de *Western blotting*, é considerada um importante biomarcador de exposição a HPAs e outros contaminantes orgânicos, sendo comumente avaliada em diversos organismos marinhos (BACHMAN et al., 2015; WILSON et al., 2007). O método se baseia na imobilização da amostra em uma membrana de nitrocelulose seguida da formação

de um complexo antígeno-anticorpo específico para a proteína que se deseja quantificar (CYP1A). Neste projeto, a detecção do complexo antígeno-anticorpo específico é realizada por quimioluminescência, cujo procedimento seguiu as instruções do sistema *V3 Western Workflow* (Bio-Rad).

A padronização do método foi realizada em três etapas principais. Primeiramente, foi avaliada a reatividade dos anticorpos disponíveis no LABCAI, UFSC, já utilizados com sucesso para *L. dominicanus* e *P. puffinus*, com as proteínas CYP1A de *C. borealis* e *S. leucogaster*. Da mesma forma, foi testada a reatividade dos anticorpos em tecido hepático de *S. guianensis*, utilizando-se os mesmos anticorpos empregados para a imunodetecção de CYP1A em tecido tegumentar de cetáceos amostrados no âmbito do Projeto de Monitoramento de Cetáceos da Bacia de Santos (PMC-BS).

Em uma segunda etapa, os anticorpos suficientemente reativos foram utilizados para estabelecer a massa ideal de proteína microssomal em futuros ensaios. Por fim, foram testadas combinações variadas de concentrações dos anticorpos primário e secundário para otimizar as concentrações ideais de cada anticorpo a serem utilizadas nos ensaios futuros.

Os procedimentos detalhados da padronização do método de imunodetecção de CYP1A em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis* são apresentados nas seções seguintes.

Homogeneização das amostras

Para padronização da técnica de *Western blotting* foram utilizadas frações microssomais, obtidas conforme procedimento apresentado. A fração MIC obtida de cada indivíduo foi utilizada para a formação de um *pool*, que foi utilizado para as análises de imunodetecção de CYP1A.

Determinação de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas na fração MIC dos *pools* de *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis* foi realizada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976), seguindo o procedimento.

Teste de reatividade de anticorpos primários

A quantificação dos níveis de CYP1A em tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis* foi realizada pela técnica de *Western blotting*.

Resumidamente, o procedimento da técnica é dividido em quatro etapas: 1) separação de proteínas através de 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 (imunodeteção); e 4) revelação e fotodocumentação da membrana, evidenciando a proteína de interesse.

Para o teste de reatividade de anticorpos primários, inicialmente, 20 µg de proteínas microssomais do *pool* de amostras de *C. borealis* e *S. leucogaster*, e 10 µg de proteínas microssomais do *pool* de amostras de *S. guianensis*, foram submetidas à eletroforese, realizada em voltagem constante de 300 V por 30 min ou até que as amostras atingissem 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 das amostras. As membranas foram bloqueadas *overnight* (~15 h) em solução de bloqueio.

Após a lavagem das membranas, as mesmas foram incubadas por 90 min (*C. borealis* e *S. leucogaster*) com o anticorpo primário anti-CYP1A de peixe produzido em coelho (CAYMAN Chemical®, código CP-226) diluído em 1:5.000 ou 60 min (*S. guianensis*) com o anticorpo primário anti-CYP1A de camundongo produzido em cabra (Abcam, código ab126887) na concentração de 0,15 µg/mL.

As membranas foram novamente lavadas e subsequentemente incubadas por 90 min (*C. borealis* e *S. leucogaster*) ou 60 min (*S. guianensis*) com o anticorpo secundário anti-coelho (Amersham®, código RPN2108) diluído na proporção 1:25.000 ou com o anticorpo secundário anti-cabra (Abcam, código 205723) na concentração de 0,1 µg/mL, respectivamente.

A detecção das proteínas foi realizada pelo método de quimioluminescência, no qual as membranas incubadas com o anticorpo secundário foram expostas a uma solução do kit comercial Clarity Max™ Western ECL Substrate (Bio-Rad®).

Determinação da massa de proteínas a ser utilizada no ensaio

Para determinação da massa de proteínas microssomais para detecção de CYP1A em tecido hepático das aves marinhas e de *S. guianensis*, foram testadas concentrações crescentes de proteínas totais variando de 2,5 a 60 µg.

O procedimento foi realizado de acordo com o descrito no item III.3.3, utilizando os mesmos anticorpos nas mesmas concentrações, uma vez que estas condições se mostraram apropriadas para detecção de CYP1A em *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis*.

Determinação das concentrações ótimas de anticorpos primário e secundário

Para determinação das concentrações ótimas para os anticorpos primário e secundário, foram testadas nove combinações de concentrações, de acordo com as **Tabela 8-9** e **Tabela 8-10**.

Tabela 8-9 - Resumo das combinações de concentrações de anticorpos primário e secundário testadas para imunodeteção de CYP1A em tecido hepático de *Calonectris borealis* e *Sula leucogaster*.

Combinações de anticorpos primário e secundário		
Nº da combinação	[] Anticorpo primário (CAYMAN Chemical®, código CP-226)	[] Anticorpo secundário (anti-coelho; Amersham®, RPN2108)
1	1:5.000	1:12.500
2	1:5.000	1:25.000

3	1:5.000	1:50.000
4	1:7.500	1:12.500
5	1:7.500	1:25.000
6	1:7.500	1:50.000
7	1:10.000	1:12.500
8	1:10.000	1:25.000
9	1:10.000	1:50.000

Tabela 8-10 - Resumo das combinações de concentrações de anticorpos primário e secundário testadas para imunodeteção de CYP1A em tecido hepático de *Sotalia guianensis*.

Combinações de anticorpos primário e secundário		
Nº da combinação	[] Anticorpo primário (Abcam, código ab126887)	[] Anticorpo secundário (anti-cabra; Abcam, código 205723)
1	0,30 µg/mL	0,20 µg/mL
2	0,30 µg/mL	0,10 µg/mL
3	0,30 µg/mL	0,05 µg/mL
4	0,15 µg/mL	0,20 µg/mL
5	0,15 µg/mL	0,10 µg/mL
6	0,15 µg/mL	0,05 µg/mL
7	0,05 µg/mL	0,20 µg/mL
8	0,05 µg/mL	0,10 µg/mL
9	0,05 µg/mL	0,05 µg/mL

O procedimento foi realizado de acordo com o descrito no item 8.4.3, utilizando a concentração de proteína ideal para cada espécie, determinada de acordo com o procedimento apresentado na seção 8.4.4.

Resultados e discussão da padronização do método para a detecção de imunodeteção de *cyp1a* em tetrápodes marinhos

Na primeira etapa de padronização foi realizado o teste de reatividade dos anticorpos primários anti-CYP1A, códigos CP-226 (CAYMAN Chemical®) e ab126887 (Abcam). O teste evidenciou que esses anticorpos primários também são capazes de detectar com considerável especificidade duas bandas proteicas nas amostras de *S. leucogaster*, *C. borealis* e *S. guianensis*, sendo a banda inferior considerada a banda referente ao CYP1A (**Figura 8-11**).

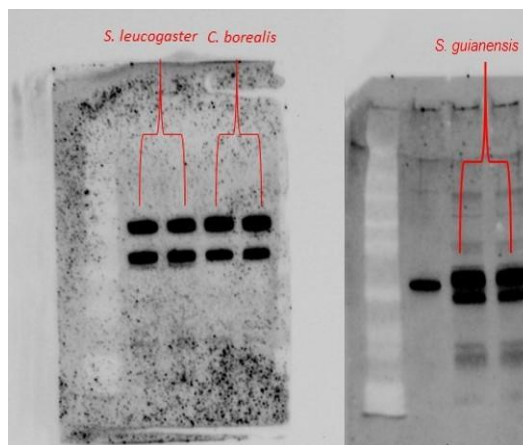


Figura 8-11- Imunodeteção de CYP1A em tecido hepático de *Sula leucogaster* e *Calonectris borealis*, utilizando anticorpo primário CP-226 (CAYMAN Chemical®) e tecido hepático de *Sotalia guianensis*, utilizando anticorpo primário ab126887 (Abcam).

Considerando que os dois anticorpos reagiram de maneira satisfatória com a proteína de interesse (CYP1A), ambos foram utilizados nas mesmas condições na segunda etapa de padronização, que envolveu a determinação de carga ideal de proteínas a ser utilizada nos futuros ensaios.

Para tal, foi primeiramente avaliada a linearidade da relação entre o sinal quimioluminescente e a concentração de proteína utilizada. Para *S. leucogaster*, foi detectado ao menos uma banda nas cargas proteicas testadas, com detecção de uma segunda banda menos reativa quando foi utilizado 10 µg de proteína ou mais (**Figura 8-12**). Na análise da razão entre os valores de sinal quimioluminescente e a carga proteica utilizada, observou-se um aumento linear do sinal até à massa de 20 µg ($r^2 = 0,9852$, **Figura 8-13C**). Acima de 20 µg de proteína, com a inclusão de cargas proteicas mais elevadas no gráfico, observa-se uma curvatura progressiva da reta ($r^2=0,9735$ até $0,9615$), indicando uma saturação do sinal quimioluminescente (**Figura 8-13A, B**). Desta forma, não é recomendada a utilização de concentrações proteicas superiores a 20 µg para imunodeteção de CYP1A em *S. leucogaster*.

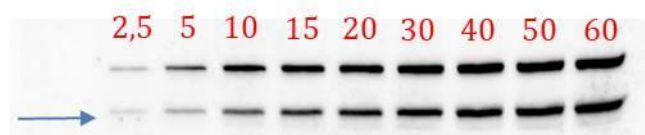


Figura 8-12 *Imunodeteção de CYP1A em tecido hepático de Sula leucogaster utilizando cargas proteicas crescentes, de 2,5 a 60 µg. Banda de interesse sinalizada com uma seta azul.*

Adicionalmente, foi possível observar que a relação entre o sinal da banda quimoluminescente (CYP1A) e o sinal fluorescente na coluna (*lane*), que indica a quantidade de proteína presente, manteve-se estável (em torno de 0,7-0,8) quando foram utilizadas de 5 a 30 µg de proteínas microsossomais (**Figura 8-13 D**). Esse resultado indica que a utilização de massas proteicas dentro dessa faixa permite a correta quantificação de CYP1A nas amostras.

Tendo em vista tais resultados, sugere-se a utilização de 15 µg de proteínas microsossomais para futuros ensaios de imunodeteção de CYP1A em tecido

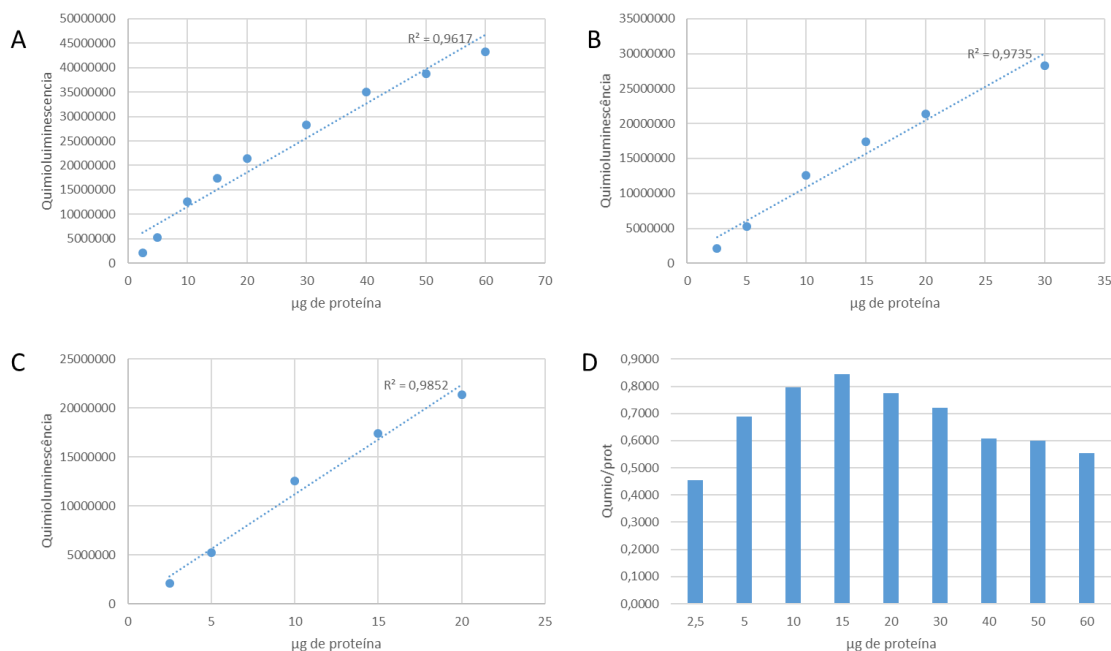
hepático de *S. leucogaster*.

Figura 8-13 Análises gráficas do sinal quimioluminescente emitido e as concentrações de proteínas microssomais utilizadas no ensaio de imunodeteção de CYP1A em amostras hepáticas de *Sula leucogaster*. A) variação do sinal quimioluminescente com a massa de proteínas de 2,5 a 60 µg. B) variação do sinal quimioluminescente com a massa de proteínas de 2,5 a 30 µg. C) variação do sinal quimioluminescente com a massa de proteínas de 2,5 a 20 µg. D) Relação sinal quimioluminescente de CYP1A normalizado pelo sinal fluorescente de proteína total em relação a massa nominal de proteínas aplicada no poço.

Para *C. borealis*, foi detectada ao menos uma banda em todas as massas proteicas testadas (**Figura 8-14**). Na análise da razão entre os valores de sinal quimioluminescente e a massa proteica, observou-se aumento linear do sinal até à massa de 30 µg ($r^2 = 0,9961$, **Figura 8-15 C**). Acima de 30 µg, observa-se uma curvatura progressiva da reta, indicando uma saturação do sinal de quimioluminescência ($r^2 = 0,9923$ até $0,9743$, **Figura 8-15 A, B**). Desta forma, não é recomendada a utilização de massas proteicas superiores a 30 µg para imunodeteção de CYP1A em *C. borealis*.

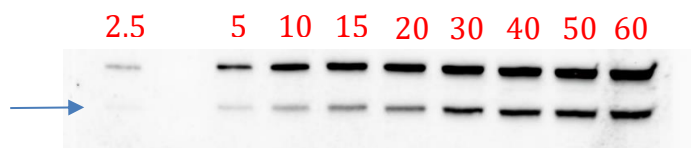


Figura 8-14 Imunodeteção de CYP1A em tecido hepático de *Calonectris borealis*, utilizando cargas proteicas crescentes de 2,5 a 60 µg. Banda de interesse sinalizada com uma seta azul.

Foi possível observar que a relação entre o sinal quimoluminescente e o sinal fluorimétrico, que indica a quantidade de proteína presente na coluna da corrida (*lane*), permaneceu estável na faixa de 0,25 a 0,35 quando foram utilizadas de 15 a 50 µg de proteínas microssomais (**Figura 8-15 C**). Esse resultado indica que a utilização de massas de proteína dentro dessa faixa quantifica corretamente o conteúdo de CYP1A das amostras.

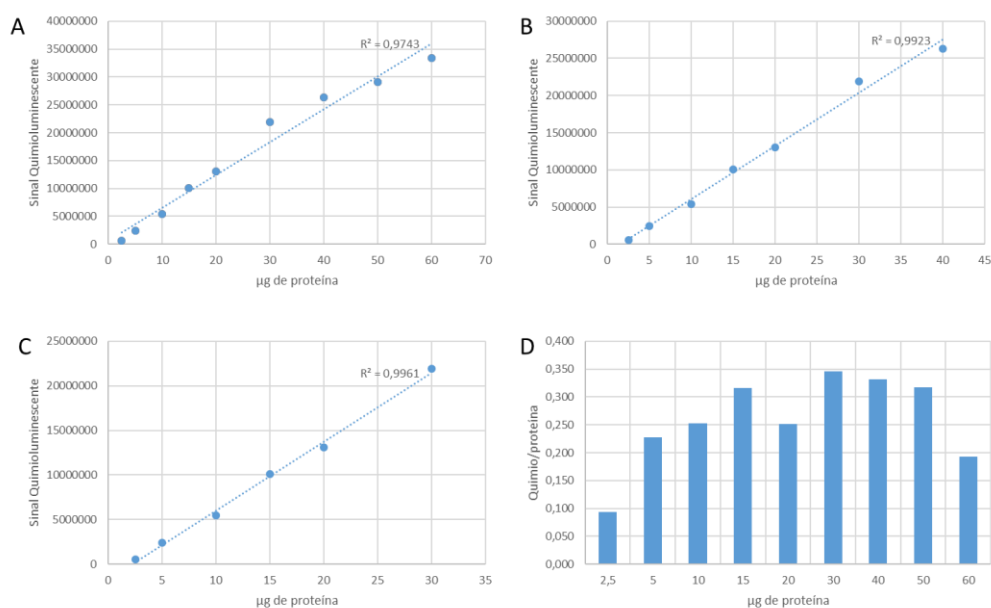


Figura 8-15 - Análises gráficas do sinal quimoluminescente emitido e as cargas de proteínas microssomais utilizadas no ensaio de imunodeteção de CYP1A em amostras hepáticas de *Calonectris borealis*. A) variação do sinal quimoluminescente com a massa de proteínas de 2,5 a 60 µg. B) variação do sinal quimoluminescente com a massa de proteínas de 2,5 a 40 µg. C) variação do sinal quimoluminescente com a massa de proteínas de 2,5 a 30 µg. D) Relação sinal quimoluminescente do CYP1A normalizado pelo sinal fluorescente de proteína total em relação a massa nominal de proteínas aplicada no poço.

Tendo em vista tais resultados, sugere-se a utilização de 25 µg de proteínas microssomais para futuros ensaios de imunodeteção de CYP1A em tecido hepático de *C. borealis*.

Para *S. guianensis*, foram detectadas duas bandas nas cargas proteicas testadas (**Figura 8-16**).

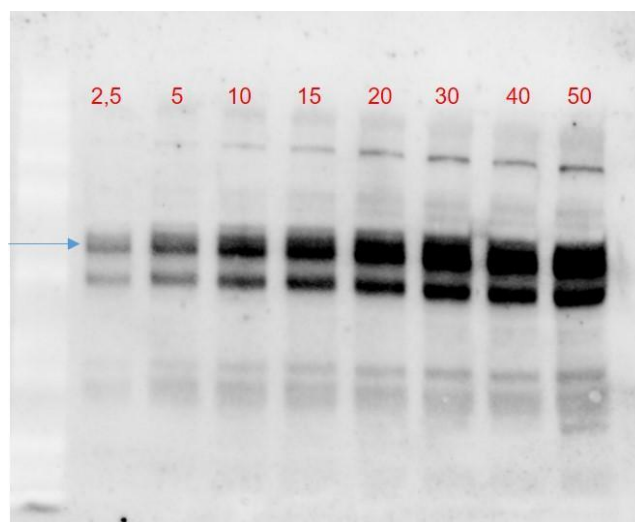


Figura 8-16 - Imunodeteção CYP1A em tecido hepático de *Sotalia guianensis* utilizando cargas proteicas crescentes, de 2,5 a 50 µg. Banda de interesse sinalizada com uma seta azul.

Na análise da razão entre os valores de sinal quimioluminescente e a carga proteica testada, observou-se um aumento linear do sinal até o ponto de 20 µg ($r^2 = 0,9708$, **Figura 8-17 C**). Após este ponto, observamos uma curvatura progressiva da reta ($r^2 = 0,8859$ até $0,8617$) com a inclusão de massas proteicas superiores a 20 µg, indicando uma saturação do sinal quimioluminescente (**Figura 8-17 A, B**). Desta forma, não é recomendada a utilização de concentrações proteicas superiores a 20 µg para imunodeteção de CYP1A em *S. guianensis*.

Adicionalmente, é possível observar que a relação entre o sinal quimioluminescente e o sinal fluorimétrico, que indica a quantidade de proteína presente na coluna de corrida (*lane*), se manteve estável (na faixa de 0,38-0,48) quando foram utilizadas de 2,5 a 15 µg de proteínas microssomais (**Figura 8-17 D**). Este resultado indica que a utilização das demais massas de proteína poderia sub

ou superestimar os níveis de CYP1A presentes na amostra, uma vez que a primeira etapa de cálculo dos níveis da proteína envolve justamente a normalização pelo sinal fluorimétrico.

Tendo em vista os resultados apresentados acima, sugere-se a utilização de 3,5 µg de proteínas microsossomais para futuros ensaios de imunodetecção de CYP1A em tecido hepático de *S. guianensis*.

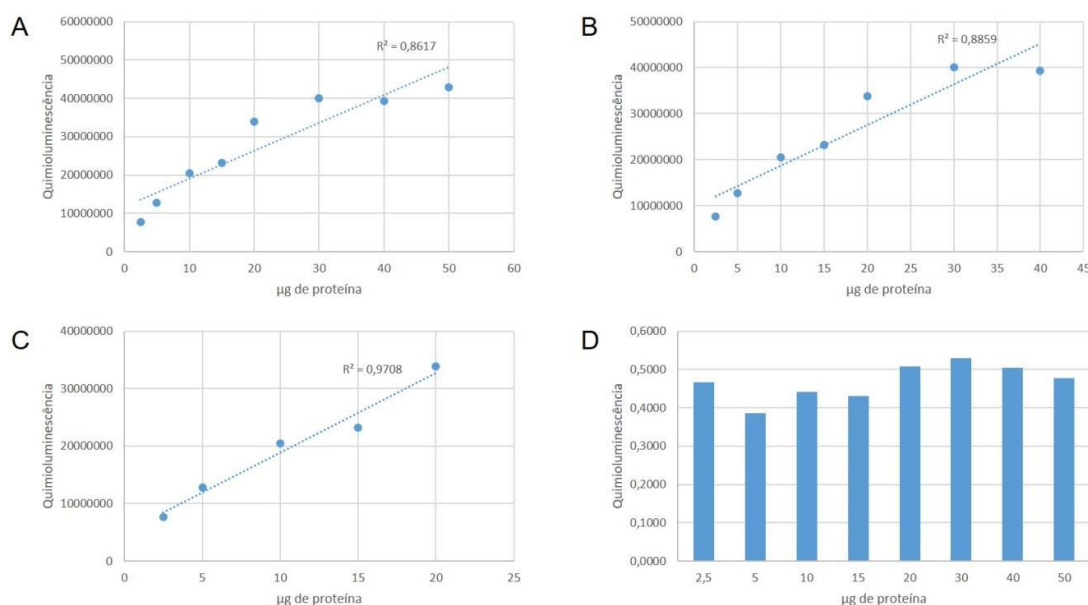


Figura 8-17 - Análises gráficas do sinal quimioluminescente emitido e as cargas de proteínas microsossomais utilizadas no ensaio de imunodetecção de CYP1A em amostra de tecido hepático de *Sotalia guianensis*. A) variação do sinal quimioluminescente com a massa de proteínas de 2,5 a 50 µg. B) variação do sinal quimioluminescente com a massa de proteínas de 2,5 a 40 µg. C) variação do sinal quimioluminescente com a massa de proteínas de 2,5 a 20 µg. D) Relação sinal quimioluminescente do CYP1A normalizado pelo sinal fluorescente de proteína total em relação a massa nominal de proteínas aplicada no poço.

Uma vez determinadas as cargas proteicas ideais, foram avaliadas as diferentes concentrações de anticorpo primário e secundário quanto à intensidade do sinal quimioluminescente e formação de bandas inespecíficas e à intensidade do “background” (**Figura 8-18** e **Figura 8-19**).

Foi observado que para ambas as espécies a membrana D (**Figura 8-18**) apresentou os resultados mais satisfatórios, com menor “background” e maior nitidez da banda específica, sendo, portanto, sugeridas para futuros ensaios em *S.*

leucogaster e *C. borealis* as concentrações de 1:7.500 e 1:12.500 dos anticorpos primário (CP-226) e secundário (RPN2108), respectivamente.

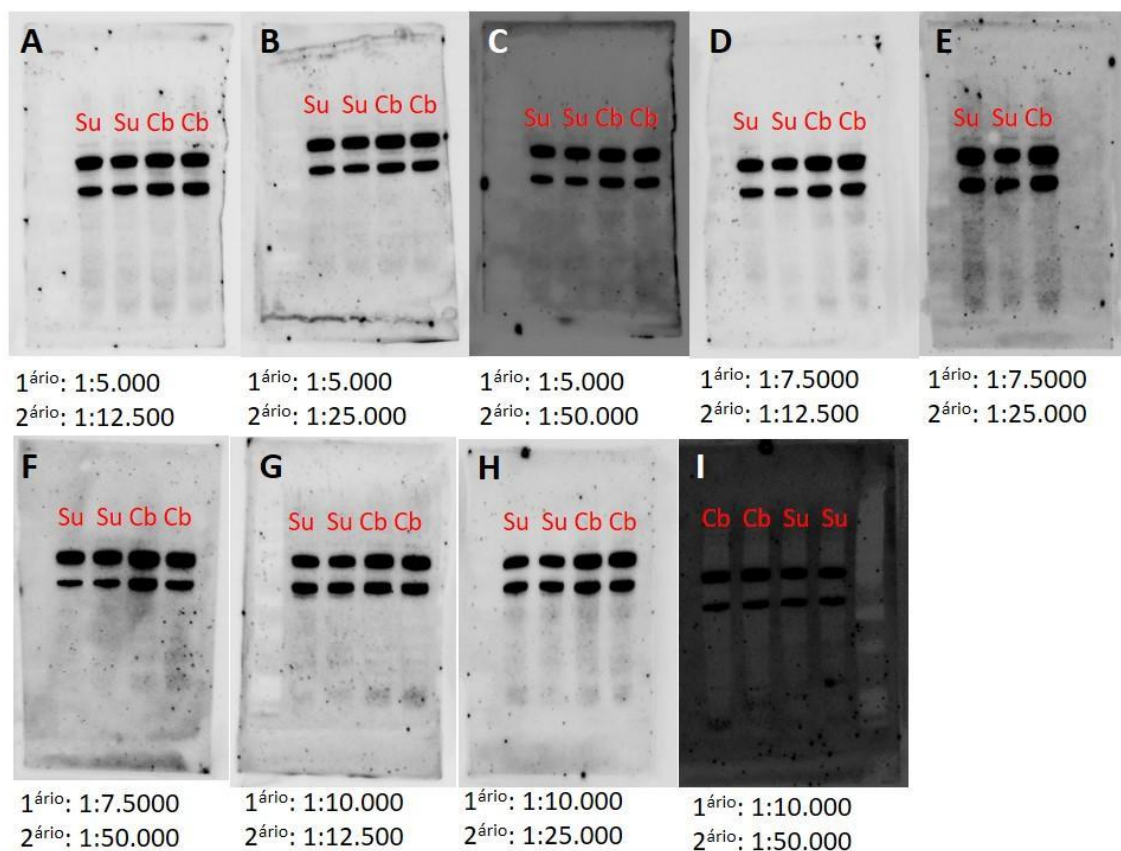


Figura 8-18 Membranas de Western blotting com amostras de microssoma de tecido hepático de *Sula leucogaster* (Su) e *Calonectris borealis* (Cb), incubadas com diferentes concentrações de anticorpo primário (CP-226, CAYMAN Chemical) e secundário (anti-coelho; RPN2108, Amersham).

Para amostras de tecido hepático de *S. guianensis* foi observado que as concentrações de anticorpo primário e secundário indicado em D (**Figura 8-19**) apresentaram os resultados mais aceitáveis, com menor “background” e maior nitidez da banda específica. Desta forma, são sugeridas para futuros ensaios as concentrações de 0,15 e 0,20 µg/mL dos anticorpos primário (ab126887) e secundário (ab205723), respectivamente. Conforme indicado no item III.2 deste documento, a etapa de padronização de imunodeteção de CYP1A em *S. guianensis* utilizou os mesmos anticorpos empregados em tecido tegumentar de cetáceos do PMC-BS. Assim, a **Figura 8-19** apresenta resultados de *Megaptera novaeangliae* para verificação da eficiência da técnica.

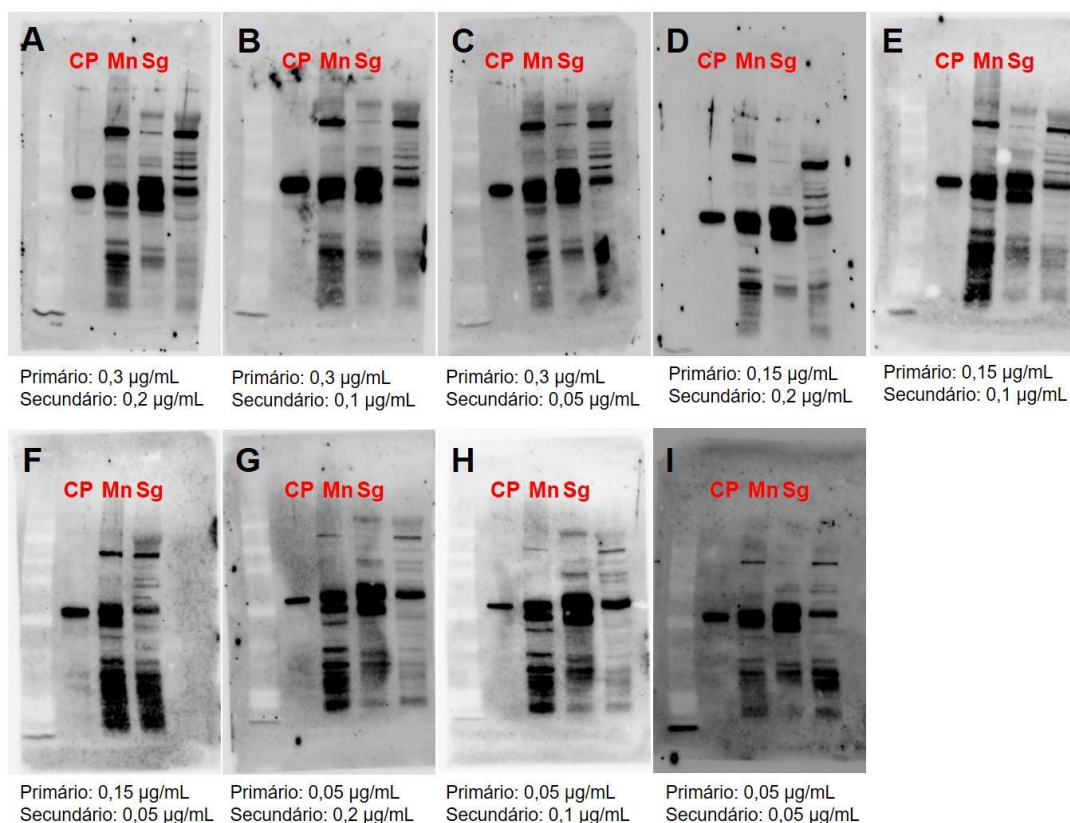


Figura 8-19 - Membranas de western blotting com amostras de microssoma de tecido hepático de *Sotalia guianensis* (Sg) e tecido tegumentar de *Megaptera novaeangliae* (Mn), incubadas com diferentes concentrações de anticorpo primário anti-CYP1A (Abcam, código ab126887) e secundário (anti-cabra; Abcam, código ab205723). CP, controle positivo.

As condições finais padronizadas do ensaio para imunodeteção de CYP1A em amostras hepáticas de *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis* são descritas na **Tabela 8-11**.

Tabela 8-11 - Condições ótimas para a imunodeteção de CYP1A em tecido hepático de *Calonectris borealis*, *Sula leucogaster* e *Sotalia guianensis*.

Espécie	Condições de imunodeteção de CYP1A			Método de revelação	Tecido
	Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Massa proteica		
<i>Calonectris borealis</i>	1:7.500 (CP226)	1:12.500*	25 µg	Clarity Max	Hepático
<i>Sula leucogaster</i>	1:7.500 (CP226)	1:12.500*	15 µg	Clarity Max	Hepático
<i>Sotalia guianensis</i>	0,15 µg (ab126887)	0,20 µg**	3,5 µg	Clarity Max	Hepático

*Anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à enzima peroxidase (RPN2108, Amersham).

**Anticorpo secundário de

8.4 Padronização da análise de biomarcadores moleculares

As atividades de padronização de biomarcadores moleculares compreendem: (a) o desenho e teste de iniciadores para os novos genes-alvo *vitelogenina* (VTG) e *glutathione S-transferase alfa* (GSTA) em tecido hepático de *L. dominicanus*, *P. puffinus* e *C. mydas* e (b) a extração, limpeza e avaliação da qualidade do RNA total de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea*, e *S. guianensis* para realização do sequenciamento e anotação funcional de transcriptoma das espécies.

Desenho e teste de iniciadores para vitelogenina (VTG) e glutathione s-transferase alfa (GSTA)

Desenho de iniciadores

Para a padronização e realização da PCR quantitativa (qPCR), técnica utilizada para a análise de biomarcadores moleculares, são necessários iniciadores específicos para a amplificação dos genes apresentados na **Tabela 8-12**.

O desenho de iniciadores foi realizado utilizando o software PrimerQuest, da *Integrated DNA Technologies*, disponível no endereço eletrônico <https://www.idtdna.com>. Os parâmetros especificados para o desenho dos iniciadores foram: tamanho do produto (*amplicon*) em 120 pb, tamanho do iniciador entre 20 e 26 pb e temperatura de anelamento entre 58 e 60°C.

A fim de garantir que a amplificação seja restrita a fragmentos do mRNA e não haja amplificação de DNA genômico, sempre que possível os iniciadores foram desenhados em exons distintos ou em regiões de junção exon/exon da sequência gênica, conforme sinalizadas nas sequências disponíveis para acesso no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Este procedimento não pôde ser realizado em sequências oriundas do sequenciamento de transcriptomas realizado no primeiro ciclo, pois a identificação de exons não é possível através desta técnica.

Todos os possíveis pares de iniciadores gerados foram testados no programa *OligoAnalyser*, também da *Integrated DNA Technologies*, avaliando-se a força de formação de dobramentos ('*hairpin*'), dímeros próprios e não-próprios e similaridade entre temperatura de dissociação (T_m) do iniciador senso e anti-senso. A qualidade dos iniciadores desenhados também foi avaliada pelo programa *FastPCR 6.5* (Primer Digital). Os iniciadores desenhados encontram-se sumarizados na **Tabela 8-12**.

Tabela 8-12 - Sequências de iniciadores selecionadas para amplificação dos genes *Vitelogenina (VTG)* e *Glutathione S-transferase alfa (GSTA)* em tecido hepático de *Larus dominicanus*, *Chelonia mydas* e *Puffinus puffinus*.

Iniciadores – genes VTG e GSTA				
Espécie	Gene	Iniciadores	$T_m(^{\circ}\text{C})$	%GC
<i>Larus dominicanus</i>	<i>Vitelogenina (VTG)*</i>	-	-	-
		-	-	-
	<i>Glutathione S-transferase alfa (GSTA)</i>	F: TTTCAGCAAGTGCCAATGGTGGAG	59,9	50,0
		R: TTCAGGTCCTTCCCGTAGAGGTTG	59,8	54,2
<i>Chelonia mydas</i>		R: GTCAGAATCACTGTCAGGTAAG	60,1	45,5
		F: CTCAACAACCTGCCAGGATAAAG	61,2	45,5
	<i>Vitelogenina 2 (VTG)</i>	R: GTGCCAGCATCTGTGTATTTT	61,5	47,6
		F: AGAGAGAGGTTTGGCAAGAG	61,3	50,0
		R: GAGTTTGAAGATCGAGTGAATG	61,3	43,5
	<i>Glutathione S-transferase alfa (GSTA)</i>	F: GGAAACCCAACTTACCTACGCCAATG	59,6	48,1
<i>Puffinus puffinus</i>		R: GTCAAACAGCAGGGCTCCATCTT	59,4	52,2
	<i>Vitelogenina (VTG)</i>	F: ACCAGTGGAAGTGCTGAGAGTACAAC	60,0	50,0
		R: TTGGCTTTGGACCGTCTTGCTTTC	60,0	50,0
		F: GTTGACTGTGACTGCGGGTGATG	60,0	56,5
	<i>Glutathione S-transferase alfa (GSTA)</i>	R: TCTGTGCTCCTGACTGCTTTCTTCTG	60,2	50,0
		F: GACCTGAAGGAGAGAGCCCTGTAATG	59,9	53,8
		R: TGCTGTATCACCTGAACCTGACTG	60,1	52,0

*Sequência anotada não alinhou satisfatoriamente com sequências conservadas de VTG disponíveis nos bancos de dados, não sendo possível garantir que a mesma de fato represente o gene alvo específico. Será realizada abordagem com técnicas de clonagem para sequenciamento deste gene especificamente.

Extração de RNA

O protocolo de extração de RNA de amostras hepáticas de *L. dominicanus*, *C. mydas* e *P. puffinus* foi iniciado com a homogeneização de fragmentos de 50 mg de tecido de cada amostra em 1 mL de Qiazol® (Qiagen). A homogeneização foi realizada com o homogeneizador Tissue-Tearor™ (BioSpec™).

Os fragmentos de tecidos homogeneizados em Qiazol[®] foram incubados a 20°C por 30 min e, após esse período de incubação, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio. Os tubos contendo a mistura de Qiazol[®], amostra e clorofórmio foram agitados vigorosamente em vórtex por 15 segundos, mantidos a 20°C por 3 min e centrifugados a 14.000 xg por 30 min a 4°C.

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, nos quais foram acrescentados 0,5 mL de isopropanol. O conteúdo dos tubos foi misturado por inversão, incubado por 10 min a 20°C e centrifugado a 14.000 xg por 30 min a 4°C. Após a centrifugação, o RNA sedimentado no pellet foi mantido e o sobrenadante descartado. O RNA de cada tecido foi cuidadosamente lavado duas vezes consecutivas com etanol 75% para remover os reagentes utilizados durante a extração.

O RNA extraído através de ambos os métodos foi ressuspenso em água própria para aplicações de biologia molecular. Todos os reagentes, tubos e ponteiros utilizados no protocolo eram próprios para biologia molecular (livres de RNase, DNase e pirógenos).

Avaliação de concentração e pureza do RNA

O RNA obtido foi avaliado por espectrofotometria com o equipamento NanoDrop[®] One/One^C (Thermo Fisher Scientific). O limite de detecção do equipamento é 2 ng/μL e o limite superior de detecção é 27.500 ng/ μL. As leituras foram realizadas em 260, 280 e 230 nm, que são os picos de absorção de ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas, e contaminantes (fenol, carboidratos, EDTA, guanidina e outros), respectivamente. Dessa forma, a absorbância em 260 nm foi utilizada para estimar a concentração de RNA, a razão 260/280 nm para estimar a pureza com relação à contaminação por proteínas, com faixas aceitáveis entre 1,8 e 2,0, e a razão 260/230 nm para avaliar a pureza relativa

a outros contaminantes, com valores aceitáveis acima de 1,7 (WIECZOREK; DELAURIERE; SCHAGAT, 2012).

Tendo em vista a importância da qualidade da amostra de RNA para obtenção de resultados moleculares confiáveis, a qualidade do RNA também foi avaliada por fluorimetria, utilizando o fluorímetro QUBiT 4.0 (Thermo Fisher Scientific), sendo considerado satisfatório um valor de IQ > 7,5.

Síntese de dna complementar (cDNA)

Para síntese de cDNA, o RNA total extraído foi tratado com DNase e submetido à reação de transcrição reversa para obtenção do cDNA com o uso do kit Quantitect Reverse Transcription® (Qiagen).

Avaliação da especificidade dos iniciadores

Para avaliar a especificidade e eficiência dos iniciadores desenhados para cada gene de cada espécie (**Tabela 8-12**), foram produzidas curvas padrão de qPCR no termociclador Rotor-Gene® com concentrações conhecidas de cDNA (800, 400, 200, 150, 100 e 50 ng), usando um *pool* de cDNA formado por volumes iguais de amostras das espécies prioritárias. Todas as reações utilizaram o corante intercalante de DNA SYBR Green (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O programa de amplificação para cada gene alvo consistiu em um ciclo de 2 min a 95°C para ativação enzimática, seguido de 35 ciclos de 95°C por 5 s e 60°C por 10 s.

Após a amplificação, um limiar de quantificação ("*threshold*") foi estabelecido para cada par de iniciadores. Este limiar foi determinado pela curva padrão do gene de interesse, considerando o r^2 da curva e a eficiência da reação (0,95 até 1,05). A eficiência igual a 1 equivale a uma reação em que a quantidade de produto duplica a cada ciclo (100% eficiente), que é o desempenho esperado para uma reação de PCR.

A verificação da especificidade dos produtos de PCR formados (amplicons) para cada gene foi obtida por meio do monitoramento da fluorescência dos amplicons em função do aumento da temperatura (50 a 95°C) no termociclador Rotor-Gene® Q (Qiagen). Esses dados compreendem a curva de dissociação, do inglês *melting curve*.

Resultado da avaliação da especificidade dos iniciadores

Os perfis obtidos para cada gene alvo na curva de dissociação podem ser observados nas **Figura 8-20 e Figura 8-21**.

Para todos os pares de iniciadores desenhados para a quantificação de transcritos de *GSTA*, foram obtidos picos únicos de dissociação (**Figura 8-20**), o que sugere a formação de um único produto e reforça a especificidade dos iniciadores desenhados. Também foi observado um único pico na curva de dissociação do gene de vitelogenina (*VTG*) de *P. puffinus* (**Figura 8-21**).

Além da ocorrência de um pico único, as curvas padrão geradas pelos pares de iniciadores *GSTA1* de *P. puffinus* (par b), *GSTA* de *L. dominicanus*, *GSTA* de *C. mydas* e *VTG* de *P. puffinus* apresentaram eficiência e linearidade satisfatórios (**Figura 8-21**). Quando submetidos a eletroforese em gel de agarose 3%, os produtos dessas amplificações apresentaram uma única banda (**Figura 8-22**), reforçando a especificidade dos pares de iniciadores.

Ao avaliar a eficiência dos pares de iniciadores desenhados para *GSTA1* de *P. puffinus* foi observado que o par de iniciadores “a” apresentou menor eficiência em comparação ao par de iniciadores “b” (**Tabela 8-13**). Desta forma, será utilizado o par de iniciadores “b” para futuras análises em *P. puffinus*.

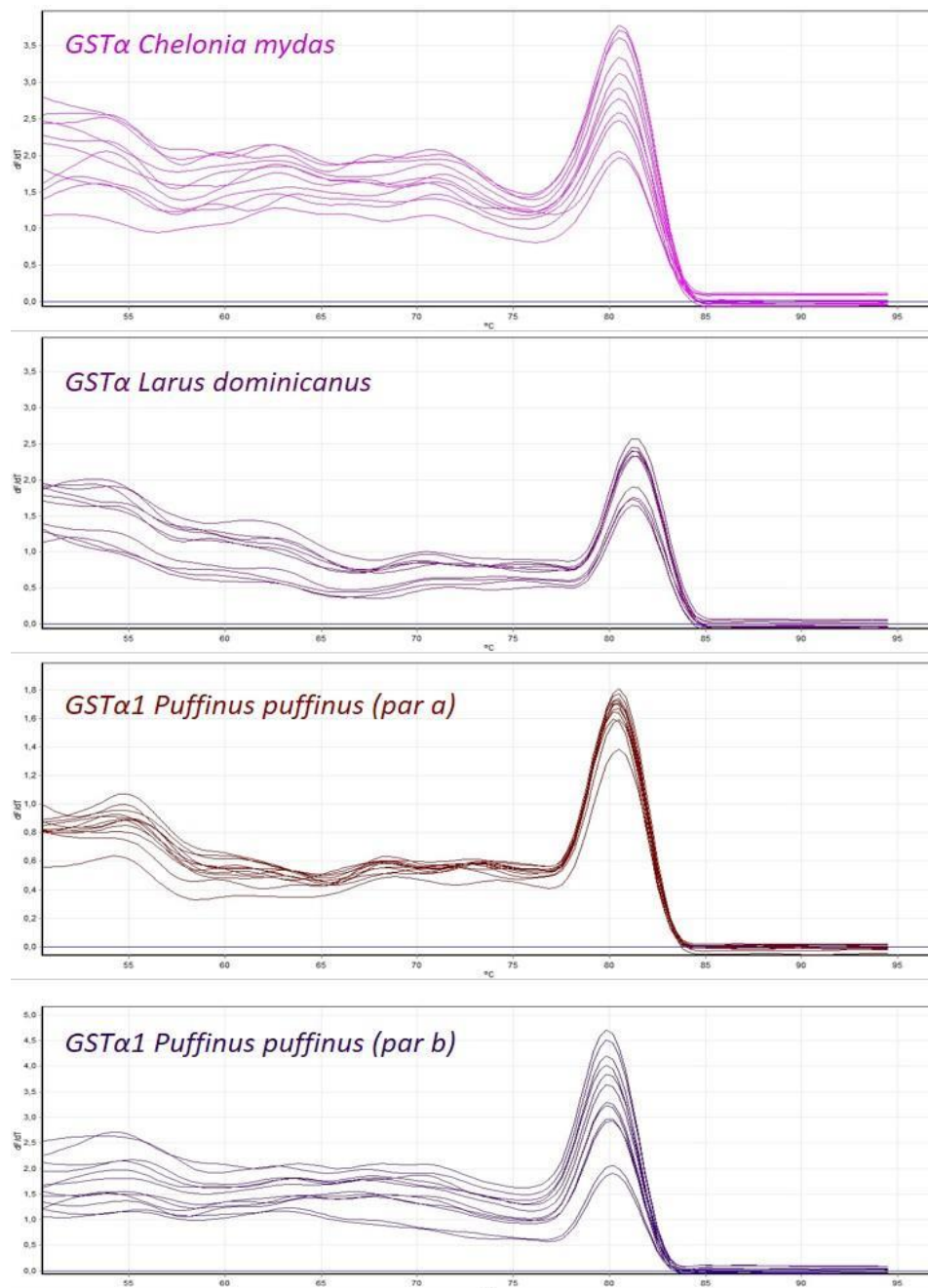


Figura 8-20 - Curva de dissociação de GSTα em tecido hepático de *Chelonia mydas*, *Larus dominicanus* e *Puffinus puffinus*. Eixo X (temperatura); eixo Y (derivada negativa da fluorescência em função da temperatura, $-dF/dT$). O ponto máximo de cada linha representa a temperatura de dissociação do produto. A presença de um pico único sugere a presença de um único produto.

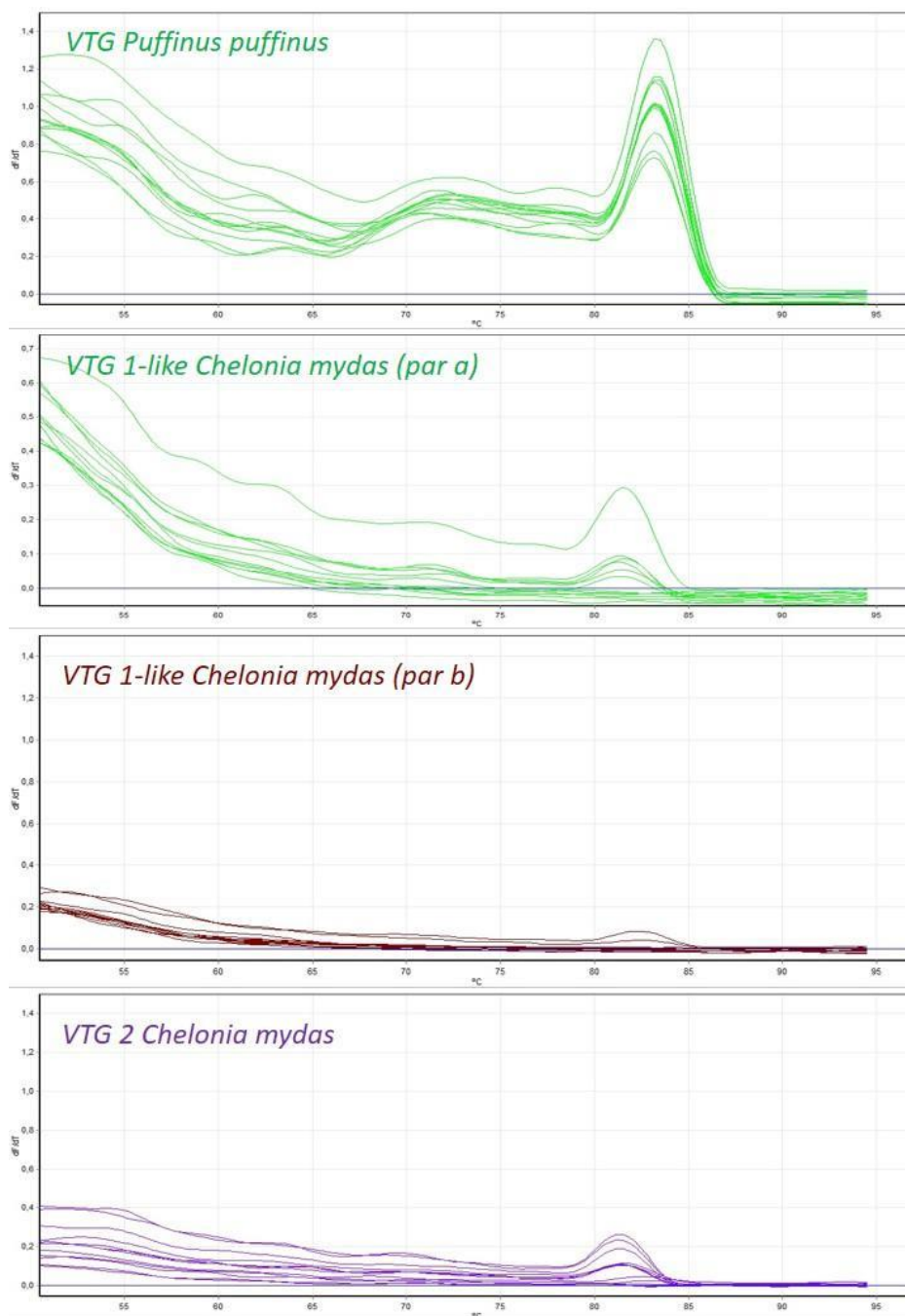


Figura 8-21 - Curva de dissociação de VTG em tecido hepático de *Chelonia mydas* e *Puffinus puffinus*. Eixo X (temperatura); eixo Y (derivada negativa da fluorescência em função da temperatura, $-dF/dT$). O ponto máximo de cada linha representa a temperatura de dissociação do produto. A presença de um pico único sugere a presença de um único produto.

Tabela 8-13 - Valores de r^2 e eficiência calculados com base em uma curva padrão de cDNA de *Chelonia mydas*, *Larus dominicanus* e *Puffinus puffinus*.

Avaliação da qualidade de iniciadores – genes VTG e GSTa				
Espécie	Gene	Iniciadores	r^2	Eficiência
<i>Larus dominicanus</i>	GSTA	F: TTTCAGCAAGTGCCAATGGTGGAG R: TTCAGGTCCTTCCCGTAGAGGTTG	0,99	1,04
		F: GTTGACTGTGACTGCGGGTGATG (par a) R: TCTGTGCTCCTGACTGCTTTCTTCTG (par a)	0,98	1,27
<i>Puffinus puffinus</i>	GSTA1	F: GACCTGAAGGAGAGAGCCCTGTAATG (par b) R: TGCTGTATCACCTGAACCTGACTG (par b)	0,98	1,00
		F: ACCAGTGGAAAGTGCTGAGAGTACAAC R: TTGGCTTTGGACCGTCTTGCTTTC	0,98	1,02
	GSTA	F: GGAAACCCAAACTTACCTACGCCAATG R: GTCAAACAGCAGGGCTCCATCTT	0,99	1,00
		F: GGACATCCAGCCATTCTAAAG (par a) R: GGAACAACCTCCAGGGTAATATC (par a)	0,06	32,70
<i>Chelonia mydas</i>	VTG-1-like	F: GTAGGCAGCATATTCCCATC (par b) R: GTCAGAATCACTGTCAGGTAAG (par b)	-	-
		F: AGAGAGAGGTTTGGCAAGAG R: GAGTTTGGGAAGATCGAGTGAATG	0,75	1,68

*F: forward; R: reverse.

**Valores de r^2 acima de 0,98 são considerados aceitáveis.

***Valores de eficiência entre 0,95 e 1,05 são considerados aceitáveis.

Em contrapartida, nenhum dos iniciadores desenhados para a sequência de vitelogenina 1-like (*VTG 1-like*) ou vitelogenina 2 (*VTG-2*) de *C. mydas* apresentou eficiência, linearidade (**Tabela 8-13**) ou sequer a presença de um pico claro na curva de dissociação (**Figura 8-21**). A ausência de amplificação pode ser decorrente da análise apenas em fêmeas juvenis, já que a vitelogenina é uma proteína produzida no fígado de fêmeas ovíparas durante o processo de vitelogênese, sendo absorvida nos ovócitos em desenvolvimento. Portanto, é esperado que fêmeas reprodutivas possuam elevados níveis desta proteína e de transcritos do gene que codifica para a mesma, enquanto machos em geral ou animais juvenis possuam níveis baixos ou indetectáveis da proteína e de seus transcritos, exceto em casos de desregulação endócrina.

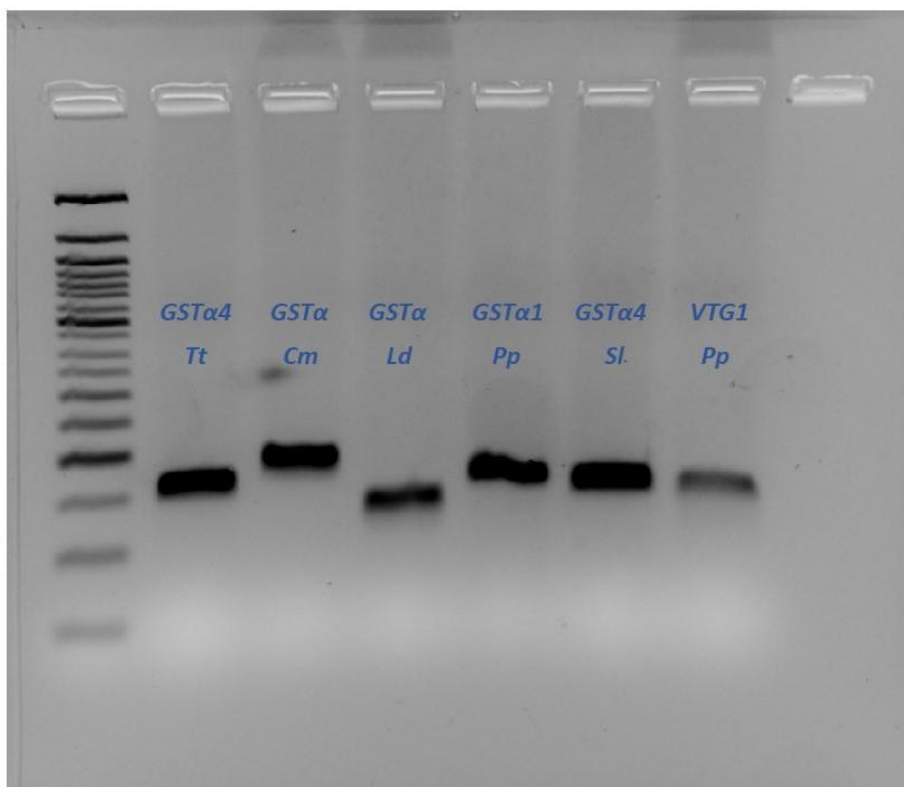


Figura 8-22 - Produtos das reações de qPCR para os genes de glutathione S-transferase isoforma alfa em *Chelonia mydas* (GST α , Cm), *Larus dominicanus* (GST α , Ld) e *Puffinus puffinus* (GST α , Pp) e de vitelogenina em *Puffinus puffinus* (VTG1, Pp) submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%. A presença de uma única banda indica formação de um único produto, atestando a especificidade dos iniciadores desenhados.

Desse modo, o baixo número de transcritos de vitelogenina em juvenis de *C. mydas* e a ausência de fêmeas adultas dentre as amostras desta espécie disponíveis no LABCAI impediu a avaliação da eficiência e linearidade dos iniciadores de genes que codificam a proteína vitelogenina.

Para contornar este problema, foram desenhados pares de iniciadores que estão localizados no mesmo exon do gene da vitelogenina, os quais são apresentados na Tabela 8-14. Estes iniciadores foram utilizados para amplificação dos genes da VTG-1-like e VTG-2 em DNA genômico de *C. mydas* através de PCR convencional, o que possibilita avaliar a especificidade dos iniciadores desenhados, embora não a eficiência e linearidade dos mesmos. A avaliação destes iniciadores é apresentada

na próxima seção, pois difere metodologicamente das avaliações realizadas para os demais iniciadores.

Tabela 8-14 - Sequências de iniciadores desenhados para amplificação dos genes vitelogenina (VTG-1-like e VTG-2) em tecido hepático de *Chelonia mydas*.

Iniciadores – gene VTG					
Espécie	Gene	Origem da sequência	Iniciadores	Tm (°C)	%GC
<i>Chelonia mydas</i>	Vitelogenina 1 (VTG-1-like)	XM_043521410.1	F: GCTATGATGCCAAGAAGCGTTCCAAG	59,9	50,0
			R: GCTGCTGCGACTGGCGTATTTAG	60,2	56,5
			F: ATCATCTTCCTCCTCCTCCTCTTC	60,2	51,8
	Vitelogenina 2 (VTG-2)	XM_007068771.3	R: TACTGTCACTGCTCCTGCTCCTG	60,1	56,5
			F: CCTCATCGTTGCTCCTCATCATCTTCC	59,9	48,2
			R: TGCTGCTTCCTTCTCTTGTCTAGTTG	60,0	46,4

Padronização da quantificação de transcritos dos genes vitelogenina 1-like (VTG-1-LIKE) e vitelogenina 2 (VTG-2) em tecido hepático de *Chelonia mydas*

Para a padronização, foram utilizadas amostras de DNA genômico de *C. mydas* obtidas de acordo com as metodologias descritas em detalhe abaixo. As informações sobre os animais utilizados são apresentadas na **Tabela 8-15**.

Tabela 8-15 - Identificação dos espécimes de *Chelonia mydas* cujas amostras foram utilizadas para a padronização dos novos iniciadores.

Espécimes – <i>Chelonia mydas</i>					
Espécie	Código LABCAI	Identificação da amostra - SIMBA	Instituição de origem	Trecho de origem PMP-BS	Tecido biológico
<i>Chelonia mydas</i>		192521	CRD - Angra dos Reis	Trecho 11	Hepático
<i>Chelonia mydas</i>		159718	Gremer	Trecho 09	Hepático
<i>Chelonia mydas</i>		177891	CRD - Araruama	Trecho 15	Hepático
<i>Chelonia mydas</i>	CM292	163182	IPEC	Trecho 07	Hepático
<i>Chelonia mydas</i>	CM302	155280	BIOPECA	Trecho 08	Hepático
<i>Chelonia mydas</i>		189859	CRD - Angra dos Reis	Trecho 13	Hepático
<i>Chelonia mydas</i>		160174	Biopesca	Trecho 08	Hepático
<i>Chelonia mydas</i>	CM284	196972	ARGONAUTA	Trecho 10	Hepático
<i>Chelonia mydas</i>		169939	Gremer	Trecho 09	Hepático
<i>Chelonia mydas</i>	CM285	168275	UNIVILLE	Trecho 05	Hepático

O DNA genômico foi extraído das amostras de *C. mydas* através do método de *Salting-out* (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). Brevemente, aproximadamente 25

mg de tecido hepático foram incubados em uma solução tampão contendo proteinase K a 40°C por 2 h. As amostras foram, então, centrifugadas a 10.000 xg, por 20 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 300 µL de NaCl 5M, seguido de nova centrifugação (10.000 xg, 15 min a 4°C). Na sequência foi adicionado isopropanol às amostras, em uma proporção de 1:1 (v:v), as quais foram misturadas usando o vortex e novamente centrifugadas (10.000 xg, 15 min a 4°C). O pellet obtido foi lavado com etanol (75 %), seco e ressuspendido em 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) em espectrofotômetro NanoDrop®1000 (Thermo Fisher Scientific®) (WIECZOREK; DELAURIERE; SCHAGAT, 2012). A integridade do DNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose (2%).

Para avaliação da especificidade dos iniciadores desenhados (**Tabela 8-14**), foi realizada PCR convencional para amplificação dos genes alvo. O programa de amplificação para cada gene alvo consistiu em um ciclo de 2 min a 95°C para ativação enzimática, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 40 s e 72°C por 30 s, com uma extensão final a 72°C por 2 min.

Para visualizar a especificidade dos iniciadores, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%. A presença de uma única banda indica a formação de um único produto, reforçando a especificidade dos pares de iniciadores desenhados. O resultado da eletroforese em gel de agarose para

verificação da especificidade de iniciadores é apresentada na

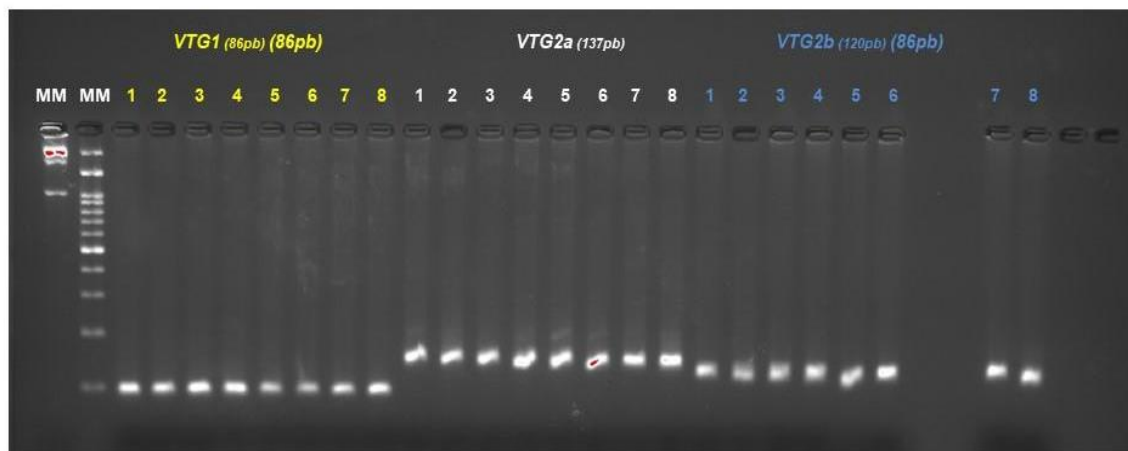


Figura 8-23.

Para os pares de iniciadores *VTG-1-like* e *VTG2b* pode ser observado que houve apenas uma banda de DNA, refletindo a amplificação de apenas um produto na PCR, o que reforça a especificidade de ambos os iniciadores. Para o par de iniciadores de *VTG2a*, pode ser observado uma banda fraca formada, além da banda principal, com um tamanho aproximado de 150 pb. Desta forma, sugere-se que este par de iniciadores não seja utilizado em futuras análises para quantificação de *VTG2* em tecido hepático de *C. mydas*.

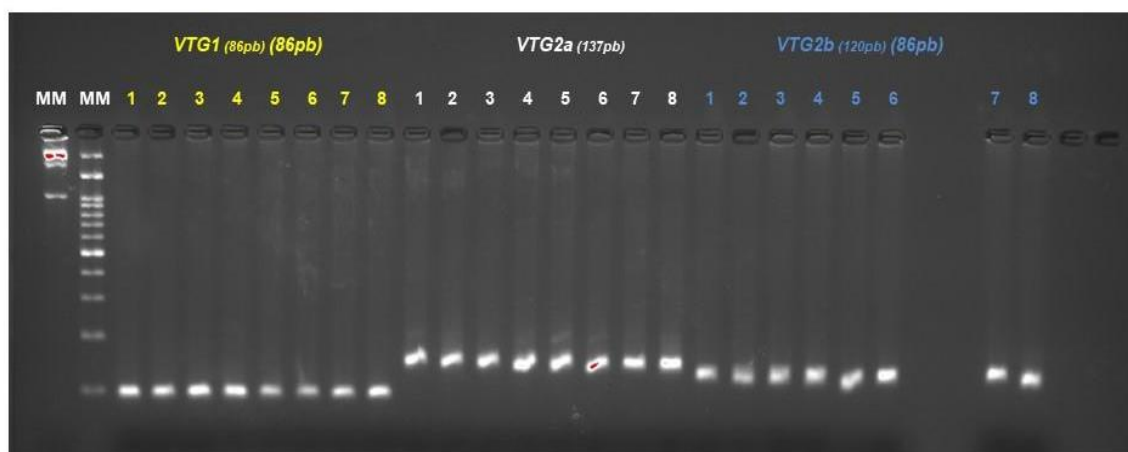


Figura 8-23 - Perfil eletroforético dos produtos de PCR convencional obtidos com os pares de iniciadores desenhados para detecção de Vitelogenina 1-like e Vitelogenina 2 (*VTG1-like*, *VTG2a* e *VTG2b*) em amostras de tecido hepático de *Chelonia mydas*.

Preparação de amostras para realização e montagem de transcriptoma de novas espécies prioritárias

Para a padronização de técnicas moleculares nas novas espécies prioritárias será necessário, primeiramente, identificar as sequências referentes aos genes alvo selecionados para o segundo ciclo, através do sequenciamento e montagem de transcriptoma global qualitativo para cada uma das espécies. Para tal, foi realizada extração e limpeza do RNA total e, ainda, avaliação de qualidade e integridade do RNA extraído para as *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis*. Ademais, ao buscar por genes que codificam para vitelogenina (VTG) no transcriptoma de *L. dominicanus*, sequenciado por nosso grupo ao longo do primeiro ciclo das análises de biomarcadores, nos deparamos com a ausência de sequências anotadas deste gene de boa qualidade. Este resultado pode ter ocorrido por uma falha na montagem de novo do transcriptoma por viés metodológico de software, ou a amostra sequenciada pode ter sido de um indivíduo macho, que não transcreve VTG em condições fisiológicas normais, ou ainda, uma fêmea juvenil, que se espera que apresente uma baixa transcrição deste gene no fígado.

Devido a esta limitação, *L. dominicanus* também será incluído nesta etapa de padronização, sendo novamente submetido à realização do transcriptoma para obtenção das sequências de vitelogenina.

Extração e limpeza do rna total em amostras de tecido hepático e tegumentar de tetrápodes marinhos

O RNA total de cada amostra foi extraído individualmente utilizando-se o reagente Qiazol (QIAGEN, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, para amostras de tecido hepático de *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis*. O protocolo de extração de RNA foi iniciado com a homogeneização de fragmentos de 50 mg de tecido de cada amostra em 1 mL de Qiazol® (Qiagen). A homogeneização foi realizada com o homogeneizador Tissue-Tearor™ (BioSpec™).

Os fragmentos de tecido homogeneizados em Qiazol® foram incubados a 20°C por 30 min, e após esse período de incubação, foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio. Os tubos contendo a mistura de Qiazol®, amostra e clorofórmio foram agitados vigorosamente em vórtex por 15 segundos, mantidos a 20°C por 3 min e centrifugados a 14.000 xg por 30 min a 4°C.

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 20°C e centrifugado a 14.000 xg por 30 min a 4°C. Após a centrifugação, o RNA sedimentado no pellet foi mantido e o sobrenadante descartado. O RNA de cada tecido foi cuidadosamente lavado duas vezes consecutivas com etanol 75% para remover os reagentes utilizados durante a extração.

O RNA extraído através de ambos os métodos foi ressuscitado com água própria para aplicações de biologia molecular. Todos os reagentes, tubos e ponteiros utilizados no protocolo eram próprios para biologia molecular (livres de RNase, DNase e pirógenos). O RNA extraído foi seco a 40 °C e ressuscitado com água própria para aplicações de biologia molecular.

Para garantir uma melhor qualidade do RNA extraído de amostras coletadas em código 2 de decomposição, foi realizada a limpeza de possíveis substâncias interferentes (proteínas, carboidratos e sais) do RNA extraído com o kit comercial RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen). Neste protocolo, 12,5 µL de uma solução de DNase foi adicionado a 87,5 µL do RNA extraído para remoção do DNA genômico. O volume foi completado para 200 µL com água própria para biologia molecular, sendo o conteúdo incubado por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, 700 µL de tampão RLT contendo β-mercaptoetanol, foi adicionado às amostras. 500 µL de etanol absoluto foi adicionado ao RNA diluído, e misturado bem através de pipetagem. A amostra resultante foi, então, transferida em etapas para uma coluna e submetida a centrifugação (15 s a $\geq 8000 \times g$) até que todo o líquido tivesse sido

usado. Para limpeza da coluna, 500 µL de etanol 80% foi adicionado à coluna, sendo esta submetida à centrifugação (2 min a $\geq 8000 \times g$). O RNA extraído foi eluído em água própria para biologia molecular.

Avaliação da qualidade e integridade do RNA total

O RNA obtido foi avaliado por espectrofotometria com o equipamento Nanodrop® One/One^C (Thermo Fisher Scientific).

Devido à necessidade de altos níveis de integridade do RNA extraído para o sequenciamento e montagem de transcriptoma, o RNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose com formaldeído. Nesta técnica, a integridade do material pode ser observada através da presença de duas bandas marcadas, 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 à 28S e 18S, respectivamente. Paralelamente, a ausência de bandas marcadas sugere degradação intensa do RNA.

Resultado da extração e limpeza do rna total em amostras de tecido hepático e tegumentar de tetrápodes marinhos

Os resultados de concentração, pureza e integridade dos RNAs extraídos são apresentados na **Tabela 8-16**. Todas as amostras utilizadas apresentaram valores de razões A260/A280 e A260/A230 adequadas, e concentração suficiente.

Tabela 8-16 - Concentração, pureza e integridade do RNA extraído de tecido hepático de *Calonectris borealis*, *Sula leucogaster*, *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea* e *Sotalia guianensis*.

Parâmetros de qualidade – RNA total				
Espécie	Código amostra	Concentração de RNA (ng/µL)	A260/A280	A260/A230
Aves				
<i>Calonectris borealis</i>	CB003	3008,53	2,13	2,32
<i>Calonectris borealis</i>	CB026	2656,96	2,12	2,31
<i>Calonectris borealis</i>	CB035	2477,44	2,16	2,33
<i>Calonectris borealis</i>	CB040	2312,91	2,13	2,33
<i>Calonectris borealis</i>	CB043	2498,94	2,13	2,34
<i>Sula leucogaster</i>	SU061	1957,86	2,15	2,34
<i>Sula leucogaster</i>	SU094	1601,85	2,13	2,33

<i>Sula leucogaster</i>	SU096	2081,48	2,15	2,34
<i>Sula leucogaster</i>	SU104	1679,01	2,15	2,15
<i>Sula leucogaster</i>	SU137	1906,71	2,14	2,29
<i>Larus dominicanus</i>	LD009	2435,30	2,12	2,33
<i>Larus dominicanus</i>	LD027	2537,15	2,12	2,26
<i>Larus dominicanus</i>	LD031	2159,14	2,15	2,33
<i>Larus dominicanus</i>	LD069	2350,31	2,16	2,23
<i>Larus dominicanus</i>	LD102	2136,27	2,13	2,34
Quelônios				
<i>Caretta caretta</i>	CC014	988,36	2,12	2,36
<i>Caretta caretta</i>	CC016	2639,48	2,14	2,35
<i>Caretta caretta</i>	CC025	2346,37	2,16	2,37
<i>Caretta caretta</i>	CC026	2380,49	2,15	2,28
<i>Caretta caretta</i>	CC#44*	2506,03	2,16	2,34
<i>Lepidochelys olivacea</i>	LO#07*	2264,27	2,12	2,05
<i>Lepidochelys olivacea</i>	LO#12*	2244,51	2,08	1,95
<i>Lepidochelys olivacea</i>	LO#14*	1676,34	2,04	1,85
Mamíferos				
<i>Sotalia guianensis</i>	SG013	2250,14	2,13	2,26
<i>Sotalia guianensis</i>	SG064	2510,52	2,13	2,29
<i>Sotalia guianensis</i>	SG080	1839,74	2,13	2,34
<i>Sotalia guianensis</i>	SG081	2459,15	2,18	2,21

* Amostras não destinadas à análise de biomarcadores, cedidas pela Visão Ambiental.

No entanto, ao avaliar a integridade do RNA extraído em gel de agarose com formaldeído (**Figura 8-24**), foi observado que algumas amostras apresentaram RNA consideravelmente degradado, e inadequado para serem utilizados para sequenciamento e montagem de transcriptoma.

Mais especificamente, as amostras 01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 14, 30, 31, 32 e 33 (referentes às amostras CC14, CC16, CC25, CC#44, LO#07, LO#12, LO#14, SU61, SG13, SG64, SG80 e SG81) não apresentaram bandas específicas no tamanho esperado, o que indica alta degradação do material genético. Já as amostras 04, 09, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23 (referentes às amostras CC26, CB03, CB35, CB40, CB43, CB26, SU94, SU96, SU104, SU137, LD09, LD27, LD31, LD69 e LD102) apresentaram duas bandas, referente às subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal, o que sugere integridade parcial do material. Todas essas amostras serão encaminhadas para análise de integridade no

equipamento BioAnalyzer, a ser realizada pela empresa contratada para sequenciamento e montagem de transcriptomas.

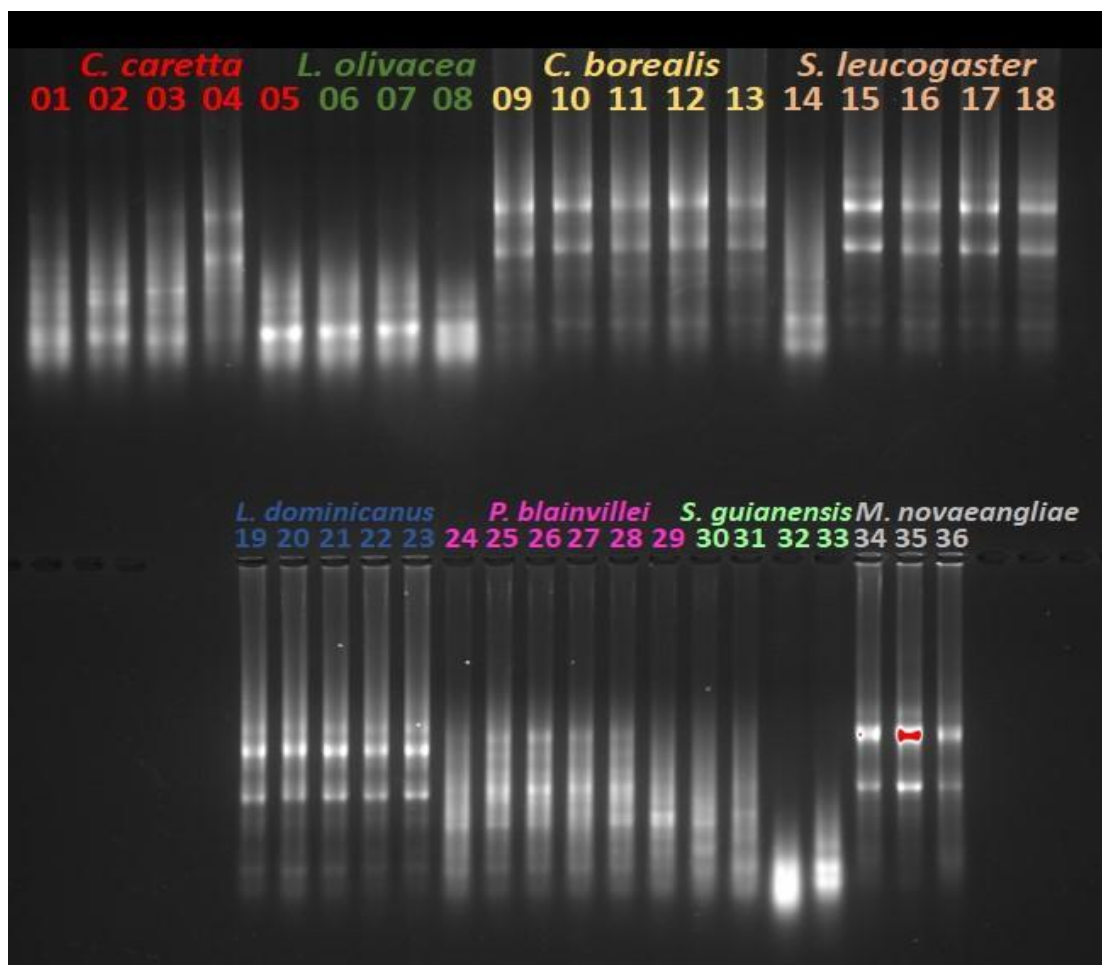


Figura 8-24 - Perfil eletroforético de RNA em gel de agarose 1,2% com formaldeído das amostras de tecido hepático de *C. caretta*, *L. olivacea*, *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis*.

Com base nos resultados apresentados acima, nenhuma amostra das espécies *L. olivacea* e *S. guianensis* apresentaram qualidade suficiente para serem submetidas ao sequenciamento e montagem de transcriptoma. Considerando que todas as amostras utilizadas nesta etapa foram previamente selecionadas dentre as disponíveis no LABCAI como aquelas com maior potencial de apresentarem RNA íntegro (animais que morreram em transporte para as bases, em *rigor mortis* ou cujo acionamento foi para animais vivos), será necessário recorrer às bases integrantes

dos PMPs para a obtenção de amostras especificamente para este fim, que deverão ser, preferencialmente, obtidas de animais eutanasiados, logo após a sua morte.

8.5 Análise de biomarcadores bioquímicos enzimáticos em tetrápodes marinhos

As atividades de análise de biomarcadores bioquímicos realizadas no período compreenderam a quantificação da atividade GST e EROD em amostras de tecido hepático de *C. borealis*, *L. dominicanus*, *P. puffinus*, *C. caretta*, *C. mydas*, *S. leucogaster* e *S. guianensis*, apresentadas em detalhe nas seções abaixo. As informações referentes aos espécimes analisados encontram-se no Apêndice 8 - **Anexo A**.

Homogeneização das amostras

Amostras de tecido hepático de *C. borealis*, *L. dominicanus*, *P. puffinus*, *C. caretta*, *C. mydas*, *S. leucogaster* e *S. guianensis*, contendo aproximadamente 100 mg por cada espécime, foram homogeneizadas.

Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas nas frações citosólica e microsomal das amostras hepáticas das amostras homogeneizadas foi determinada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay® (Bio-Rad), de acordo com instruções do fabricante.

Quantificação de atividade GST

O princípio do método da atividade GST, descrito por Habig e Jakoby (1981), está baseado na reação de conjugação do tripeptídeo γ -glutamil-cisteinil-glicina (GSH), também conhecido por glutathiona reduzida, com o substrato hidrofóbico 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Essa reação de conjugação é catalisada pelas enzimas glutathiona S-transferases (GSTs) (**Figura 8-25**), no qual após a reação, o

conjugado GS-DNB pode ser detectado espectrofotometricamente no comprimento de onda 340 nm.

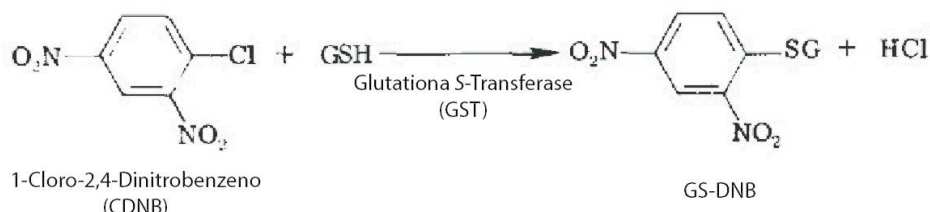


Figura 8-25 - Reação de formação do conjugado GS-DNB a partir da reação entre 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e glutathiona reduzida (GSH), catalisada por glutathione S-transferase (GST) (Adaptado de Habig e Jakoby, 1981).

A atividade da GST foi medida de acordo com as condições de ensaio previamente padronizadas para o tecido hepático de cada uma das espécies: i) GSH em concentrações de 2 mM para *C. borealis*, 2,5 mM para *S. leucogaster*, *S. guianensis*, *C. caretta* e *L. olivacea*; ii) 2,5 mM CDNB para todas as espécies.

Além das amostras de espécies prioritárias, uma alíquota de GST comercial isolada de equino (Sigma, código G6511), utilizada como controle positivo, foi submetida às mesmas condições de cada ensaio.

Quantificação de atividade EROD

Os ensaios de atividade EROD foram realizados na fração microssomal, em duplicata, utilizando um protocolo adaptado de Burke e Mayer (1974) e as condições de ensaio previamente padronizadas para o tecido hepático das espécies. Concentração ótima de 7-ER é de: *C. borealis* - 2,5 µM, *S. leucogaster* - 1,25 µM, *C. caretta* - 2,65 µM, *L. olivacea* - 5,5 µM e *S. guianensis* - 0,85 µM. E NADPH em concentração final de 0,5 mM para as espécies: *C. borealis*, *S. leucogaster*, *C. caretta*, *L. olivacea* e *S. guianensis*.

Além das amostras microssomais de tecido hepático das espécies prioritárias, uma alíquota de microssoma de fígado de camundongo, *Mus musculus* (linhagem Swiss) exposto a 100 mg/Kg de beta-naftoflavona (BNF) por 48 h, um conhecido indutor de atividade EROD, foi submetida às mesmas condições de ensaio das

demais espécies. Essa amostra foi utilizada como controle positivo da análise enzimática.

Análises estatísticas preliminares

Os resultados das análises de atividade GST e EROD foram avaliados quanto à aderência ao modelo normal (*i.e.* gaussiano) com o uso dos testes de D'Agostino e Pearson, e quanto à homogeneidade de variância utilizando o teste de Bartlett ou teste F.

Para avaliar a influência de variáveis categóricas, como fatores biológicos, que variaram de acordo com a espécie estudada, ambientais (sazonalidade, ano de coleta) e níveis de HPAs nas respostas de biomarcadores, foram realizadas comparações entre grupos. Considerando os resultados da análise de distribuição e homocedasticidade dos biomarcadores, optou-se por realizar: 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 teste U de Mann-Whitney, quando o fator possui apenas 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, quando o fator possuía apenas dois níveis. Todos os testes foram realizados sem remoção de dados discrepantes ou *outliers*.

Os gráficos e análises estatísticas de *L. dominicanus*, *P. puffinus* e *C. mydas* referem-se aos dados acumulados ao longo dos últimos 7 anos, contemplando o 1º ciclo e o 2º ciclo de padronização de biomarcadores, com resultados até dezembro/2023.

Para as demais espécies incorporadas como prioritárias com resultados de atividades GST e EROD (*S. leucogaster*, *C. borealis*, *C. caretta* e *S. guianensis*), são apresentados os dados gerados no novo ciclo de atividades.

Resultados e discussão de biomarcadores bioquímicos em tetrápodes marinhos

Resultados e discussão de atividade GST e EROD em aves marinhas

Para aves, as comparações entre grupos foram realizadas considerando os seguintes fatores: sexo, sazonalidade (apenas *L. dominicanus* e *S. leucogaster*), escore corporal, faixa etária, ano de coleta, níveis de HPA prioritários no tecido hepático, presença de resíduos sólidos no trato gastrointestinal (TGI; apenas *C. borealis*) e presença de óleo nas penas (apenas *P. puffinus*).

Sula leucogaster

Os resultados estatisticamente significativos obtidos para os biomarcadores avaliados em tecido hepático de *S. leucogaster* são apresentados na **Figura 8-26**. Os parâmetros que não apresentaram diferenças estatísticas são apresentados no **Apêndice 8 - Anexo B**.

A atividade GST em *S. leucogaster* foi maior em aves juvenis em comparação com adultos ($p < 0,01$) (**Figura 8-26A**). Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que os juvenis de atobás possam ter um sistema de defesa antioxidante mais ativo ou necessitar de uma maior proteção contra o estresse oxidativo em comparação aos adultos, devido a diferenças no metabolismo, desenvolvimento ou exposição a fatores ambientais. Tais diferenças foram observados em frangos de corte de 7, 21 e 42 dias de idade que apresentaram um aumento dos níveis de expressão de GST, dependente da idade (MURCIA; DIAZ, 2021). Por outro lado, Coulet e colaboradores (1996) reportaram que a atividade GST não variou em galinhas de diferentes faixas etárias. Da mesma forma, Escorcia e colaboradores (2020) não observaram associações da idade com a atividade GST em galos. Em *S. leucogaster*, ainda não se conhece a causa para tais diferenças entre juvenis e adultos.

A atividade GST foi maior em fêmeas em comparação com os machos ($p < 0,01$) (**Figura 8-26B**). Para *S. leucogaster*, o tempo dedicado à nidificação e ao investimento parental entre machos e fêmeas é semelhante e parece não ter influência sobre a exposição a contaminantes ambientais, uma vez que ambos participam das atividades de busca por alimentos para prole na mesma proporção

(MARTINS; DIAS, 2003). Sendo assim, esse fator pode não constituir a causa das diferenças observadas na atividade GST entre machos e fêmeas. Uma possível causa para diferença entre machos e fêmeas pode estar relacionada às diferenças fisiológicas ou hormonais (RUIZ et al., 2013).

O escore corporal vem sendo utilizado para caracterizar o estado fisiológico das aves marinhas, vivas, às variações das condições ambientais e infestações por parasitas (DAOUST et al., 2021), além de processos migratórios, pós-postura e nidificação (GATT et al., 2021; COLUMINAS-CIURÓ et al., 2022). A atividade EROD em indivíduos com escore corporal ótimo foi maior quando comparada aos estados caquético e magro ($p < 0,01$) (**Figura 8-26C**). Em *C. mydas*, o estado nutricional de jejum prolongado ou inanição afeta negativamente a capacidade de biotransformação dos organismos (McCUE, 2010).

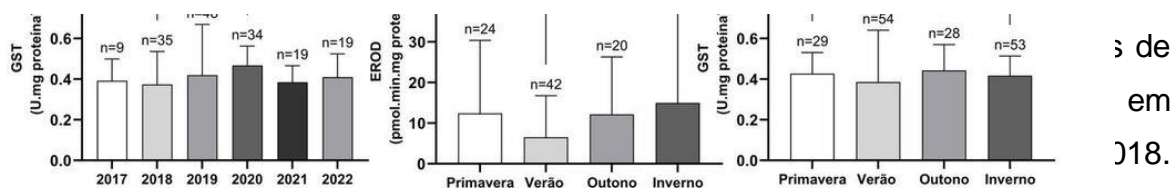


Figura 8-26 - Resultados das análises de atividade GST e EROD em tecido hepático de *Sula leucogaster* em diferentes condições. (A) Atividade GST entre indivíduos juvenis e adultos. (B) Atividade GST entre indivíduos fêmeas e machos. (C) Atividade EROD em relação ao escore corporal. (D) Atividade GST ao longo dos anos. (E) Atividade EROD nas diferentes estações do ano. (F) Atividade GST nas diferentes estações do ano.

Os atobás-pardo coletados no inverno apresentaram maior atividade EROD em comparação ao verão ($p < 0,05$) (**Figura 8-26E**). Em relação à atividade GST, as aves coletadas no verão apresentaram menor atividade em comparação às demais estações (**Figura 8-26F**). A espécie *S. leucogaster* se reproduz ao longo de todo o ano, com pico entre os meses de agosto e novembro (BRANCO; FRACASSO; MORAES-ORNELLAS, 2013). Além disso, analisando a dieta de *S. leucogaster* por estação do ano, Branco e colaboradores (2005) verificaram que a média de regurgitos foi maior no verão em relação às outras estações do ano. Dessa forma, podemos relacionar as diferenças observadas na atividade EROD e GST em *S. leucogaster* com as variações sazonais na alimentação e reprodução dessas aves.

Durante o verão, o maior esforço demandado pelo cuidado parental pode alterar o metabolismo dessas aves, conduzindo a uma menor atividade dessas enzimas.

Puffinus puffinus

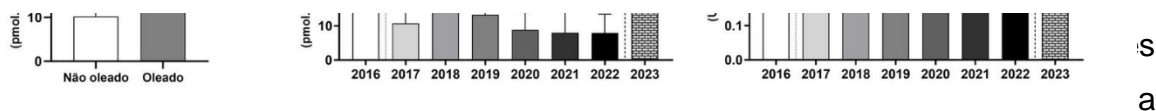


Figura 8-27. Os parâmetros que não apresentaram diferenças estatísticas são apresentados no **Apêndice 8 - Anexo B**.

A atividade EROD foi significativamente maior ($p < 0,05$) em indivíduos oleados comparado aos não oleados (

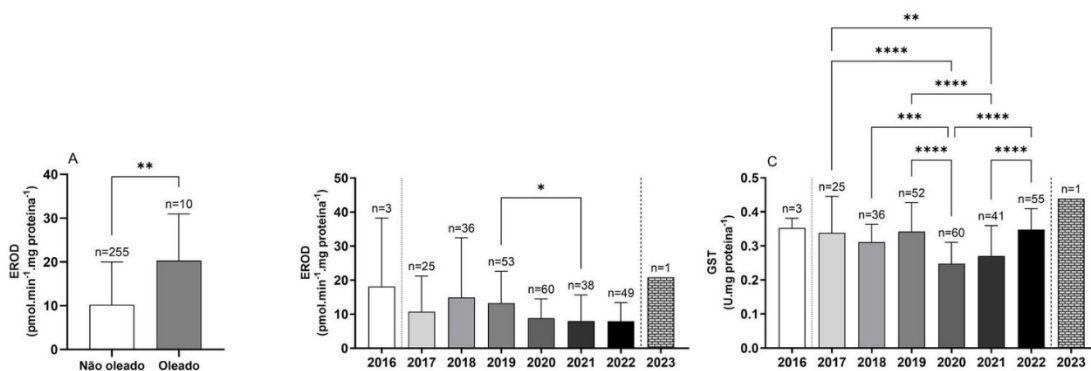


Figura 8-27A). Alexander e colaboradores (2017) observaram mudanças significativas nas atividades ARODs hepáticas em *Phalacrocorax auritus* expostos ao óleo MC252, sendo a EROD a atividade mais induzida.

As aves marinhas são particularmente vulneráveis à poluição por petróleo. Isso se deve em grande parte à sua dependência do ambiente marinho para alimentação e ao alto nível de interação com a superfície do mar para alimentação e descanso (MURPHY et al., 2022). Em *Cephus grylle*, espécie de ave da família dos alcídeos, coletados perto de áreas contaminadas com PCBs, foram reportados fígados aumentados e níveis elevados de EROD (FISK et al., 2005).

O comportamento das aves marinhas pode influenciar o grau de impacto sobre uma espécie quando exposta ao petróleo na superfície da água. Os *P. puffinus* são particularmente susceptíveis aos impactos negativos da poluição por hidrocarbonetos, uma vez que interagem com a superfície da água durante períodos prolongados de tempo, aumentando o risco de interação com contaminantes

superficiais (WILSON et al., 2009). Esta espécie também passa uma quantidade substancial de tempo em profundidade enquanto se alimenta, onde a pressão irá acelerar a percolação da água através das penas oleadas (SHOJI et al., 2015).

A

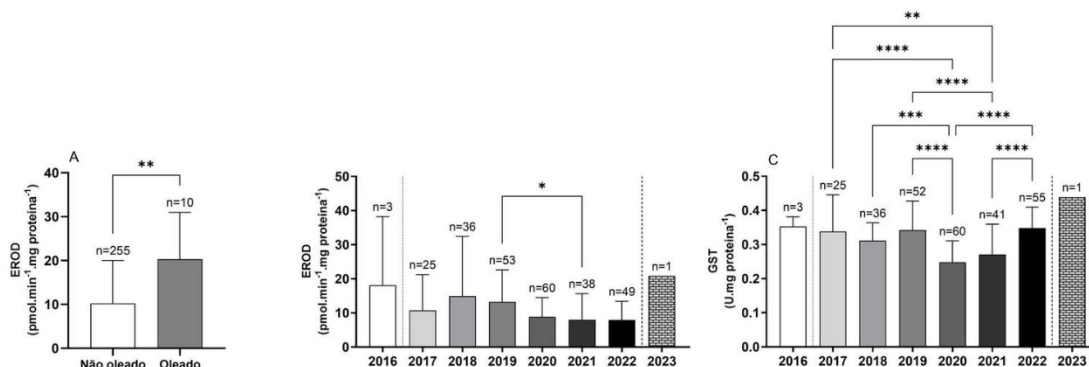


Figura 8-27B ilustra a variação anual da atividade EROD entre os anos de 2016 e 2023. Observa-se que a atividade EROD em indivíduos coletados em 2021 foi significativamente menor ($p < 0,05$) comparado aos indivíduos coletados em 2019. Na

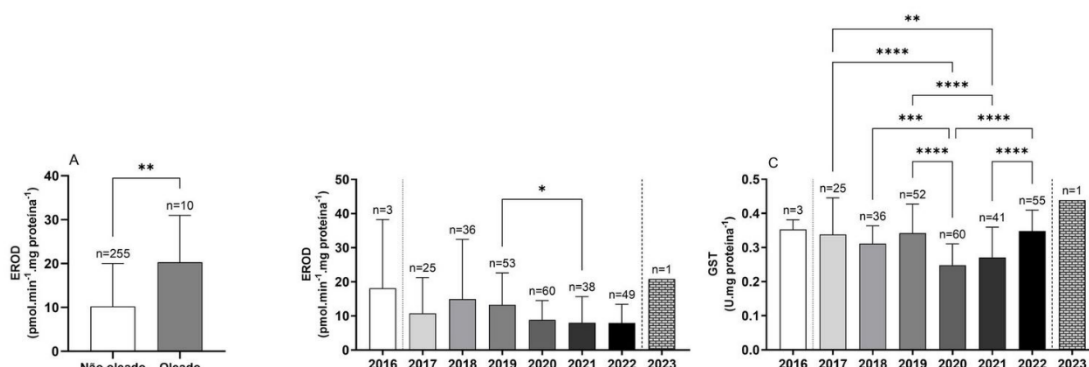


Figura 8-27C pode ser observada a variação anual da atividade GST em indivíduos coletados entre 2016 e 2023. Observa-se que a atividade desta enzima foi significativamente menor ($p < 0,05$) em indivíduos coletados em 2020 quando comparada aos anos de 2017, 2018, 2019 e 2022. Da mesma forma, a atividade GST dos indivíduos analisados em 2021 é significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparadas aos anos de 2017, 2018 e 2022.

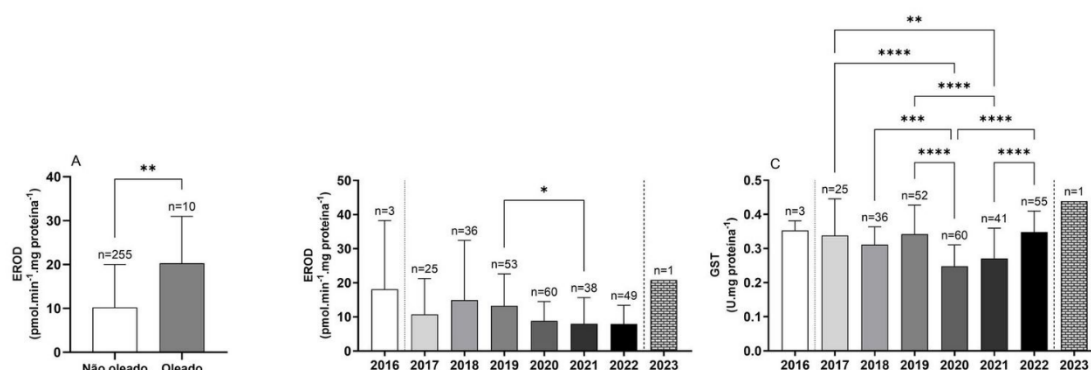


Figura 8-27 - Resultados das análises de atividade GST e EROD em tecido hepático de *Puffinus puffinus* em diferentes condições. (A) Atividade EROD entre indivíduos não-oleados e oleados. (B) Atividade EROD ao longo dos anos. (C) Atividade GST ao longo dos anos.

Calonectris borealis

Os resultados estatisticamente significativos obtidos para os biomarcadores avaliados em tecido hepático de *C. borealis* são apresentados na *Figura 8-28*. Os parâmetros que não apresentaram diferenças estatísticas são apresentados no **Apêndice 8 - Anexo B**.

Foi comparada a atividade EROD e GST entre fêmeas e machos de *C. borealis*. Os resultados mostraram que a atividade EROD nas fêmeas foi significativamente maior ($p < 0,05$) que nos machos (**Figura 8-28 A**). O mesmo padrão de resposta foi observado na atividade GST.

O sexo pode ter um papel crucial na toxicidade de xenobióticos devido a diferenças em absorção, metabolismo, distribuição e excreção. Muitos dos genes e enzimas associados a esses processos apresentam padrões sexo-específicos no fígado e rins (FITZSIMMONS et al., 2018), que podem ser atribuídos a influências hormonais endógenas (RUIZ et al., 2013). Os mecanismos responsáveis pelas enzimas de biotransformação hepáticas, dependentes do sexo, ainda não estão completamente entendidos (RUIZ et al., 2013).

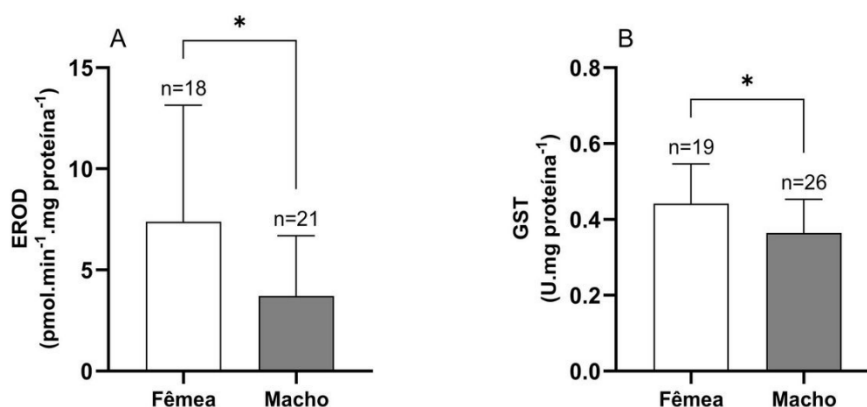


Figura 8-28 Resultados das análises de atividade (A) GST e (B) EROD em tecido hepático de *Calonectris borealis* em indivíduos fêmeas e machos.

Larus dominicanus

Os resultados estatisticamente significativos obtidos para os biomarcadores avaliados em tecido hepático de *L. dominicanus* são apresentados na **Figura 8-29**. Os parâmetros que não apresentaram diferenças estatísticas são apresentados no **Apêndice 8 - Anexo B**.

Em aves adultas a atividade EROD foi maior do que em indivíduos juvenis ($p < 0,05$), indicando um aumento da atividade enzimática com a idade (**Figura 8-29A**). 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, é observado um maior deslocamento de gaivotões para ilhas próximas ao litoral (REIS, 2014), o que pode acarretar em alterações quali-quantitativas no alimento destes animais, conforme observado em *Larus* spp (ANNETT; PIEROTTI, 1989; LUDYNIA; GARTHE; LUNA-JORQUERA, 2005; EBERT; BRANCO, 2009). Desta forma, indivíduos adultos estariam mais propícios a variações ambientais e a exposição a contaminantes.

Foi observado que a atividade EROD foi menor no verão comparado com as demais estações do ano ($p < 0,05$) (**Figura 8-29B**). Os resultados sugerem que as variações sazonais na atividade das enzimas podem ser influenciadas por fatores ambientais. Podemos inferir que os maiores níveis de atividade EROD refletem um aumento na exposição a contaminantes, mudanças na dieta, preparação para migração, ou um aumento na demanda metabólica para manter a homeostase em

temperaturas mais baixas (FOSSI; LEONZIO; FOCARDI, 1989; EBERT; BRANCO, 2009, RAJA-AHO et al., 2012). Essas variações sazonais indicam que a atividade da EROD é sensível a mudanças no ambiente e nas condições fisiológicas desta espécie.

Foram observadas variações significativas na atividade EROD ao longo dos anos, com 2023 apresentando uma atividade menor quando comparada ao ano de 2019 ($p < 0,05$) (**Figura 8-29C**), indicando possíveis mudanças nas condições ambientais ou outros fatores. Gaivotões coletados no ano de 2020 apresentaram menor atividade GST comparada aos demais anos de coleta ($p < 0,05$) (**Figura 8-29D**).

Parte dessas flutuações pode estar relacionada às variações fisiológicas ou exposição a contaminantes. Esses resultados corroboram estudos anteriores sobre os efeitos nocivos da poluição por óleo nas gaivotas, inclusive com as particularidades de cada sexo (LEE et al., 1985; ALONSO-ALVAREZ et al., 2007; NUMATA; FAWCETT; ROSENGREN, 2008).

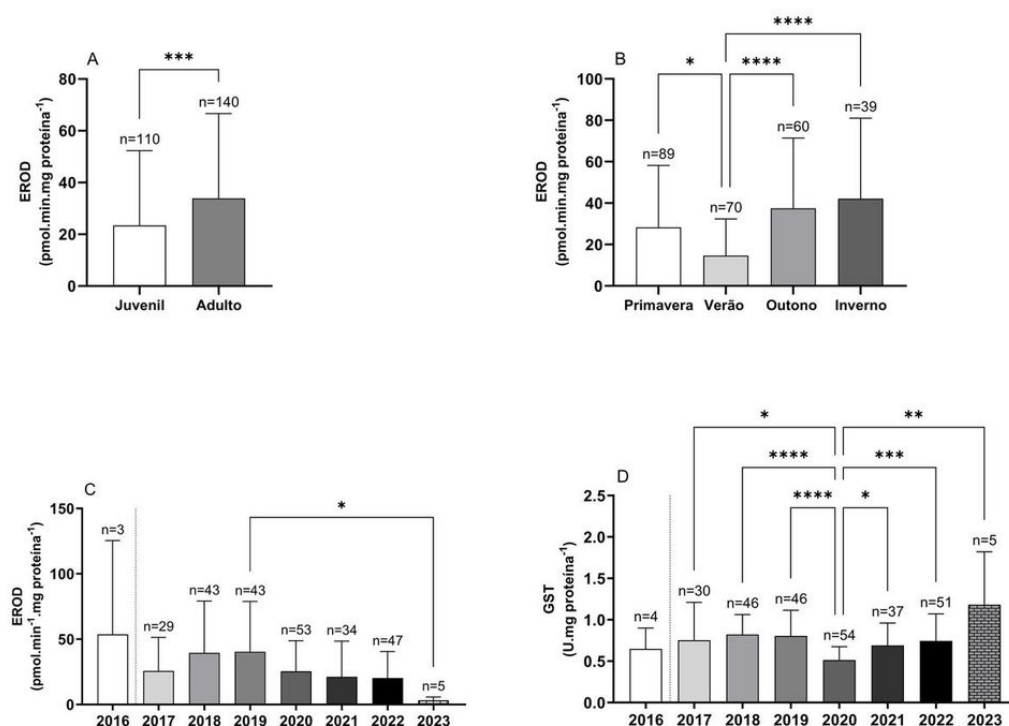


Figura 8-29 - Resultados das análises de atividade GST e EROD em tecido hepático de *Larus dominicanus* em diferentes condições. (A) Atividade EROD entre indivíduos juvenis e adultos. (B) Atividade EROD nas diferentes estações do ano. (C) Atividade EROD ao longo dos anos. (D) Atividade GST ao longo dos anos.

Resultados e discussão de atividade GST e EROD em quelônios

Para quelônios, as comparações entre grupos foram realizadas considerando os seguintes fatores: sexo, comprimento curvilíneo de carapaça (CCL; apenas *C. mydas*), sazonalidade, escore corporal, faixa etária (apenas *C. caretta*), ano de coleta, níveis de HPA prioritários no tecido hepático e presença de resíduos sólidos no trato gastrointestinal (TGI).

Caretta caretta

As análises de comparações entre grupos para a atividade GST e EROD não apresentaram diferenças estatísticas (**Apêndice 8 - Anexo B**). Além disso, algumas comparações não foram analisadas estatisticamente devido ao pequeno número amostral (**Apêndice 8 - Anexo B**).

Chelonia mydas

Os resultados estatisticamente significativos obtidos para os biomarcadores avaliados em tecido hepático de *C. mydas* são apresentados na **Figura 8-30**. Os parâmetros que não apresentaram diferenças estatísticas são apresentados no **Apêndice 8 - Anexo B**.

A atividade EROD foi significativamente maior ($p < 0,0001$) em amostras com a presença de resíduos sólidos no TGI (**Figura 8-30A**). A presença de resíduos sólidos no ambiente está relacionada a uma maior influência antropogênica, associada às descargas de efluentes sem tratamento primário. Dessa forma, a presença desses contaminantes no TGI de quelônios fornece indícios de que estes animais estiveram expostos, em um tempo relativamente recente, a uma maior carga de contaminantes.

O acúmulo de resíduos sólidos no TGI das tartarugas pode reduzir a ingestão de alimentos, provavelmente levando à saciedade induzida por plástico (SANTOS et al., 2020). Embora plásticos sejam considerados biologicamente inertes, diversos compostos químicos, tais como PBDEs, alquilfenóis, bisfenol A e ftalatos, são inseridos na matriz de seus polímeros a fim de conferir estabilidade térmica,

maleabilidade e resistência ao material (AVIO; GORBI; REGOLI, 2017; PETRY et al., 2021; SALA et al., 2021). Esses compostos são capazes de aumentar a produção de espécies reativas e causar desregulação endócrina e induzir danos ao DNA. PBDEs também são capazes de induzir a transcrição dos genes *CYP1A2*, *CYP3A4* e *GST M1* em humanos, indicando uma rota de biotransformação similar àquela observada para PCBs (STAPLETON et al., 2009).

Em relação ao comprimento curvilíneo da carapaça (CCL), a atividade EROD foi significativamente maior nos indivíduos com CCL menor que 30 cm ($p < 0,05$) (**Figura 8-30B**). O CCL pode ser utilizado como indicador de habitat em quelônios, uma vez há uma transição de um hábito oceânico para um costeiro quando o animal atinge certo tamanho ou maturidade. No caso de *C. mydas*, estima-se que este evento ocorra quando o animal atinge cerca de 30 cm.

Um estudo realizado por Veléz-Rubio et al. (2018) encontrou uma correlação negativa entre o CCL de indivíduos juvenis de *C. mydas* do Atlântico Sul e a massa de plásticos presente no trato digestivo. Esses dados indicam uma maior ocorrência de itens plásticos no trato digestivo de indivíduos oceânicos ou recém-recrutados (< 30 cm) para o ambiente costeiro. Segundo os autores, os resultados podem estar associados a uma menor capacidade de seleção de presas dos indivíduos mais novos e à manutenção do forrageio epipelágico, tipicamente desenvolvido nos ambientes oceânicos antes do recrutamento para o ambiente costeiro, favorecendo a ingestão de itens plásticos flutuantes.

Uma maior presença de itens plásticos em indivíduos oceânicos ou recém-recrutados poderia justificar os valores mais elevados de atividade EROD nos indivíduos com CCL < 30 cm. Essa hipótese é corroborada pelos resultados de atividade EROD em animais com presença de resíduos sólidos no TGI apresentados anteriormente.

A EROD em indivíduos com escore corporal bom e magro apresentou maior atividade em comparação aos indivíduos caquéticos ($p < 0,0001$) e sem diferença para os indivíduos considerados ótimos. Da mesma forma, a atividade GST foi maior nos indivíduos magros em comparação aos caquéticos ($p < 0,01$) (**Figura 8-30 C e D**). Considera-se que animais em estado corporal caquético e magro estejam em uma situação metabólica similar ao observado em jejum prolongado ou inanição (McCUE, 2010).

Postula-se que em situações de estresse, como privação de alimentos, anaerobiose, desidratação e baixas temperaturas, os organismos tendem a priorizar funções essenciais para sobrevivência, reduzindo atividades não essenciais (McCUE, 2010), como às relacionadas a biotransformação de xenobióticos, analisadas nesse trabalho. Isso significa que os resultados de biomarcadores obtidos em *C. mydas* devem considerar o estado de saúde, como um fator relevante na interpretação dos resultados obtidos.

A **Figura 8-30E** ilustra a variação anual da atividade EROD entre 2017 e 2021. Observa-se que a atividade EROD em animais coletados no ano de 2017 foi maior em comparação aos animais em 2018 ($p < 0,05$).

Na **Figura 8-30F** pode ser observada a variação anual da atividade da enzima GST em indivíduos coletados de 2017 a 2021. A atividade GST em animais coletados em 2019 foi significativamente menor em comparação aos anos de 2017, 2020 e 2021. A atividade GST nos animais coletados em 2020 e 2021 também foi maior em relação aos animais coletados em 2018 e 2019.

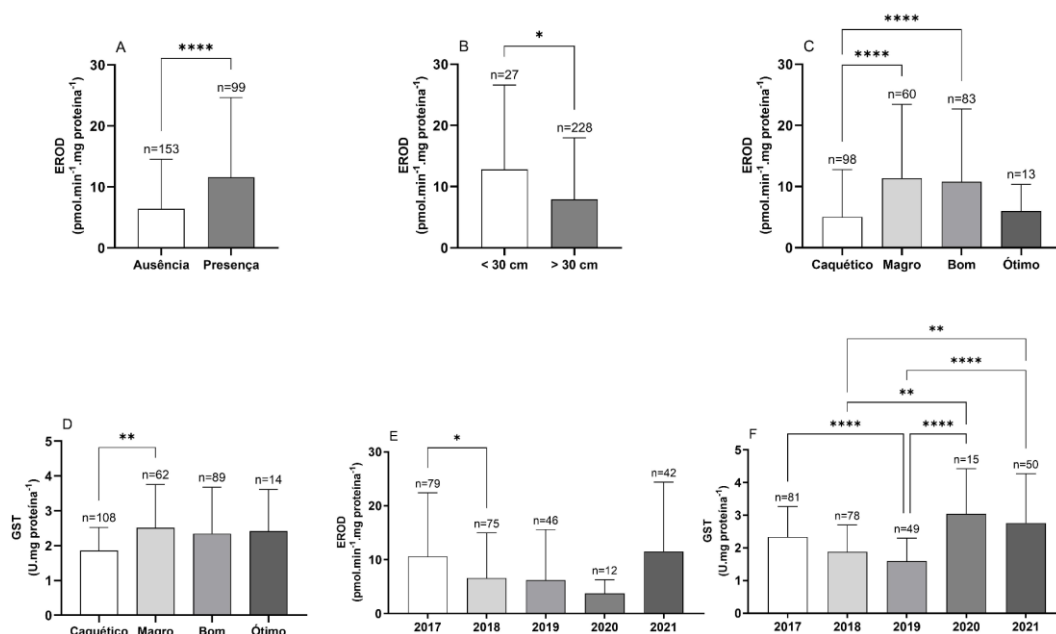


Figura 8-30 - Resultados das análises de atividade GST e EROD em tecido hepático de *Chelonia mydas* em diferentes condições. (A) Atividade EROD entre indivíduos na presença e na ausência de resíduos sólidos no trato gastrointestinal. (B) Atividade EROD em relação ao comprimento curvilíneo da carapaça. (C) Atividade EROD em relação ao escore corporal. (D) Atividade GST em relação ao escore corporal. (E) Atividade EROD ao longo dos anos e F) Atividade GST ao longo dos anos.

Resultados e discussão de atividade GST e EROD em cetáceos

Sotalia guianensis

Para o boto-cinza, as comparações entre grupos foram realizadas considerando os seguintes fatores: sexo, sazonalidade, escore corporal, faixa etária, ano de coleta, níveis de HPA prioritários no tecido hepático.

As análises de comparações entre grupos para a atividade GST e EROD não apresentaram diferenças estatísticas (**Apêndice 8 - Anexo B**).

8.6 Conclusões

Ao longo do período de referência foram padronizados os ensaios de atividade EROD e GST em *C. borealis*, *S. leucogaster*, *S. guianensis*, *C. caretta* e *L. olivacea*; e de imunodeteção de CYP1A em *S. leucogaster*, *C. borealis* e *S. guianensis*.

Finalizada a padronização, as atividades GST e EROD foram quantificadas em tecido hepático de *S. leucogaster*, *P. puffinus*, *C. borealis*, *L. dominicanus*, *C. caretta*, *C. mydas*, e *S. guianensis*. Os dados foram avaliados estatisticamente com fatores diversos, tais como sexo, local, ano e estação de coleta, faixa etária, escore corporal, e/ou níveis de HPAs bioacumulados, quando disponíveis.

Resultados para as espécies prioritárias que foram quantificadas:

- Em relação aos resultados reportados para *S. leucogaster*, a faixa etária, os anos de coleta e a sazonalidade influenciaram a resposta de EROD e GST;
- Em *P. puffinus*, ambas atividades GST e EROD variaram entre os anos de coleta. Adicionalmente, animais oleados apresentaram maior atividades EROD quando comparados aos não oleados, o que reforça o papel da EROD como importante biomarcador de exposição a HPAs em aves marinhas;
- Em *C. borealis*, EROD e GST variaram em relação ao sexo, com maiores atividades enzimáticas nas fêmeas em comparação aos machos;
- Em *L. dominicanus*, a atividade EROD foi relacionada ao estágio de vida, à estação e ao ano de coleta, com maior atividade em indivíduos adultos amostrados no inverno, indicando maior exposição de aves adultas a

contaminantes, além de possíveis alterações relacionadas à fisiologia da espécie;

- Nenhuma diferença estatística foi observada em *C. caretta*, considerando comparações referentes a sexo, sazonalidade, escore corporal, faixa etária, ano de coleta e níveis de HPA e resíduos sólidos no trato gastrointestinal.
- Em *C. mydas*, a atividade EROD foi significativamente maior em tartarugas com resíduos sólidos no trato gastrointestinal, e com CCL menor que 30 cm. Tartarugas verdes com escore corporal bom e magro também apresentaram maiores atividades EROD e GST maiores que indivíduos caquéticos. Também foram observadas variações anuais, reforçando a importância da continuidade na avaliação destes parâmetros ao longo de uma série temporal mais extensa;
- Nenhuma variação significativa foi observada em *S. guianensis* considerando os fatores sexo, sazonalidade, escore corporal, faixa etária, ano de coleta e níveis de HPA.

Para todas as espécies analisadas, as atividades hepáticas de EROD e GST aparentemente não foram influenciadas pelos níveis de HPA totais bioacumulados no mesmo tecido.

Em relação aos biomarcadores moleculares, foram selecionados os pares de iniciadores para a quantificação de transcritos de *GSTA* em *P. puffinus*, *L. dominicanus* e *C. mydas*, e de *VTG* em *P. puffinus* e *C. mydas*. Também foram processadas as amostras para sequenciamento de transcriptoma de *C. caretta*, *L. olivacea*, *C. borealis*, *S. leucogaster* e *S. guianensis*.

8.7 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, C.R.; HOOPER, M.J.; CACELA, D.; SMELKER, K.D.; CALVIN, C.S.; DEAN, K.M.; BURSIA, S.J.; CUNNINGHAM, F.L.; HANSON-DORR, K.C.; HORAK, K.E.; ISANHART, J.P.; LINK, J.; SHRINER, S.A.; GODARD-CODDING, C.A.J. Reprint of: 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.

ALMEIDA, A.P.; SANTOS, A.J.B.; THOMÉ, J.C.A.; BELINI, C.; BAPTISTOTTE, M.A.; MARCOVALDI, A.S.; SANTOS, M. LOPEZ. Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 1, p. 12-19, 2011.

ALONSO-ALVAREZ, C.; PÉREZ, C.; VELANDO, A. Effects of acute exposure to heavy fuel oil from the Prestige spill on a seabird. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 1, p. 103-110, 2007.

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

AVIO, C.G.; GORBI, S.; REGOLI, F. Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat. **Marine Environmental Research**, v. 128, p. 2-11, 2017.

BACHMAN, M.J.; FOLTZ, K.M.; LYNCH, J.M.; WEST, K.L.; JENSEN, B.A. Using cytochrome P4501A1 expression in liver and blubber to understand effects of persistent organic pollutant exposure in stranded Pacific Island cetaceans. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, p. 1989-1995. 2015.

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.; MACHADO, I.F.; BOVENDORP, M.S.; VERANI, J.R. Dieta de *Sula leucogaster* Boddaert (Sulidae, Aves), nas Ilhas Moleques do Sul, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, p. 1044-1049, 2005.

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.

BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Ethoxyresorufin: direct fluometric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylchloranthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 2, p. 583-588. 1974.

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.

CHANG, T.K.H.; WAXMAN, D.J. **Cytochrome P450 Nomenclature**. In: PHILLIPS, I.R.; SHEPHARD, E.A. (Ed.). *Cytochrome P450 Protocols*. 2. ed. New Jersey: Humana Press Inc, p. 73-84. 2006.

COMITÉ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS (CBRO). Lista das Aves do Brasil. 11ed. 2014. 41p. Disponível em: <http://www.cbro.org.br/CBRO/listabr.htm>. Acesso em 10/04/2024.

COULET, M.; EECKHOUTTE, C.; GALTIER, P. Ontogenic development of drug-metabolizing enzymes in male chicken liver. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, v. 74, n. 1, p. 32-37, 1996.

COZMA, C.; EICHLER, S.; WITTMANN, G.; BONET, A.F.; KRAMP, G.J.; GIESE, A.; ROLFS, A. Diagnosis of morquio syndrome in dried blood spots based on a new MRM-MS assay. **PLOS one**, v. 10, p. 1-14, 2015.

EBERT, P.R.; LAILSON-BRITO, J.; AZEVEDO, A.F.; MEYER, J.; VIDAL, L.G.; FRAGOSO, A.B.; TORRES, J.P.; MALM, O.; BLUST, R.; DAS, K. High accumulation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in marine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis*) from the Brazilian coast. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 5368-5373, 2008.

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.

ESCORCIA, M.; SÁNCHEZ-GODOY, F.; RAMOS-VIDALES, D.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Effect of the Age and Body Weight of the Broiler Breeders Male on the Presentation of Oxidative Stress and Its Correlation with the Quality of Testicular Parenchyma and Physiological Antioxidant Levels. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 2, p. 69, 2020.

FIISK, A.T.; DE WIT, C.A.; WAYLAND, M.; KUZYK, Z.Z.; BURGESS, N.; LETCHER, R.; MUIR, D.C.G. An assessment of the toxicological significance of anthropogenic contaminants in Canadian arctic wildlife. **Science of the Total Environment**, v. 351-352, p. 57-93, 2005.

FITZSIMMONS, P.N.; HOFFMAN, A.D.; FAY, K.A.; NICHOLS, J.W. Allometric scaling of hepatic biotransformation in rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 214, p. 52-60, 2018.

FOSSI, M.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.

GAGNÉ, F. Quantitative assessments of biochemical analyses. In: **Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods**. Elsevier. 2014. p. 1-19.

GUILFORD, T.; MEADE, J.; WILLIS, J.; PHILLIPS, R.A.; BOYLE, D.; ROBERTS, S.; COLLETT, M.; FREEMAN, R.; PERRINS, C.M. Migration and stopover in a small pelagic seabird, the Manx shearwater *Puffinus puffinus*: insights from machine learning. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 276, p. 1215-1223, 2009.

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398-405. 1981.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

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.

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.

LEE, Y.-Z.; LEIGHTON, F.A.; PEAKALL, D.B.; NORSTROM, R.J.; O'BRIEN, P.J.; PAYNE, J.F.; RAHIMTULA, A.D. Effects of ingestion of Hibernia and Prudhoe Bay crude oils on hepatic and renal mixed function oxidase in nestling herring gulls (*Larus argentatus*). **Environmental Research**, v. 36, p. 248-255, 1985.

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.

LOPES, B.D. **Variação espacial e temporal do derramamento de óleo na costa do Ceará, Brasil (2019-2020)**. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Ciências Ambientais, Fortaleza, 77f. 2021.

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.

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.

MEYLAN, A.B.; MEYLAN, P.A. **An introduction to the evolution, life history, and biology of sea turtles**. In: ECKERT, K.L., BJORNDALE K.A., ABREU-GROBOIS, F.A., DONNELLY, M., editors. Research and Management techniques for the Conservation of sea turtles. Pennsylvania: Consolidated Graphic Communications. **IUCN/ssC Publication**, v. 4. p. 3-5, 1999.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1215, 1988.

MURCIA, H.W.; DIAZ, G.J. Protective effect of glutathione S-transferase enzyme activity against aflatoxin B1 in poultry species: relationship between glutathione s-transferase enzyme kinetic parameters, and resistance to aflatoxin b1. **Poultry Science**, v. 100, n. 8, p. 101235, 2021.

MURPHY, E. et al. Light to intermediate oil sheens increase Manx shearwater feather permeability. **Royal Society Open Science**, v. 9, n. 10, p. 1-11, 2022.

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

NUMATA, M.; FAWCETT, J.P.; ROSENGREN, R.J. Induction of in vitro EROD activity and in vivo caffeine metabolism in two species of New Zealand birds. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 358-364, 2008.

NUMATA, M.; FAWCETT, J.P.; SAVILLE, D.J.; ROSENGREN, R.J. Hepatic cytochrome P450 activity and pollutant concentrations in paradise shelducks and southern black-backed gulls in the South Island of New Zealand. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 697-708, 2008.

PETRY, M.V.; ARAÚJO, L.D.; BRUM, A.C.; BENEMANN, V.R.F.; FINGER, J.V.G. Plastic ingestion by juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) off the coast of Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 167, p.112337, 2021.

RAJA-AHO, S.; KANERVA, M.; EEVA, T.; LEHIKONEN, 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.

RAMOS, R.M.A.; DI BENEDITTO, A.P.M.; LIMA, N.R.W. Growth parameters of *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis* (Cetacea) in northern Rio de Janeiro, Brazil. **Aquatic Mammals**, v. 26, p. 65-75, 2000.

RUIZ, M.L.; MOTTINO, A.D.; CATANIA, V.A.; VORE, M. Hormonal Regulation of Hepatic Drug Biotransformation and Transport Systems. **Comprehensive Physiology**, v. 22, p. 1721-1740, 2013.

SALA, B.; BALASCH, A.; ELJARRAT, E.; CARDONA, L. First study on the presence of plastic additives in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from the Mediterranean Sea. **Environmental Pollution**, v. 283, p. 117108, 2021.

SANTOS, R.G.; ANDRADES, R.; DEMETRIO, G.R.; KUWAI, G.M.; SOBRAL, M.F.; VIEIRA, J.S.; MACHOVSKY-CAPUSKA, G.E. Exploring plastic-induced satiety in foraging green turtles. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114918, 2020.

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.

SHOJI, A.; ARIS-BROSOU, S.; FAYET, A.; PADGET, O.; PERRINS, C.; GUILFORD, T. Dual foraging and pair coordination during chick provisioning by Manx shearwaters: empirical evidence supported by a simple model. **The Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 2116-2123, 2015.

STAPLETON, H.M.; KELLY, S.M.; PEI, R.; LETCHER, R.J.; GUNSCH, C. Metabolism of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by human hepatocytes in vitro. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, p. 197-202, 2009.

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.

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.

VELANDO, A.; MUNILLA, I.; LÓPEZ-ALONSO, M.; FREIRE, J.; PEREZ, C. EROD activity and stable isotopes in seabirds to disentangle marine food web contamination after the Prestige oil spill. **Environmental Pollution**, v. 158, p.1275-1280. 2010.

VELÉZ-RUBIO, G.M.; TERYDA, N.; ASAROFF, P.E.; ESTARDES, A.; RODRIGUEZ, D.; TOMÁS, J. Differential impact of marine debris ingestion during ontogenetic dietary shift of green turtles in Uruguayan waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 127, p. 603-611, 2018.

VIDAL, L.G. et al. Pyrethroid insecticides along the Southwestern Atlantic coast: guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) as a bioindicator. **Science of the Total Environment**, v. 728, p. 138749, 2020.

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

WANWIMOLRUK, S.; WANWIMOLRUK, P. Characterization of CYP1A enzyme in Adélie penguin liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 144, p. 148-154. 2006.

WHITE, R.D.; SHEA, D.; SCHLEZINGER, J.J.; HAHN, M.; STEGEMAN, J.J. In vitro metabolism of polychlorinated biphenyl congeners by beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and pilot whale (*Globicephala melas*) and relationship to cytochrome P450 expression. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 126, p. 267-284, 2000.

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.

WILKINSON, J.H. Enzyme kinetics and its relevance to enzyme assay. **Journal of Clinical Pathology**, v. 24, p. 14-21, 1971.

WILSON, J.Y.; WELLS, R.; AGUILAR, A.; BORRELL, A.; TORNERO, V.; REIJNDERS, P.; MOORE, M.; STEGEMAN, J.J. Correlates of cytochrome P450 1A1 expression in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) integument biopsies. **Toxicological Sciences**, v. 97, p. 111-119. 2007.

WILSON, L.J.; MCSORLEY, C.A.; GRAY, C.M.; DEAN, B.J.; DUNN, T.E.; WEBB, A.; REID, J.B. Radio-telemetry as a tool to define protected areas for seabirds in the marine environment. **Biol. Conserv.**, v. 142, p. 1808-1817, 2009.

YAWETZ, A.; WODIN, B.; STEGMAN, J.J. Cytochromes P450 in liver of the turtle *Chrysemys picta picta* and the induction and partial purification of CYP1A-like proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1381, p. 12-26. 1998.

ZHANG, W.; NIU, C.; LIU, Y.; CHEN, B. Glutathione redox balance in hibernating Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* hatchling. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 207, p. 9-14. 2017.

9 ANÁLISES DE FINGERPRINT

O Projeto Executivo Integrado do PMP-BS contempla o registro de qualquer resíduo oleoso e a realização de análises de *fingerprint* para amostras de óleo ou borra oleosa coletadas pelas equipes em praias ou animais. Os procedimentos de coleta, armazenamento e envio destas amostras estão descritos no Protocolo de Atividades 8.

A análise de “*fingerprint*” é um estudo geoquímico realizado por meio de técnicas analíticas consagradas mundialmente, como a cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama e detecção por espectrometria de massas, com o objetivo de caracterizar e identificar amostras de fluidos oleosos e borras oleosas desconhecidas, correlacionando-as, sempre que possível, à um petróleo cru ou a algum derivado de petróleo, fornecendo assim, informações sobre sua natureza e/ou origem.

Dentre as informações apresentadas nesta seção constam: a apresentação das atividades e empreendimentos da Petrobras em operação na Bacia de Santos para o período de referência, os registros de incidentes ambientais relacionados, os registros de resíduos oleosos e de fauna oleada e seus respectivos resultados das análises de *fingerprint*, bem como resultados consolidados de anos anteriores de registros de resíduos oleosos e de fauna oleada obtidos pelo PMP-BS. Desde 2022, esta seção apresenta as informações que anteriormente constavam nos Relatórios Anuais de Análises de *Fingerprint* do PMP-BS, em atendimento ao disposto nos Pareceres Técnicos nº 491/2021-COPROD/CGMAC/DILIC e nº 172/2022-COPROD/CGMAC/DILIC, que requisitaram a apresentação de relatório único para o PMP-BS.

9.1 ATIVIDADES E EMPREENDIMENTOS EM OPERAÇÃO

Dentre as atividades da Petrobras executadas no período de referência na Área Geográfica da Bacia de Santos (AGBS) estão: o levantamento de dados sísmicos, a perfuração, completação, avaliação e intervenção de poços, bem como as atividades de produção e escoamento de petróleo. As atividades de pesquisa sísmica marítima contemplaram a aquisição nos Campos de Tupi-Iracema (iniciada em dezembro de 2021 e encerrada em abril de 2023), Itapu (de outubro de 2022 a janeiro de 2023), Aram (março a julho de 2023), Iara (maio a dezembro de 2023), Sapinhoá Monitor (de agosto de 2023 a janeiro de 2024). Foram perfurados 37 poços na AGBS de janeiro a dezembro de 2023 (computados a partir do mês de início da perfuração). Dentre as atividades de produção, registra-se para 2023 a continuidade da operação de 24 unidades da Petrobras instaladas, bem como o início da produção do FPSO Almirante Barroso em maio/2023 no campo de Búzios e do FPSO Sepetiba em dezembro/2023, no campo de Mero, totalizando 26 unidades de produção em operação ao final do período de referência (janeiro a dezembro/23).

A localização da AGBS, campos e plataformas de produção da Petrobras encontram-se representados na **Figura 9-1**.

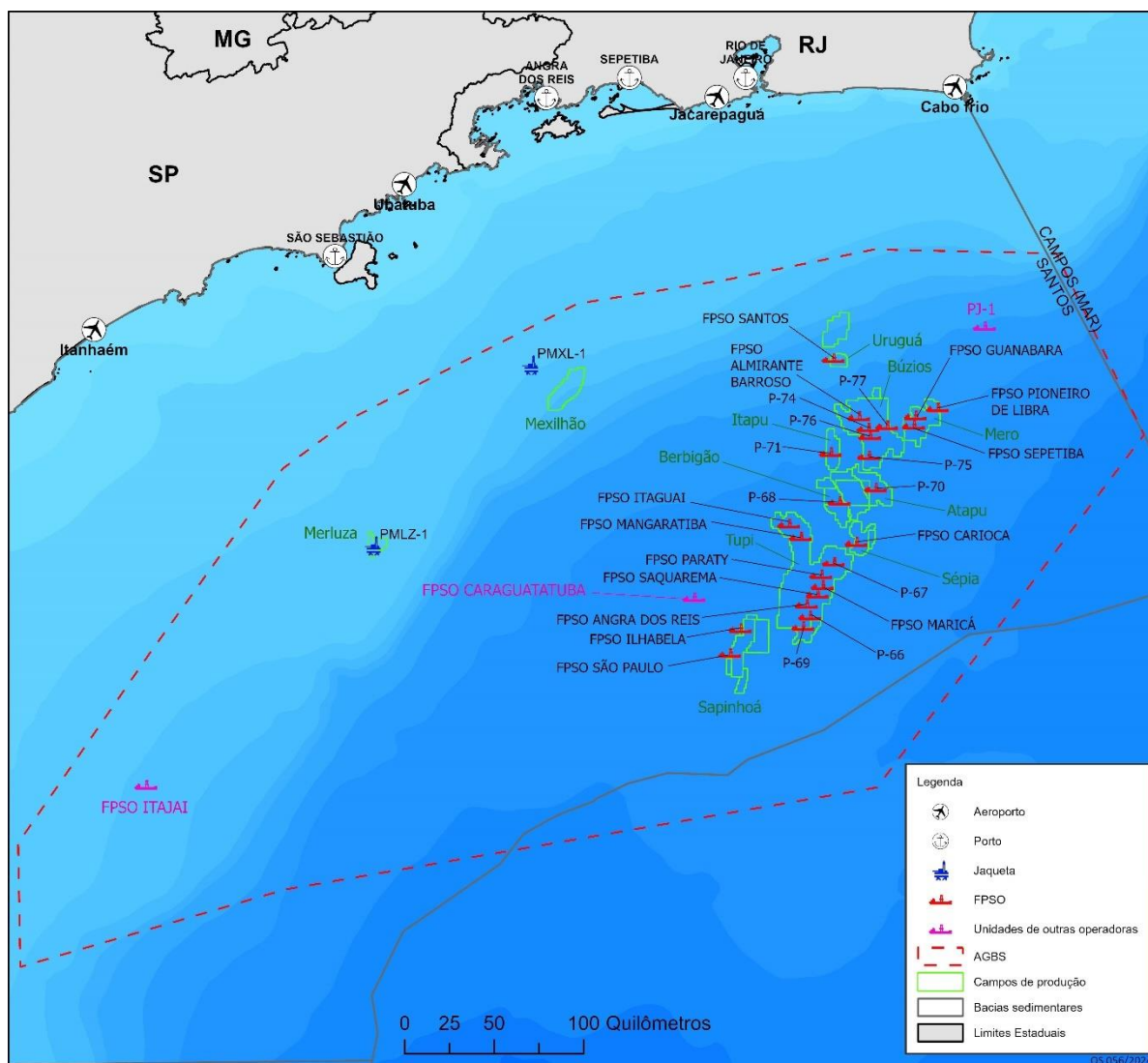


Figura 9-1 – Mapa com a AGBS, unidades de produção da Petrobras e de outras operadoras na Bacia de Santos.

9.2 REGISTROS DE INCIDENTES AMBIENTAIS

A seguir, na **Tabela 9-1** são apresentados os dados dos incidentes nas atividades da Petrobras na Bacia de Santos, inclusive informações de descartes das plataformas de perfuração (“NS” – Navios Sondas), além de plataformas de produção. Observa-se que ao todo foram 61 incidentes de descarga no mar no período de referência, totalizando um volume aproximado de 57.716,28 litros, com destaque para as descargas de fluido de perfuração/base água (46.650 litros), fluido sintético de perfuração (9.538,82 litros) e fluido hidráulico/base água (1.443,31). E, em menores quantidades, óleo diesel (6,43 litros) e petróleo bruto (3,82 litros).

Tabela 9-1 – Relação de incidentes de descarga no mar por atividades/empreendimentos da Petrobras na Bacia de Santos entre 01/01/2023 e 31/12/2023.

Nº	Data do Incidente	Unidade	Volume (Litros)	Tipo do Incidente	Substância Descarregada	CADINCs
1	01/01/23	NS-54	4	Descarga menor de material com alto potencial de dano	Fluido hidráulico base água	POCOS/CAMAP-AUP-0001/2023
2	10/01/23	P-67	0,17	Descarga menor de óleo	Óleo diesel	UN-BS-0003/2023
3	12/01/23	FPSO Cidade de São Paulo	0,018	Descarga menor de óleo	Óleo lubrificante	UN-BS-0010/2023
4	16/01/23	P-74 (poço 9-RJS-709)	4	Descarga menor de fluido de perfuração, completação ou intervenção em poços	Fluido sintético de perfuração	BUZIOS-0002/2023
5	18/01/23	P-68 (poço 3-RJS-715D)	0,6	Descarga menor de fluido de perfuração, completação ou intervenção em poços	Fluido sintético de perfuração	UN-BS-0014/2023
6	30/01/23	FPSO Cidade de Angra dos Reis	0,6	Descarga menor de óleo; Perda de contenção primária significativa de óleo	Óleo diesel	UN-BS-0025/2023
7	07/02/23	FPSO Cidade de Saquarema	0,2	Descarga menor	Petróleo bruto	UN-BS-0034/2023 (Retificador)
8	09/02/23	FPSO Cidade de Mangaratiba	48,8	Descarga menor	Fluido sintético de perfuração	UN-BS-0039/2023 (Retificador)
9	13/02/23	FPSO Pioneiro de Libra	0,1	Descarga menor	Água oleosa	UN-MERO-0004/2023
10	23/02/23	FPSO Carioca	0,02	Descarga menor	Outros (hidrocarbonetos - graxa)	UN-BS-0045/2023
11	28/02/23	FPSO Cidade de Maricá	0,1	Descarga menor	Óleo lubrificante	UN-BS-0048/2023
12	05/03/23	FPSO Cidade de Maricá	1	Descarga menor	Petróleo bruto	UN-BS-0058/2023 (Retificador)
13	17/03/23	P-77	4	Descarga significativa	Água oleosa	BUZIOS-0024/2023 (Retificador)
14	06/04/23	FPSO Almirante Barroso	1	Descarga menor, Perda de contenção primária significativa	Óleo diesel	BUZIOS-0036/2023
15	11/04/23	P-71	2	Descarga menor	Água oleosa	UN-BS-0092/2023
16	14/04/23	FPSO Cidade de Angra dos Reis	0,05	Descarga menor	Óleo diesel	UN-BS-0094/2023
17	14/04/23	P-75	0,3	Descarga menor	Óleo diesel	BUZIOS-0037/2023
18	19/04/23	P-76	12,8	Descarga menor	Água oleosa	BUZIOS-0041/2023
19	20/04/23	P-77	-	Constatação de mancha de origem indeterminada	Outros (hidrocarbonetos)	BUZIOS-0042/2023
20	01/05/23	P-74	40,347	Descarga menor	Fluido sintético de perfuração	BUZIOS-0047/2023

Nº	Data do Incidente	Unidade	VOLUME (Litros)	Tipo do Incidente	Substância Descarregada	CADINCS
21	07/05/23	P-74	3	Descarga menor	Óleo diesel	UN-BUZIOS-0048/2023
22	14/05/23	Área Geográfica da Bacia de Santos	-	Constatação de mancha de origem indeterminada	Outros (hidrocarbonetos)	UN-BS-0112/2023 (Retificador)
23	28/05/23	P-70	3,3	Descarga menor	MEG	UN-BS-087- V1
24	12/06/23	P-75	0,5	Descarga menor	Fluido hidráulico base óleo	UN-BUZ-123
25	19/06/23	P-75	60	Descarga menor	Fluido sintético de perfuração	UN-BUZ-146
26	21/06/23	FPSO Cidade de Mangaratiba	15	Descarga menor	Outros (produtos químicos)	UN-BS-168
27	25/06/23	P-71	1800,116	Descarga significativa	Fluido sintético de perfuração	UN-BS-181-V1
28	25/06/23	NS-39	28,8	Descarga menor	Fluido hidráulico base água	POCOS/SM-186
29	03/07/23	NS-39	1,02	Descarga menor, falha no <i>Blowout Preventer</i> (BOP)	Fluido hidráulico base água	POCOS/SM-204
30	11/07/23	7-MRO-33-RJS	12,96	Descarga menor	Fluido sintético de perfuração	POCOS/CAMAP-AUP-260 (Retificador)
31	19/07/23	NS-39	6,5	Descarga menor	Fluido hidráulico base óleo	POCOS/SM-309
32	28/07/23	P-69	0,4	Descarga menor	Água oleosa	UN-BS-334
33	28/07/23	NS-54	0,16	Descarga menor	Fluido hidráulico base óleo	POCOS/SM-327
34	03/08/23	P-75	7407	Descarga significativa; Perda de contenção primária significativa	Fluido sintético de perfuração	UN-BUZ-370-V8
35	09/08/23	NS-32	42000	Descarga maior; Desconexão de emergência	Fluido de perfuração base água	POCOS/SM-387 (Retificador)
36	11/08/23	NS-44	800	Descarga significativa	Fluido hidráulico base água	POCOS/SM-401
37	11/08/23	NS-44	1,48	Descarga menor; Falha no <i>Blowout Preventer</i> (BOP)	Fluido hidráulico base água	POCOS/SM-402
38	17/08/23	NS-39	14,74	Falha no <i>Blowout Preventer</i> (BOP); Descarga menor	Fluido hidráulico base água	POCOS/SM-429
39	20/08/23	NS-54	4610	Descarga significativa	Fluido de perfuração base água	POCOS/SM-438
40	25/08/23	P-75	0,2	Descarga menor	Óleo diesel	UN-BUZ-365
41	25/08/23	NS-38	40	Falha no <i>Blowout Preventer</i> (BOP); Descarga menor	Fluido de perfuração base água	POCOS/SM-470
42	28/08/23	NS-45	0,75	Descarga menor	Petróleo bruto	POCOS/SPO-485

Nº	Data do Incidente	Unidade	Volume (Litros)	Tipo do Incidente	Substância Descarregada	CADINCs
43	31/08/23	P-71	1	Descarga menor	Petróleo bruto	UN-BS-503
44	02/09/23	P-77	0,6	Descarga menor	Petróleo bruto	UN-BUZ-508
45	02/09/23	AKER WAYFARER	0,271	Descarga menor	Petróleo bruto	POCOS/CAMAP-AUP-512-V1
46	20/09/23	NS-45	30	Falha no <i>Blowout Preventer</i> (BOP); Descarga significativa	Fluido hidráulico base água	POCOS/SM-604
47	21/09/23	NS-45	0,21	Abalroamento menor ; Descarga menor	Óleo diesel	POCOS/SM-600 (Retificador)
48	30/09/23	FPSO Cidade de Mangaratiba	120	Descarga menor	Fluido sintético de perfuração	UN-BS-654
49	13/10/23	P-67	4	Descarga menor	Água oleosa	UN-BS-727
50	04/11/23	FPSO Guanabara	45	Descarga menor	Fluido sintético de perfuração	UN-MERO-846
51	11/11/23	FPSO Cidade de Angra dos Reis	20	Descarga menor	Fluido hidráulico base água	UN-BS-871
52	14/11/23	P-74	0,3	Descarga menor	Óleo diesel	UN-BUZ-885
53	16/11/23	NS-54	0,7	Descarga menor	Fluido hidráulico base água	POCOS/CAMAP-AR-AP-896 (Retificador)
54	16/11/23	NS-44	25,72	Falha no <i>Blowout Preventer</i> (BOP); Descarga significativa	Fluido hidráulico base água	POCOS/SM-902
55	17/11/23	NS-54	0,05	Perda de contenção primária significativa; Descarga menor	Fluido hidráulico base água	POCOS/CAMAP-AUP-898 (Retificador)
56	19/11/23	NS-38	0,6	Descarga menor	Óleo diesel	POCOS/SM-906
57	26/11/23	P-71	4	Descarga menor	Água oleosa	UN-BS-939
58	01/12/23	FPSO Almirante Barroso	1	Descarga menor	Fluido hidráulico base óleo	UN-BUZ-959
59	01/12/23	FPSO Sepetiba	20	Descarga menor	Fluido hidráulico base óleo	UN-MERO-961
60	02/12/23	NS-44	4	Falha no <i>Blowout Preventer</i> (BOP); Descarga menor	Fluido hidráulico base água	POCOS/SM-972
61	21/12/23	FPSO Almirante Barroso	512,8	Descarga significativa	Fluido hidráulico base água	UN-BUZ-1061

9.3 REGISTROS DE RESÍDUOS OLEOSOS

Considerando o período de referência deste relatório (01/01/2023 a 31/12/2023), foram registradas 22 ocorrências de resíduos oleosos para a área de abrangência do PMP-BS, todas as amostras foram coletadas e as informações constam na

Tabela 9-2.

As equipes do PMP-BS Área SC/PR realizaram 4 registros de resíduos oleosos, sendo todos através do monitoramento ativo das praias. Já as equipes do PMP-BS Área SP realizaram 15 registros de resíduos oleosos, sendo 13 através do monitoramento ativo das praias e 2 por acionamento. E, por fim, as equipes do PMP-BS Área RJ realizaram 3 registros de resíduos oleosos, sendo 2 através do monitoramento ativo das praias e 1 por acionamento. Estas amostras de resíduos oleosos coletadas foram categorizadas em campo quanto à matriz, como pelotas de piche (21 amostras) e o restante como óleo (1 amostra).

Para todas estas ocorrências de resíduos oleosos realizou-se a coleta de amostras para análises de *fingerprint*, realizadas no Centro de Pesquisas & Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES).

Os resultados destas análises de *fingerprint* indicaram que 17 das 22 amostras de resíduos oleosos coletadas correspondiam a derivados, 4 amostras correspondiam a petróleo/óleo cru de origem estrangeira, ou seja, nenhuma amostra relacionada a óleos crus produzidos na Bacia de Santos e em 1 amostra não foi possível determinar a natureza do resíduo oleoso recuperado.

O Trecho 10 foi a região com maior número de amostras de resíduos oleosos coletados em 2023 (13 amostras), padrão semelhante ao observado nos relatórios anteriores (período de referência: ano de 2021 e 2022). O mês de dezembro foi o mês com maior número de amostras coletadas em 2023 (5 amostras), seguido do mês de junho que teve 4 amostras coletadas.




Cabe ressaltar que todas estas análises estão devidamente registradas no SIMBA.

Tabela 9-2 - Ocorrências de resíduos oleosos registrados pelo PMP-BS entre 01/01/2023 e 31/12/2023.

Nº	Data da coleta	Trecho (Instituição)	Município/Estado	Monitoramento	Código da Amostra	Matriz	Resultado	Nº Comunicação Técnica
1	02/01/2023	Trecho 15 - Econservation	Maricá - RJ	Regular	PIC-000-0787	Piche	Derivado	001/2023
2	27/02/2023	Trecho 09	Guarujá - SP	Regular	PIC-000-0792	Piche	Derivado	002/2023
3	06/04/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Regular	PIC-000-0797	Piche	Derivado	003/2023
4	16/04/2023	Trecho 10	Caraguatatuba - SP	Regular	PIC-000-0799	Piche	Derivado	004/2023
5	28/04/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Regular	PIC-000-0800	Piche	Derivado	005/2023
6	08/05/2023	Trecho 11 - Econservation	Paraty - RJ	Acionamento	OLE-000-0801	Óleo	Derivado	006/2023
7	09/05/2023	Trecho 06	Guaratuba - PR	Regular	PIC-000-0802	Piche	Óleo Cru Estrangeiro	009/2023
8	02/06/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Regular	PIC-000-0815	Piche	Óleo Cru Estrangeiro	007/2023
9	02/06/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Regular	PIC-000-0816	Piche	Derivado	008/2023
10	05/06/2023	Trecho 15 - Econservation	Maricá - RJ	Regular	PIC-000-0819	Piche	Derivado	010/2023
11	30/06/2023	Trecho 08	Mongaguá, Praia Grande - SP	Acionamento	PIC-000-0821	Piche	Derivado	011/2023
12	11/08/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Regular	PIC-000-0822	Piche	Derivado	007/2024
13	11/08/2023	Trecho 06	Pontal Do Paraná - PR	Regular	PIC-000-0823	Piche	Derivado	008/2024
14	12/08/2023	Trecho 10	Ilhabela - SP	Regular	PIC-129-0001	Piche	Derivado	009/2024
15	17/10/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Regular	PIC-000-0842	Piche	Derivado	013/2024
16	18/10/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Regular	PIC-000-0843	Piche	Derivado	014/2024
17	29/11/2023	Trecho 06	Matinhos - PR	Regular	PIC-000-0853	Piche	Óleo Cru Estrangeiro	016/2024
18	01/12/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Acionamento	PIC-000-0854	Piche	Derivado	017/2024
19	07/12/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Regular	PIC-000-0856	Piche	Derivado	018/2024
20	08/12/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Regular	PIC-000-0857	Piche	Outros*	019/2024
21	18/12/2023	Trecho 10	Ubatuba - SP	Regular	PIC-000-0858	Piche	Óleo Cru Estrangeiro	020/2024
22	21/12/2023	Trecho 06	Matinhos - PR	Regular	PIC-000-0860	Piche	Derivado	021/2024

* A baixa recuperação de resíduo oleoso, a ausência de n-parafinas ou de UCM (*Unresolved Complex Mixture*) observadas na análise cromatografia gasosa e a distribuição irregular de biomarcadores limitam a determinação da natureza do resíduo oleoso recuperado.

Abaixo seguem imagens das 22 ocorrências de resíduos oleosos (Figura 9-2) e respectivos códigos de amostra registrados pelo PMP-BS entre 01/01/2023 e 31/12/2023.

 <p>PIC-000-0860 - Derivado</p>	 <p>PIC-000-0853 - Óleo Cru Estrangeiro</p>	 <p>PIC-000-0802 - Óleo Cru Estrangeiro</p>
 <p>PIC-000-0823 - Derivado</p>	 <p>PIC-000-0858 - Óleo Cru Estrangeiro</p>	 <p>PIC-000-0857 - Outros</p>
 <p>PIC-000-0856 - Derivado</p>	 <p>PIC-000-0854 - Derivado</p>	 <p>PIC-000-0843 - Derivado</p>
 <p>PIC-000-0842 - Derivado</p>	 <p>PIC-129-0001 - Derivado</p>	 <p>PIC-000-0822 - Derivado</p>


 <p>PIC-000-0821 - Derivado</p>	 <p>PIC-000-0816 - Derivado</p>	 <p>PIC-000-0815 - Óleo Cru Estrangeiro</p>
 <p>PIC-000-0800 - Derivado</p>	 <p>PIC-000-0799 - Derivado</p>	 <p>PIC-000-0797 - Derivado</p>
 <p>PIC-000-0792 - Derivado</p>	 <p>PIC-000-0819 - Derivado</p>	 <p>OLE-000-0801 - Derivado</p>
 <p>PIC-000-0787 - Derivado</p>		

Figura 9-2 – Resíduos oleosos registrados na área de abrangência do PMP-BS entre 01/01/2023 e 31/12/2023 e respectivos Códigos de Amostra.

9.4 REGISTROS DE FAUNA OLEADA

Considerando o período de referência deste relatório (01/01/2023 a 31/12/2023), foram registradas 5 ocorrências de fauna oleada para a área de abrangência do PMP-BS (**Tabela 9-3**).

As equipes do PMP-BS Área SC/PR realizaram 3 registros de fauna oleada, 2 através do monitoramento ativo das praias e 1 por acionamento. Já as equipes do PMP-BS Área SP realizaram 1 registro de fauna oleada através do monitoramento ativo das praias. Por fim, as equipes do PMP-BS Área RJ realizaram 1 registro de fauna oleada através de acionamento.

Em todas estas ocorrências de fauna oleada, houve a coleta de amostras para análise de *fingerprint* no Centro de Pesquisas & Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES).

Os resultados destas análises de *fingerprint* indicaram que 2 das 5 amostras coletadas nos animais oleados correspondiam a derivados, e nas outras 3 não foi possível determinar se tratava de óleo cru ou derivado, sendo que nenhuma amostra estava relacionada a óleos crus da Bacia de Santos.

Houve 3 registros de aves de habitat costeiro/oceânico (*Sula leucogaster* e *Spheniscus magellanicus*) e 2 de aves com habitat oceânico (*Thalassarche chlororhynchos* e *Pelagodroma marina*).

O trecho com maior número de ocorrências de fauna oleada em 2023 foi o Trecho 6, com 2 indivíduos. Já os Trechos 1, 9 e 15 (com 1 indivíduo cada), perfizeram juntos 60% dos registros de fauna oleada no PMP-BS no período. Os trechos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13 e 14 não tiveram registro de fauna oleada neste período. No decorrer do ano, os meses de julho, outubro e novembro apresentaram somente um registro cada, enquanto o mês de agosto foi o único período que apresentou 2 registros de fauna oleada.

Cabe ressaltar que todas estas análises estão devidamente registradas no SIMBA.

Tabela 9-3 – Ocorrências de fauna oleada no PMP-BS entre 01/01/2023 e 31/12/2023.

Nº	Identificador do Indivíduo	Espécie	Data do resgate	Monitoramento	Status no resgate	Quantidade de óleo	Habitat	Trecho (Instituição)	Município/ Estado	Código da Amostra	Resultado	Nº Comunicação Técnica
1	108670	<i>Sula leucogaster</i>	25/07/2023	Regular	Morto (Cod. 3)	até 25%	Cost./ Ocean.	6 (UFPR)	Pontal do Paraná / PR	108670-PEN-0001	Derivado	005/2024
2	124582	<i>Spheniscus magellanicus</i>	04/08/2023	Acionamento	Vivo	até 25%	Cost./ Ocean.	1 (UDESC)	Laguna / SC	124582-PEN-0001	Outros*	006/2024
3	128869	<i>Thalassarche chlororhynchos</i>	28/08/2023	Regular	Morto (Cód. 4)	até 25%	Oceânico	6 (UFPR)	Pontal do Paraná / PR	128869-PEN-0001	Outros*	010/2024
4	184007	<i>Sula leucogaster</i>	13/10/2023	Acionamento	Vivo	até 25%	Cost./ Ocean.	15 (Econservation)	Niterói / RJ	184007-PEN-0001	Derivado	012/2024
5	191515	<i>Pelagodroma marina</i>	03/11/2023	Regular	Morto (Cód. 4)	até 25%	Oceânico	9 (Gremar)	Guarujá / SP	191515-OAD-0001	Outros*	015/2024

* A baixa recuperação de resíduo oleoso, a ausência de n-parafinas ou de UCM (*Unresolved Complex Mixture*) observadas na análise cromatografia gasosa e a distribuição irregular de biomarcadores limitam a determinação da natureza do resíduo oleoso recuperado.

Do total de 5 ocorrências de fauna oleada, 2 eram indivíduos encontrados com vida e as demais 3 ocorrências se tratavam de carcaças. Os estágios de decomposição destas carcaças foram: uma carcaça em código 3 (ii 108670) e duas em código 4 (ii 128869 e ii 191515). A *causa mortis* destes indivíduos foi identificada como indeterminada para os 3 indivíduos (ii 108670, ii 128869 e ii 191515).

Para a Área SC/PR foram registrados 1 indivíduo com vida e 2 carcaças, cujas localizações das ocorrências constam na **Figura 9-3**. A ave encontrada viva, *Spheniscus magellanicus* (ii 124582), foi encaminhada à UE de Laguna e morreu no dia do resgate.

Para a Área SP foi registrado apenas 1 carcaça, cuja localização encontra-se na **Figura 9-4**.

Para a Área RJ foi registrado 1 indivíduo com vida, cuja localização consta na **Figura 9-5**. A ave encontrada viva, *Sula leucogaster* (ii 184007), foi encaminhada ao CRD Maricá e morreu após 2 dias de tratamento.

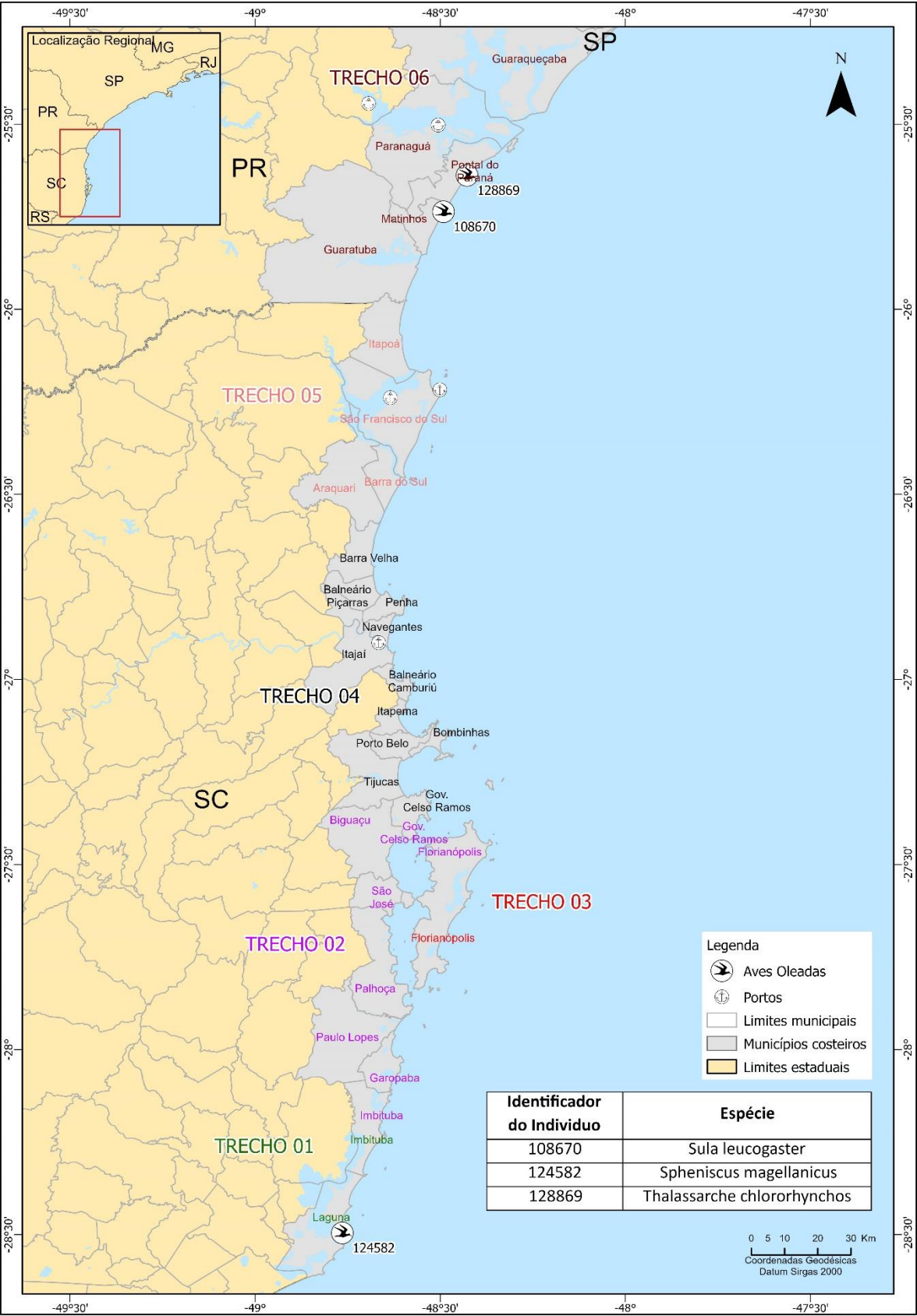


Figura 9-3 - Locais de registro de fauna oleada encontrada pelo PMP-BS Área SC/PR no período de 01/01/2023 a 31/12/2023.

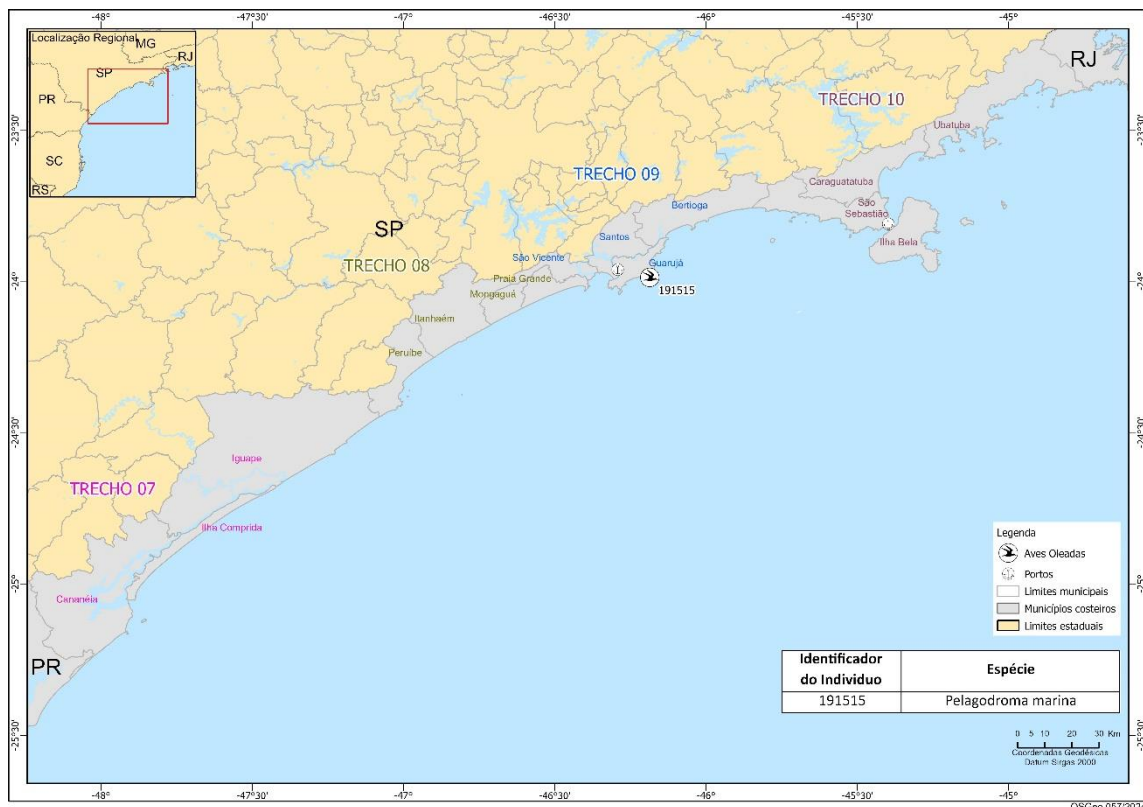


Figura 9-4 - Locais de registro de fauna oleada encontrada pelo PMP-BS Área SP no período de 01/01/2023 a 31/12/2023.

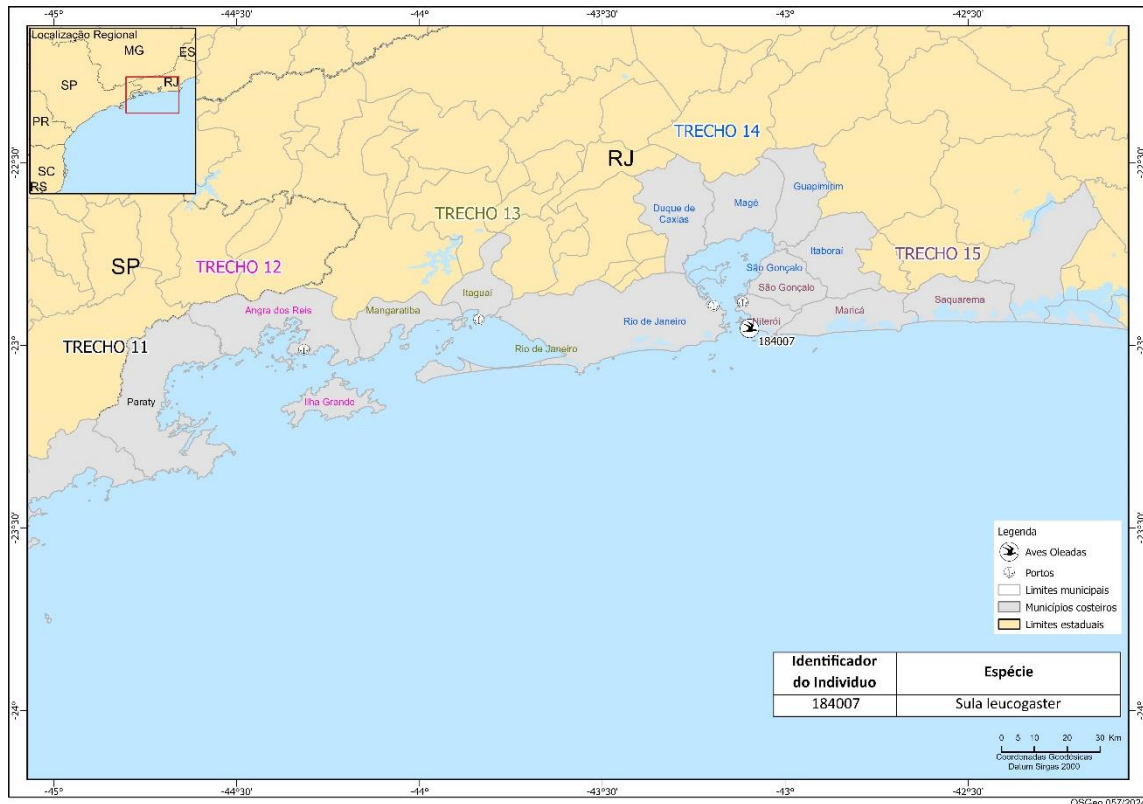


Figura 9-5 - Locais de registro de fauna oleada encontrada pelo PMP-BS Área RJ no período de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Na **Figura 9-6** são apresentadas as imagens dos 5 animais oleados e respectivos ii (Identificadores dos Indivíduos) registrados pelo PMP-BS entre 01/01/2023 e 31/12/2023.



Figura 9-6 – Registros dos 5 animais oleados registrados no PMP-BS no período de 01/01/2023 a 31/12/2023 e respectivos ii (Identificador do Indivíduo).

9.5 CONSIDERAÇÕES

Considerando a série histórica anual desde 01/01/2017, ano em que o PMP-BS consolidou as coletas no Fase 1 (SC/PR e SP) e Fase 2 (RJ), foram registradas 244 ocorrências de resíduos oleosos na área de monitoramento do PMP-BS. Destes resíduos, 79,1% foram categorizados como piche e outros 20,9% como óleo, pelas equipes de campo (**Tabela 9-4**). Esclarece-se que, quando da eventual coleta de mais de uma amostra de resíduo oleoso no mesmo dia e local pelas equipes de monitoramento, as amostras são analisadas em separado para determinação de *fingerprint* pelo CENPES, e após a confirmação da semelhança entre elas, estas amostras replicadas são consideradas como uma única ocorrência para fins de cômputo nos quantitativos deste relatório.

Tabela 9-4 – Ocorrências de resíduos oleosos registrados no PMP-BS entre os anos de 2017 e 2023.

Ano/Tipo de Resíduo	Santa Catarina	Paraná	São Paulo	Rio de Janeiro	Total Geral
2017					
Óleo	1	3	3	4	11
Piche	2	1	32		35
2018					
Óleo	1	4	8	2	15
Piche		2	9	2	13
2019					
Óleo	1		3	2	6
Piche			46	10	56
2020					
Óleo			3	2	5
Piche	2		16	3	21
2021					
Óleo	3	1	2	1	7
Piche		3	9	1	13
2022					
Óleo	1		2	3	6
Piche		5	25	4	34
2023					
Óleo				1	1
Piche		4	15	2	21
Total Geral	11	23	173	37	244

Das 244 ocorrências de resíduos oleosos, 22 (dos anos de 2017 e 2018) não foram enviadas para análise de *fingerprint* por terem a origem conhecida, por serem de praias, sabidamente, com ocorrência já analisada de óleo intemperizado recorrente ou ainda, não ter sido possível a adequada coleta da amostra. Assim, para a construção da **Figura 9-7** consideramos as 222 amostras que apresentaram resultados de *fingerprint*.

A análise da **Figura 9-7** não mostram uma tendência na ocorrência de resíduos oleosos. As amostras cujos resultados indicam derivados são as predominantes durante todos os anos de realização de coleta de resíduos oleosos pelo PMP-BS, com destaque para os anos de 2019 e 2022. As amostras cujos resultados indicam óleo cru variaram de 0 a 4 por ano. Em 2023, uma amostra foi classificada como “outros”, que significa que a baixa recuperação de resíduo oleoso, a ausência de n-parafinas ou de UCM (*Unresolved Complex Mixture*) observadas na análise cromatografia gasosa e a distribuição irregular de biomarcadores, que limitam a determinação da natureza do resíduo oleoso recuperado.

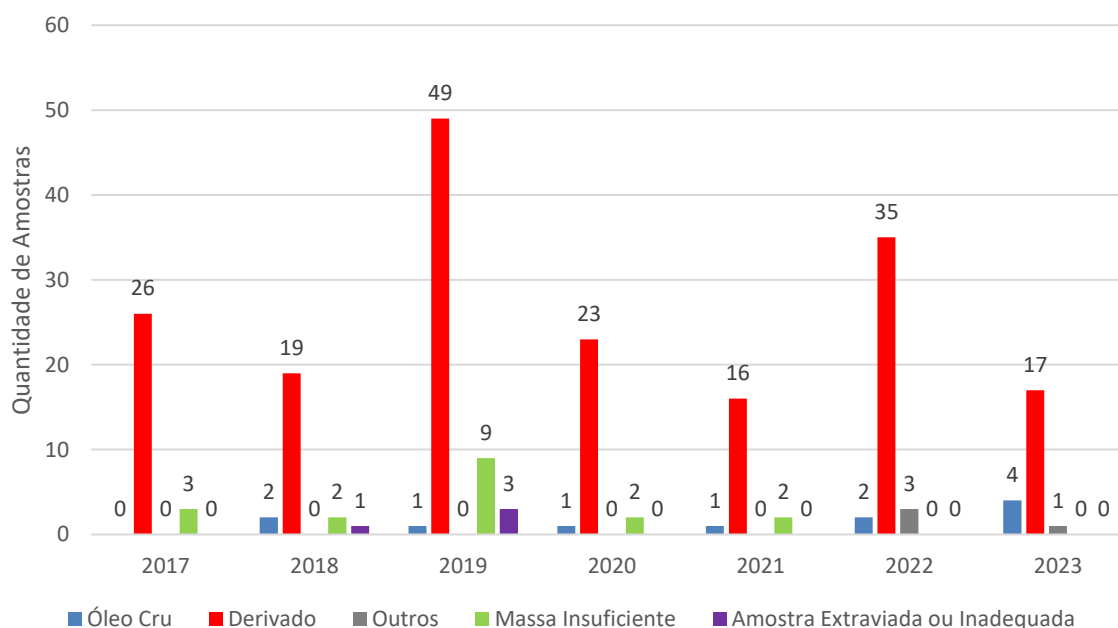


Figura 9-7 – Série histórica com registros de resíduos oleosos pelo PMP-BS.

Já para fauna oleada, foram registradas 194 ocorrências de animais oleados na área de monitoramento do PMP-BS. Destes animais, 72,1% foram registrados com menos de 25% de óleo no corpo (**Tabela 9-5**). Vale destacar também que, em

alguns casos, houve coleta de duas amostras para o mesmo animal, por exemplo, em aves nas penas e óleo aderido à outras partes do animal. Porém, o total (194 ocorrências) não considera essas amostras repetidas, ou seja, houve o registro de 194 animais oleados desde 2017. Todas as amostras coletadas nos animais oleados foram enviadas para o CENPES, com exceção de duas, referentes a uma tartaruga verde (*Chelonia mydas* - ii 182388), coletada em 2019, e um biguá (*Phalacrocorax brasilianus* - ii 223106), coletado em 2020, conforme informado na Carta SMS/LCA/MPL-E&P/MPL-AGUP-LIBRA-BUZIOS 0345/2022 e Relatórios Técnicos Anuais Integrados do PMP-BS, dos períodos de referência anteriores (2022 e 2023).

Em dois casos, houve registro de possível fragmento de piche em estômago de tartarugas não oleadas encontradas mortas, ambas *Chelonia mydas*, sendo o indivíduo ii 203355 (cód. 4), encontrado no Trecho 10 em novembro/2022, e o indivíduo ii 195725 (cód. 2), encontrado no Trecho 08 em fevereiro/2023. Nestes casos, não foi possível realizar a análise de *fingerprint*, pois as amostras foram coletadas junto a material biológico do conteúdo estomacal, conforme informado pela Gerência de Geoquímica do CENPES.

Tabela 9-5 – Registros de fauna oleada ao longo do PMP-BS nos anos de 2017 a 2023.

Ano/Quantidade de óleo	Aves	Mamíferos	Tartarugas	Total Geral
2017				
até 25%	12		5	17
até 50%	5			5
até 75%	1			1
2018				
até 25%	46		5	51
até 50%	9			9
até 75%	2			2
mais do que 75%	5			5
2019				
até 25%	25	1	2	28
até 50%	9		1	10
até 75%	5			5
2020				
até 25%	7		1	8
até 50%	2			2
até 75%	2			2
2021				
até 25%	12			12
até 50%	3			3
até 75%	3			3
mais do que 75%	1			1
2022				
até 25%	17		2	19
até 50%	3			3

Ano/Quantidade de óleo	Aves	Mamíferos	Tartarugas	Total Geral
até 75%	2			2
mais do que 75%	1			1
2023				
até 25%	5			5
Total Geral	177	1	16	194

Os dados de fauna oleada (**Figura 9-8**) também não mostram uma tendência ao longo dos anos. As amostras cujos resultados indicam derivados também são as predominantes durante todos os anos, com destaque para o ano de 2018, no qual os estados do sul (SC e PR) registraram 47 ocorrências de fauna oleada. Em relação às amostras de fauna oleada por óleo cru, houve um aumento no ano de 2019, com 15 registros e nos demais anos os valores variaram de 0 a 3.

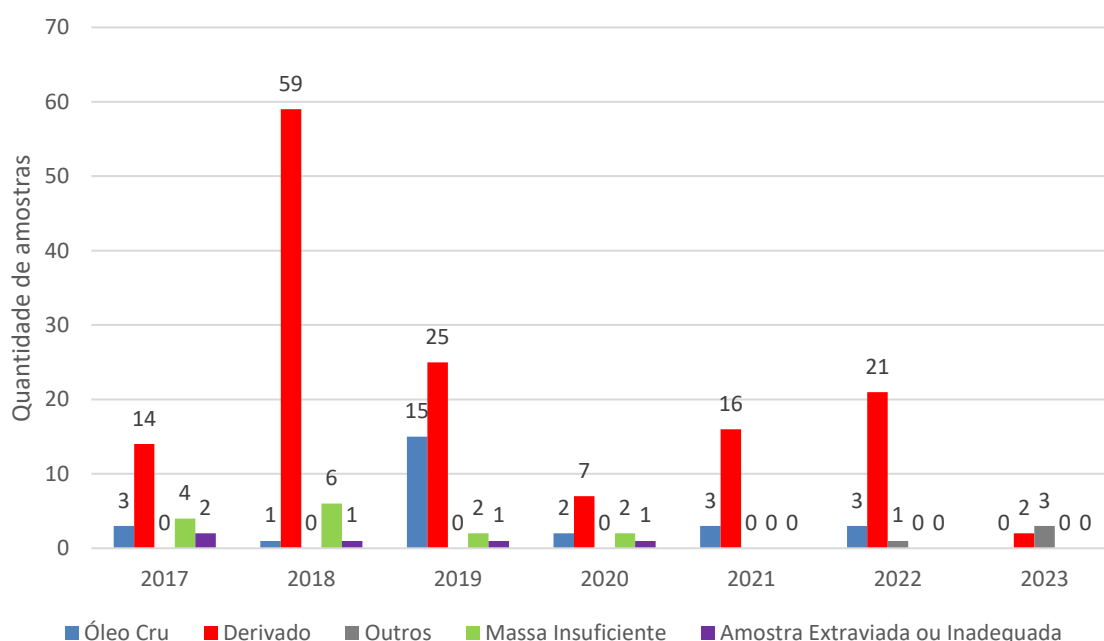


Figura 9-8 – Série histórica com registro de fauna oleada pelo PMP-BS.

Vale destacar que do total de 416 amostras obtidas pelo PMP-BS a partir de resíduos oleosos (222 amostras que apresentaram resultados de *fingerprint*) e fauna oleada (194 ocorrências), desde 2017, 330 trata-se de amostras cuja análise de *fingerprint* indicou origem a partir de derivados de petróleo e 38 trata-se de amostras, cuja análise de *fingerprint* indicou origem a partir de óleo cru, sendo que apenas 3 amostras tiveram relação com óleo cru produzido na Bacia de Santos, a saber:

- 1 amostra de resíduo oleoso (OLE-110-0001), coletado no dia 17/11/2020 em Bertioga-SP, provavelmente se trata de um petróleo cru proveniente do Campo de Júpiter (campo não produtor em 2020), misturado a algum derivado de petróleo, provavelmente graxa ou óleo lubrificante.
- 1 amostra de fauna oleada (*Puffinus puffinus* - ii 025626), coletada no dia 01/10/2021 em Imbituba-SC, sendo possível sugerir os campos de Lula/Tupi, além do poço SPH-26.
- 1 amostra de fauna oleada (*Puffinus puffinus* - ii 012118), coletada no dia 01/11/2021 em Paranaguá-PR, sendo possível sugerir os campos de Lula/Tupi e Sapinhoá.

10 REGISTROS DE RESÍDUOS SÓLIDOS

10.1 REGISTROS POR TRECHO

Como parte das atividades do PMP-BS, as equipes de campo registram as ocorrências de resíduos sólidos que possam estar relacionadas às atividades licenciadas (exploração, produção e escoamento de óleo e gás). Quando observadas, as ocorrências são fotografadas e as informações são registradas no SIMBA. Havendo condições de identificação da origem do resíduo os responsáveis são acionados para recolhimento. Em todos os casos os resíduos foram classificados em 4 grupos:

- Barris, galões e tambores;
- Boias de diversos tipos (sinalização/defensa/pesca);
- Cilindros de gás;
- Outros

Apesar do período de execução das atividades do PMP-BS ser diferente entre áreas de abrangência, a padronização dos registros de resíduos sólidos também sofreu uma alteração metodológica ao longo do contrato das Áreas de SC/PR e SP. A partir do ano de 2019 ficou determinado que somente resíduos sólidos relacionados às atividades licenciadas de exploração, produção e escoamento de óleo e gás seriam registrados no âmbito do PMP-BS. Esse ajuste metodológico reduziu o registro de resíduos de baixa relevância e consequentemente gerou uma diminuição no número de ocorrências na série histórica do PMP-BS. A **Figura 10-1** apresenta as ocorrências de resíduos sólidos registrados a partir do ajuste metodológico (2019 a 2023). É importante destacar que as atividades de monitoramento e registro de resíduos iniciou em agosto de 2015 para as Áreas de SC/PR e SP, enquanto na Área RJ as atividades tiveram início em setembro de 2016. Para este relatório ocorreu uma nova padronização com relação a categorização dos resíduos sólidos registrados pelo Projeto, onde foram englobados na categoria “outros” os registros diversos fora das categorias padronizadas e os Equipamentos de Proteção Individual – EPI, registrados durante os monitoramentos, como

capacetes de proteção e protetores auriculares. O motivo pelo qual foi decidido manter os registros deste tipo de resíduo se deu pelo fato de as ocorrências serem feitas próximas a locais onde possui obras ligadas à expansão da indústria de petróleo e gás da Bacia de Santos, principalmente na área RJ.

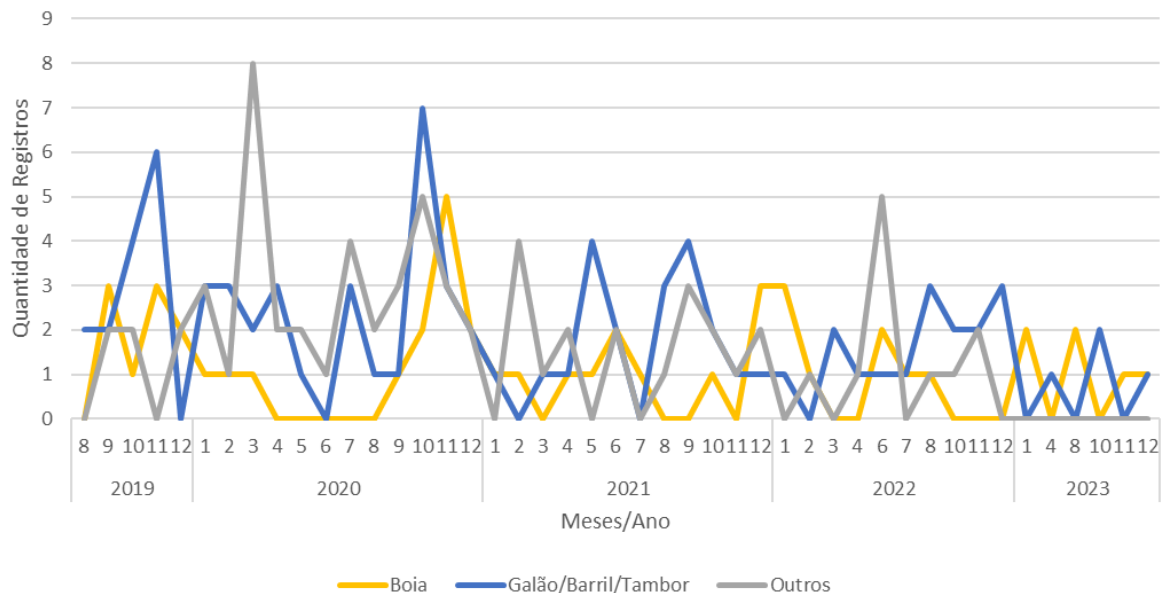


Figura 10-1 - Registro de ocorrências de resíduos sólidos após ajuste metodológico (2019 a 2023) na área de abrangência do PMP-BS.

Santa Catarina e Paraná

Considerando o período deste relatório (01/01/2023 a 31/12/2023), as equipes do PMP-BS Área SC/PR realizaram 5 registros de resíduos sólidos, 4 através de monitoramento diário das praias e 1 por monitoramento semanal. A **Tabela 10-1** apresenta a quantidade e tipo de resíduos encontrados por município/praias. Em todos os casos os resíduos foram classificados em 2 grupos (Barril/Galão/Tambor; Boia).

Tabela 10-1 Quantidade e tipo de ocorrências de resíduos sólidos potencialmente relacionados às atividades licenciadas (exploração, produção e escoamento de óleo e gás), por estado, município e praia, pelo PMP-BS Área SC/PR, de 01/01/2023 a 31/12/2023.


Estado/Município/Praia	Barril/Galão/Tambor	Boia	Total Geral
Paraná			
Guaraqueçaba			
Ilha do Superagui	1		1

Estado/Município/Praia	Barril/Galão/Tambor	Boia	Total Geral
Santa Catarina			
Florianópolis			
Campeche		1	1
Itapoá			
Pontal - Itapoá	1	1	2
São Francisco Do Sul			
Praia de Itaguaçu		1	1
Total Geral	2	3	5

Devido à pequena quantidade de registros, não é possível definir padrões de ocorrência para os resíduos sólidos na Área SC/PR do PMP-BS. Ao se analisar os registros por categoria (**Tabela 10-2**) a maioria dos resíduos (boias e barril) foram encontrados nas praias do norte de Santa Catarina.

Tabela 10-2– Registros de resíduos sólidos potencialmente relacionados às atividades licenciadas (exploração, produção e escoamento de óleo e gás), pelo PMP-BS Área SC/PR, de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Código SIMBA	Identificador da ocorrência	Município	Data	Imagem do objeto
281218	T0620231227s 000001	Guaraqueçaba - PR	27/12/2023	
279887	T0320231212s 000001	Florianópolis - SC	12/12/2023	
259499	T0520230830s 214151	São Francisco Do Sul - SC	30/08/2023	
240331	T0520230428s 198022	Itapoá - SC	28/04/2023	

Código SIMBA	Identificador da ocorrência	Município	Data	Imagem do objeto
229244	T0520230110s 007708	Itapoá - SC	10/01/2023	

São Paulo




Considerando o período deste relatório (01/01/2023 a 31/12/2023), as equipes do PMP-BS Área SP realizaram 3 registros de resíduos sólidos, 2 através de monitoramento diário das praias e 1 por acionamento. A **Tabela 10-3** apresenta a quantidade e tipo de resíduos encontrados por município/praias. Em todos os casos os resíduos foram classificados em 2 grupos (Barril/Galão/Tambor; Boia).

Tabela 10-3 – Quantidade e tipo de ocorrências de resíduos sólidos por município e praias e por trecho no PMP-BS Área SP no período de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Município/Praia	Barril/Galão/Tambor	Boia	Total Geral
Caraguatatuba			
Capricórnio	1	1	2
São Sebastião			
São Francisco + Olaria	1		1
Total Geral	2	1	3

Não é possível definir padrões de ocorrência para os resíduos sólidos na Área SP do PMP-BS, entretanto pode-se destacar que todos os resíduos foram encontrados no Trecho 10. Ao se analisar os registros por categoria (**Tabela 10-4**) evidenciamos 2 tambores e uma boia do tipo barreira de contenção.

Tabela 10-4– Registros de resíduos sólidos potencialmente relacionados às atividades licenciadas (exploração, produção e escoamento de óleo e gás), pelo PMP-BS Área SP, de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Código SIMBA	Identificador da ocorrência	Município	Data	Imagem do objeto
271611	T1020231029s326002	São Sebastião	29/10/2023	
269336	T1020231015s300019	Caraguatatuba	15/10/2023	
253615	T1020230809s000003	Caraguatatuba	09/08/2023	

Rio de Janeiro



Considerando o período deste relatório (01/01/2023 a 31/12/2023), as equipes do PMP-BS Área RJ realizaram 2 registros de resíduos sólidos, ambos através de monitoramento diário das praias. A **Tabela 10-5** apresenta a quantidade e tipo de resíduos encontrados por município/praias. Em todos os casos os resíduos foram classificados como boias.

Tabela 10-5 – Quantidade e tipo de ocorrências de resíduos sólidos potencialmente relacionados às atividades licenciadas (exploração, produção e escoamento de óleo e gás), por município e praias, pelo PMP-BS Área RJ, de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Município/Praia	Boia	Total Geral
Itaguaí		
Saco da Coroa Grande	1	1
Mangaratiba		
Canal de Itacuruçá a Ponta do Bispo	1	1
Total Geral	2	2

Devido à baixa quantidade de registros, não é possível definir padrões de ocorrência para os resíduos sólidos na Área RJ do PMP-BS. A seguir são apresentados os registros por categoria (**Tabela 10-6**).

Tabela 10-6– Registros de resíduos sólidos potencialmente relacionados às atividades licenciadas (exploração, produção e escoamento de óleo e gás), pelo PMP-BS Área RJ, de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Código SIMBA	Identificador da ocorrência	Município	Data	Imagem do objeto
275970	T1320231124s000001	Mangaratiba	24/11/2023	
231454	T1320230127s000004	Itaguaí	27/01/2023	

11 AÇÕES DE COMUNICAÇÃO

11.1 EDUCAÇÃO AMBIENTAL

Dentro do escopo do Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) estão previstas ações que amplifiquem o conhecimento relacionado à preservação do ambiente marinho das comunidades nas áreas atendidas pelo projeto. As instituições que executam o projeto realizam palestras em escolas, projetos sociais, participam de eventos locais, além de estipularem uma agenda de aproximação do poder público das ações realizadas pelo PMP-BS.

Ao longo do período deste relatório, as ações de educação ambiental atingiram mais de 70.000 pessoas nos diferentes trechos (**Tabela 11-1**) de diversas faixas etárias e sociais. O detalhamento das ações realizadas mês a mês, estão apresentados no Apêndice 9 – Ações de Educação Ambiental.

Tabela 11-1 – Quantidade de pessoas atingidas pelas ações de divulgação e educação ambiental desenvolvidas pelo PMP-BS no período de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Instituição	Quantidade de participantes		Total
	Com lista de presença	Sem lista de presença (estimado)	
Trecho 01	0	6248	6248
Trecho 02	3713	3446	7159
Trecho 03	0	814	814
Trecho 04	0	7779	7779
Trecho 05	0	5734	5734
Trecho 06	997	200	1197
Trecho 7	0	2467	2467
Trecho 8	2953	0	2953
Trecho 9	1409	1280	2689
Trecho 10	6377	17857	24234
Trecho 11	0	1019	1019
Trecho 12	0	2574	2574
Trecho 13	0	1594	1594
Trecho 14	0	2875	2875
Trecho 15	46	783	829
Total Geral	15.495	54.670	70.165

11.2 DIVULGAÇÃO

O objetivo das ações de divulgação é expandir o acesso às atividades realizadas e informar sobre questões relacionadas às diretrizes trabalhadas pelo projeto.

Durante o período deste relatório foram elaborados 1.458 textos pelos assistentes de comunicação do PMP-BS, que foram publicados nas redes sociais (Facebook e Instagram) das instituições executoras. A partir destas publicações foi registrado um total de 2.585.569 pessoas alcançadas (**Tabela 11-2**). Além destas, somam-se ainda 705 pautas nas mídias locais, estaduais e nacionais relacionadas aos trabalhos desenvolvidos pelo PMP-BS.

Tabela 11-2 – Quantidade de reações em redes sociais relacionadas a publicações feitas pelas instituições do PMP-BS no período de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Instituição	Curtidas	Compartilhamentos	Visualizações
UDESC (Trecho 01)	18.337	3.095	155.059
Inst. Australis (Trecho 02)	15.420	1.748	94.061
R3 Animal (Trecho 03)	57.768	6.978	613.042
UNIVALI (Trecho 04)	20.101	2.527	200.656
UNIVILLE (Trecho 05)	19.573	3.169	187.054
UFPR (Trecho 06)	21.394	3.806	145.095
IPeC (Trecho 7)	15.591	1.028	144.364
Inst. Biopesca (Trecho 8)	11.825	904	132.104
GREMAR (Trecho 9)	32.371	5.250	290.294
Inst. Argonauta (Trecho 10)	15.629	2.083	194.332
Econservation (Trechos 11 a 15)	33.372	4.111	429.508
Total Geral	261.381	34.699	2.585.569

11.3 DIVULGAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

Durante o período de janeiro a dezembro de 2023 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 7 resumos de congresso, que estão listados na **Tabela 11-3**.

Tabela 11-3– Trabalhos acadêmico-científicos finalizados pelas instituições do PMP-BS Área SC/PR, no período de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Título	Tipo	Local de publicação	Status	Publicação
Perfil de prevalência e resistência aos antimicrobianos de <i>Salmonella</i> spp. isolados em aves marinhas em reabilitação no Estado de Santa Catarina	Resumo Congresso	48 Congresso Brasileiro de Análises Clínicas	Finalizado	21/06/2023
Collaborative network to assess plastic ingestion and exposure to chemical additives in albatrosses and petrels off the shores of Argentina and Brazil	Resumo Congresso	ACAP Thirteenth Meeting of the Advisory Committee	Finalizado	26/05/2023
Analysis of phthalate esters in adipose tissue of <i>Pontoporia blainvillei</i> collected in southern Brazil (Florianopolis County, Santa Catarina state)	Resumo Congresso	IWC – International Whaling Commission	Finalizado	06/05/2023
Osteossarcoma metastático em <i>Larus dominicanus</i> de vida-livre	Resumo Congresso	XXV Congresso Abravas	Finalizado	10/2023
Alta mortalidade de tartarugas marinhas no litoral sul do Brasil (2016-2022)	Resumo Congresso	X Reunión de la RED ASO - Tortugas y IX Jornadas de Conservación e Investigación de Tortugas Marinas del Atlántico Sur Occidental	Finalizado	11/2023
Nascimento inédito de tartaruga-verde (<i>Chelonia mydas</i>) no sul do Brasil	Resumo Congresso	X Reunión de la RED ASO - Tortugas y IX Jornadas de Conservación e Investigación de Tortugas Marinas del Atlántico Sur Occidental	Finalizado	11/2023
Encalhe de tartarugas marinhas na Área de Proteção Ambiental da Baleia Franca, nos anos de 2021 e 2022, através da atividade do Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS).	Resumo Congresso	XIV Encontro de Iniciação Científica do ICMBio	Finalizado	10/2023

São Paulo

No período de referência deste relatório as instituições vinculadas ao PMP-BS Área SP finalizaram 4 trabalhos científicos, sendo dois artigos, um TCC e um resumo em congresso, que estão listados na **Tabela 11-4**.

Tabela 11-4 – Trabalhos científicos finalizados pelas instituições do PMP-BS Área SP, no período de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Título	Tipo	Local de publicação	Status	Publicação
Cataract surgery in a penguin (<i>Spheniscus magellanicus</i>) – case report.	Resumo	XVIII Congresso Brasileiro de Oftalmologia Veterinária	Finalizado	29, 30 e 31/03/2023
Distribuição espaço-temporal de encalhes de Pontoporia blainvillei na costa de São Paulo, sudeste do Brasil.	Artigo	International Whaling Commission - Scientific Committee meeting 2023.	Finalizado	07/05/2023
Relato de Caso: Necropsia de Pontoporia blainvillei prenhe	TCC	Universidade Federal Fluminense	Finalizado	06/2023
Ingestion of Porifera Demospongiae <i>Aplysina fistularis</i> in Short-finned Pilot Whale (<i>Globicephala macrorhynchus</i> Gray, 1846)	Artigo Científico	Latin American Journal of Aquatic Mammals	Finalizado	26/10/2023

Rio de Janeiro

No período de referência deste relatório as instituições vinculadas ao PMP-BS Área RJ submeteram 1 artigo científico que está passando pela terceira fase de revisão, listado abaixo na **Tabela 11-5**.

Tabela 11-5 – Trabalhos acadêmico-científicos finalizados/submetidos pelas instituições do PMP-BS Área RJ, no período de 01/01/2023 a 31/12/2023.

Título	Tipo	Local de publicação	Status	Publicação
New record for the northernmost occurrence of Burmeister's porpoise (<i>Phocoena spinipinnis</i> , Burmeister, 1865) in the southwestern Atlantic Ocean	Artigo Científico	Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom	Submetido	Em processo de revisão

12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Relatório Técnico Anual Integrado de 2023 mostra a magnitude e complexidade das atividades executadas neste projeto, ao apresentar uma síntese de todas as atividades executadas no PMP-BS, que se estendem do monitoramento de praia às atividades de divulgação, passando por uma série de análises que vão de encalhes a análises moleculares. As análises integradas neste documento são de importante relevância para compreender os padrões de ocorrências e as condições de saúde das espécies-alvo.

A quantidade de encalhes em 2023 ao longo da Bacia de Santos esteve dentro dos padrões observados em anos anteriores, exceto no que tange ao aumento da quantidade de aves registradas no Rio de Janeiro. Isto pode ter sido um efeito das alterações nas estratégias de monitoramento das praias no Rio de Janeiro iniciada em 2023, e precisará ser avaliado em anos futuros. Uma nova abordagem de análise deverá ser adaptada para integrar as novas praias monitoradas por via terrestre diariamente e viabilizar uma comparação com a série temporal já existente.

Outro fator que pode ter alterado a quantidade de aves registradas pode ter sido a epidemia de influenza aviária de alta patogenicidade (IAAP) registrada em 2023. Ao longo de 2023 o Brasil passou por uma emergência zoonosológica ligada à IAAP, o que forçou as equipes do PMP-BS a adotar um plano de ação específico, alterando alguns procedimentos. Em função disso, apesar do registro das aves nas praias não ter se alterado, houve uma redução nas necropsias de aves na Rede de Atendimento Veterinário. Comparando com anos anteriores, foi observada uma mortalidade maior em 2023 de algumas espécies, como trinta-réis e leões-marinhos, mas as quantidades não foram altas o suficiente para alterar os padrões gerais. Será essencial avaliar os dados de 2024 para definir qual, ou quais, destes fatores foram responsáveis pelas alterações observadas no Rio de Janeiro.

Com relação às análises de HPA, organohalogenados e elementos traço, houve no período de referência a alteração dos laboratórios responsáveis. Os contaminantes orgânicos com maior frequência de detecção foram os HPAs, PCBs e Σ DDTs, enquanto PBDE e demais pesticidas organoclorados são ausentes na grande maioria dos animais analisados. A análise temporal das concentrações de


elementos-traço para as seis espécies estatisticamente analisadas, não apontou indícios de aumento nas concentrações médias ao longo dos anos.

Com relação às análises de biomarcadores, os resultados obtidos em 2023 demonstram que a atividade enzimática e a expressão gênica podem ser utilizadas como biomarcadores para avaliar a exposição de animais marinhos a contaminantes. No entanto, a resposta observada variou entre as espécies e é influenciada por diversos fatores ambientais e fisiológicos. A continuidade dos estudos é fundamental para melhor compreender os mecanismos de resposta dos organismos marinhos à contaminação.

Considerando os resultados apresentados nos três volumes que compõem o Relatório Técnico Anual Integrado, é notável a integração das informações apresentadas. Um mesmo organismo registrado na praia pode ser utilizado para análises sobre padrões de encalhes, saúde da fauna, presença de contaminantes e respostas bioquímicas e moleculares aos mesmos. Apesar de ainda poder se avançar na interpretação integrada de todos os resultados obtidos, é indiscutível a utilidade das informações produzidas a fim de avaliar a interferência da atividade de E&P sobre os tetrápodes marinhos na Bacia de Santos e os diversos impactos que afetam os mesmos.

13 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 – 5, 10, 11
Assinatura	



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



CADASTROS TÉCNICOS FEDERAIS
CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR

Registro n.º: 358880 Data da consulta: 08/12/2024 CR emitido em: 08/12/2024 CR válido até: 08/03/2025

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 hCaptcha e sua [Política de Privacidade](#) e [Termos de Serviço](#) se aplicam.

Profissional	Renato da Silva Carreira
Empresa/Instituição	PUC-Rio
Registro no conselho de Classe	
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	236563
Função	Coordenador (HPA e Organohalogenados)
Responsável pela(s) Seção(ões)	6
Assinatura	



Ministério do Meio Ambiente
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
CADASTROS TÉCNICOS FEDERAIS
CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR



Registro n.º:
Data da consulta:
CR emitido em:
CR válido até:

[Dados básicos](#)

CPF:
Nome:

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

Código CBO	Ocupação	Área de Atividade
2134-05	Geólogo	Estudar ambientes terrestres e aquáticos
2134-05	Geólogo	Pesquisar natureza geológica, geofísica e oceanográfica
2134-05	Geólogo	Prestar assessoria e consultoria

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 hCaptcha e sua [Política de Privacidade](#) e [Termos de Serviço](#) se aplicam.

Profissional	José Marcus de Oliveira Godoy
Empresa/Instituição	PUC-Rio
Registro no conselho de Classe	
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	4955033
Função	Coordenador (Elementos Traço)
Responsável pela(s) Seção(ões)	7
Assinatura	



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

CADASTROS TÉCNICOS FEDERAIS
CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR



Registro n.º: **4955033** Data da consulta: **30/12/2024** CR emitido em: **30/12/2024** CR válido até: **30/03/2025**

[Dados básicos](#)

CPF: **XXX.981.907-XX**

Nome: **JOSE MARCUS DE OLIVEIRA GODOY**

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

Código CBO	Ocupação	Área de Atividade
2132-05	Químico	Desenvolver metodologias analíticas
2132-05	Químico	Interpretar dados químicos
2132-05	Químico	Monitorar impacto ambiental de substâncias
2132-05	Químico	Realizar ensaios, análises químicas, físicas, físico-químicas

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

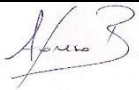
A inscrição no CTF/AIDA constitui declaração, pela pessoa física, do cumprimento de exigências específicas de qualificação ou de limites de atuação que porventura sejam determinados pelo respectivo Conselho de Fiscalização Profissional.

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 hCaptcha e sua [Política de Privacidade](#) e [Termos de Serviço](#) se aplicam.

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)
Responsável pela(s) Seção(ões)	8
Assinatura	

Profissional	Thiago Otto Corrêa Alves
Empresa/Instituição	Petrobras
Registro no Conselho de Classe	CREA-SP 126477
CTF/AIDA	6791016
Responsabilidade	9
Assinatura	



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



CADASTROS TÉCNICOS FEDERAIS
CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR

Registro n.º: 6791016 Data da consulta: 02/01/2025 CR emitido em: 02/01/2025 CR válido até: 02/04/2025

Dados básicos

CPF: XXX.940.926-XX
Nome: THIAGO OTTO CORREA ALVES

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

Código CBO	Ocupação	Área de Atividade
2140-05	Engenheiro Ambiental	Implantar projetos ambientais

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

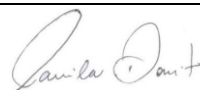
Este site é protegido por hCaptcha e sua [Política de Privacidade](#) e [Termos de Serviço](#) se aplicam.


COLABORADORES

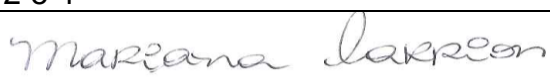
Univali

Profissional	Alencar Cabral
Empresa/Instituição	UNIVALI
Registro no conselho de Classe	Não se aplica
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	--
Responsável pela(s) Seção(ões)	3 e 5
Assinatura	

Profissional	Antônio Carlos Beaumord
Empresa/Instituição	UNIVALI
Registro no conselho de Classe	Não se aplica (Oceanógrafo)
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	--
Responsável pela(s) Seção(ões)	5
Assinatura	

Profissional	Camila Domit
Empresa/Instituição	UFPR
Registro no conselho de Classe	50867/07-D
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	2071658
Responsável pela(s) Seção(ões)	4.5.3
Assinatura	

Profissional	Deborah Garcia Boeira
Empresa/Instituição	UNIVALI
Registro no conselho de Classe	Não se aplica (Jornalismo)
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	--
Responsável pela(s) Seção(ões)	11
Assinatura	


Profissional	Mariana Carrion
Empresa/Instituição	UNIVALI
Registro no conselho de Classe	95368/03
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	6380304
Responsável pela(s) Seção(ões)	2 e 4
Assinatura	


Profissional	Matheus Martins Cardim
Empresa/Instituição	UNIVALI
Registro no conselho de Classe	07212 CRMV SC
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	6870429
Responsável pela(s) Seção(ões)	4
Assinatura	<i>matheus martins cardim</i>

Profissional	Mauro Michelena Andrade
Empresa/Instituição	UNIVALI
Registro no conselho de Classe	Não se aplica (Oceanógrafo)
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	--
Responsável pela(s) Seção(ões)	5
Assinatura	<i>Mauro M. Andrade</i>

Profissional	Pedro Volkmer de Castilho
Empresa/Instituição	UDESC
Registro no conselho de Classe	53296-03D
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	1929683
Responsável pela(s) Seção(ões)	4.5.2
Assinatura	<i>Pedro Volkmer de Castilho</i>

Profissional	Renata Maria Taufer
Empresa/Instituição	UNIVALI
Registro no conselho de Classe	Não se aplica (Oceanógrafo)
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	--
Responsável pela(s) Seção(ões)	5
Assinatura	<i>Renata taufer</i>

Profissional	Rodrigo Sant'anna
Empresa/Instituição	UNIVALI
Registro no conselho de Classe	Não se aplica (Oceanógrafo)
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	--
Responsável pela(s) Seção(ões)	5
Assinatura	

Profissional	Tiago Zis
Empresa/Instituição	UNIVALI
Registro no conselho de Classe	Não se aplica (Ciência da Computação)
Cadastro Técnico Federal de Atividade de Defesa Ambiental	--
Responsável pela(s) Seção(ões)	3 e 5
Assinatura	

Petrobras (fingerprint)

- Poliana Carvalho de Andrade Furlan

PUC-Rio (HPA e organohalogenados)

- Dr. Carlos German Massone
- Dra. Francielli Casanova Monteiro
- MSc. Kamila Cezar Gramlich
- Wellington Luiz S. Guedes
- MSc. Matheus Grohs Ribeiro
- Rayan de Oliveira Fortes
- Gustavo Souza de Carvalho

PUC-Rio (Elementos-traço)

- Dr. Rodrigo Araújo Gonçalves

LABCAI/UFSC (Biomarcadores)

- Dra. Karim Hahn Lückmann
- Dr. Clei Endrigo Piazza
- Dra. Daína de Lima
- Dra. Juliana Righetto Moser

- MSc. Vanessa Schadeck Deconto
- MSc. Jacó Joaquim Mattos
- Luiza Manaut Rodrigues
- Ana Beatriz Bauer
- Beatriz Lahoz
- Guilherme de Espindola da Silveira
- Thiago Mazzuco Vinter

14 APÊNDICES

APÊNDICE 1 – REGISTROS DE FAUNA

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 2 – HISTÓRICOS CLÍNICOS

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 3 – NECROPSIAS

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 4 – MODELOS LINEARES GENERALIZADOS

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 5 – ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 6 – HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E ORGANOHALOGENADOS

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 7 – ELEMENTOS TRAÇO

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 8 – BIOMARCADORES

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 9 – AÇÕES DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL

(disponível em formato eletrônico)

APÊNDICE 10 – COORDENADAS

(disponível em formato eletrônico)