

**Análise integrada em três níveis de organização biológica de
brânquias e fígado de bagre *Genidens barbus* provenientes de
três estuários do Estado de São Paulo com distintos históricos de
ação antrópica**

Nathalia Sales Soares do Nascimento

São Vicente

-2021-

**Análise integrada em três níveis de organização biológica de
brânquias e fígado de bagre *Genidens barbus* provenientes de
três estuários do Estado de São Paulo com distintos históricos de
ação antrópica**

Nathalia Sales Soares do Nascimento

Orientador(a): Prof^a Dr^a Renata de Britto Mari

Co- Orientador(a): Prof^a Dr^a Paloma Kachel Gusso Choueri

Dissertação apresentada Instituto de Biociências,
Campus do Litoral Paulista, UNESP, para
obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Biodiversidade em Ambientes
Costeiros.

São Vicente

-2021-

N244a	Nascimento, Nathalia Sales Soares do Análise integrada em três níveis de organização biológica de brânquias e fígado de bagre <i>Genidens barbus</i> provenientes de três estuários do Estado de São Paulo com distintos históricos de ação antrópica / Nathalia Sales Soares do Nascimento. -- São Vicente, 2021 82 p. : il., tabs., fotos, mapas Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente Orientadora: Renata de Britto Mari Coorientadora: Paloma Kachel Gusso Choueri 1. Contaminação estuarina. 2. Sistema antioxidante. 3. Histopatologia. 4. Ecotoxicologia aquática. 5. Análise integrada. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e me ajudaram a terminar este trabalho durante toda uma pandemia.

Agradeço a Prof. Renata e a Dr. Paloma pela confiança e ajuda para que este trabalho fosse possível. Obrigada Renata por todos os 5 anos de pesquisa até aqui. E obrigada Paloma por ter ajudado a entrar nesse meio novo para mim que são as bioquímicas.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida

Agradeço ao LABMA, por todo companheirismo até aqui. Obrigada por dividir tantos experimentos, problemas, prêmios, aniversários, comemorações. São muitos anos juntos e com vocês ficou mais fácil. E obrigada Alexandre por dividir essa pesquisa comigo.

A minha psicóloga, Ingrid, sem ela eu já teria jogado tudo para o alto.

E por último aos meus amigos, Banban, Sideh, Biju, Trypa, Kéti, Deborah, Graxinha, Sarah, Gabi, Brenda, Rã, e a todos os biricumigos, a minha imensa gratidão. Obrigada por estarem ao meu lado muito antes do início desse trabalho, durante ele, durante a pandemia, durante a VACINAA e em muitas outras ocasiões. Sem vocês tudo teria ficado mais difícil.

RESUMO

Os estuários é o ecossistema mais suscetível à prejuízos ambientais devido as inúmeras atividades antrópicas exercidas no local. No Brasil, o Estado de São Paulo destaca – se por sua extensão litorânea, apresentando características ambientais e socioeconômicas diferentes, disponibilizando no ambiente diferentes cargas e tipos de contaminantes. Dessa forma, se faz necessário estudos de qualidade ambiental nos diferentes cenários. Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo analisar respostas de três níveis biológicos (subcelulares, teciduais e individuais) de bagres estuarino dependentes, utilizando brânquias e fígado, a fim de compreender a saúde destes animais e a comparação entre áreas com diferentes históricos de atividades antrópicas e cenários ambientais no litoral do Estado de São Paulo. Vinte (n=20) espécimes juvenis de *Genidens barbatus* foram coletados em três regiões do litoral paulista: Estação Ecológica Juréia-Itatins (área de proteção integral - JES); Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape (APA com baixa a moderada contaminação – CAN); Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (área com altas taxas de contaminação – SSV). De modo geral, o fígado apresentou maiores alterações subcelulares e teciduais que as brânquias, podendo ser explicada pela forma de contato do órgão com o contaminante. Já com a integração dos resultados dos biomarcadores viu-se os diferentes cenários de proteção e como os diferentes históricos antrópicos refletem a saúde dos organismos, já que animais de CAN, nossa área intermediária, apresentam os piores estados de saúde. Enquanto SSV, a área mais impactada, o maior risco ecológico com comprometimento da histoarquitetura dos dois órgãos. Levanta-se então a questão da ineficácia e/ou não aplicação de leis ambientais, além da necessidade de estudos de biomonitoramento para melhor entendimento dos efeitos dos contaminantes, e assim possibilitar ferramentas de mitigação.

Palavra-chave: Biomarcadores – Sistema antioxidante – Histopatologia - Poluição ambiental – *Genidens barbatus* - Litoral paulista.

ABSTRACT

Estuaries are the ecosystem most susceptible to environmental damage due to the numerous human activities carried out in the area. In Brazil, the State of São Paulo stands out for its coastal extension, presenting different environmental and socioeconomic characteristics, providing the environment with different loads and types of contaminants. Thus, studies of environmental quality in different scenarios are necessary. Therefore, this study aims to analyze responses from three biological levels (subcellular, tissue and individual) of dependent estuarine catfish, using gills and liver, to understand the health of these animals and the comparison between areas with different histories of activities anthropogenic and environmental scenarios on the coast of the State of São Paulo. Twenty (n=20) juvenile specimens of *Genidens barbus* were collected in three regions of the São Paulo coast: Estação Ecológica Juréia-Itatins (strict protection area - JES); Cananéia-Iguape Estuarine Lagoon System (APA with low to moderate contamination – CAN); Santos-São Vicente Estuarine Complex (area with high contamination rates – SSV). In general, the liver showed greater subcellular and tissue alterations than the gills, which can be explained by the form of contact between the organ and the contaminant. With the integration of the results of the biomarkers, the different protection scenarios were seen and how the different anthropic histories reflect the health of the organisms, since animals from CAN, our intermediate area, present the worst health states. While SSV, the most impacted area, the greatest ecological risk with compromised histoarchitecture of the two organs. This raises the question of ineffectiveness and/or non-application of environmental laws, in addition to the need for biomonitoring studies to better understand the effects of contaminants, and thus enable mitigation tools.

Keyword: Biomarkers – Antioxidant system – Histopathology – Environmental pollution – *Genidens barbus* – São Paulo coast.

LISTA DE SIGLAS

ZC – Zona costeira

JES – Estuário do Rio Una, Juréia Itatins

EEJI – Estação Ecológica Juréia – Itains

CAN – Estuário de Cananéia, Área de proteção ambiental de Cananéia-Peruíbe

SSV – Complexo estuarino de Santos – São Vicente

APA – Área de proteção ambiental

APP – Área de proteção permanente

GPx – Glutathione Peroxidase

GST – Glutathione S-transferase

GSH – Tiois não proteicos reduzidos

LPO – Peroxidação lipídica

K – Fator de Condição de Fulton

IHS – Índice hepatossomático

CL – Comprimento da lamela secundária

DL – Distância interlamelar

EB – Espessura da base

EL – Espessura da lamela

IBR – Integração das respostas de biomarcadores

HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

PCBs – Bisfenilas policloradas

SOG – Guia de qualidade de sedimentos

SMA – Secretária de infraestrutura e meio ambiente

MMA – Ministério do meio ambiente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1.1 Ações antrópicas e a presença de contaminantes.....	10
1.2 Zona Costeira – Estado de São Paulo.....	11
1.3 Caracterização das áreas de estudo.....	13
1.3.1 Estação Ecológica Juréia – Itatins (EEJI).....	13
1.3.2 Sistema Estuarino Lagunar Cananéia – Iguape.....	14
1.3.3 Canal de Santos-São Vicente.....	15
1.4 Ferramentas de avaliação de qualidade ambiental.....	16
1.4.1 Análises físico-químicas.....	16
1.4.2 Biomarcadores.....	17
1.5 Espécie bioindicadora.....	20
2. OBJETIVOS GERAIS.....	20
 CAPÍTULO I: ANÁLISE INTEGRADA DE RESPOSTAS DE TRÊS NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA DE <i>Genidens barbatus</i> COLETADOS EM TRÊS ESTUÁRIOS DO LITORAL DE SÃO PAULO, BRASIL	
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1 Áreas de estudo.....	26
2.2 Análise de metais no sedimento.....	27
2.3 Espécie bioindicadora e coleta de amostras.....	28
2.4 Biomarcadores bioquímicos.....	29
2.5 Processamento histológico.....	29
2.5.1 Processamento histológico das brânquias.....	29
2.5.1.1 Análise por Poleksic & Mitrovic (1994)	30
2.5.1.2 Análise por Bernet <i>et al.</i> (1999)	31
2.5.2 Processamento histológico do fígado.....	32
2.6 Tratamento de dados.....	33
3 RESULTADOS.....	34
3.1 Concentrações de metais no sedimento.....	34
3.2 Parâmetros físico-químicos.....	35

3.3	Análises dos biomarcadores	35
3.3.1	Biomarcadores subcelulares	35
3.3.2	Biomarcadores celulares e teciduais	38
3.3.3	Biomarcadores individuais	46
3.4	Integração dos biomarcadores	46
4	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	52
5	REFERÊNCIAS	63
3.	REFERÊNCIAS GERAIS	74

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Ações antrópicas e a presença de contaminantes

A Zona Costeira (ZC) é uma das faixas territoriais que sofre o maior estresse ambiental, desde a exploração de seus recursos naturais até o uso desordenado do território. As inúmeras atividades exercidas nesse local como expansão urbana, atividades industriais, mineradoras, turísticas e/ou agrícolas fazem com que a ZC apresente grande importância socioeconômica (Polette; Lins de Barros, 2012; Zhai *et al.*, 2020). Cerca de 50% da população mundial vive em áreas próximas a linha da costa (Lins de Barros & Milanés, 2020). Agregado a essa ocupação, crescimento e desenvolvimento socioeconômico nesta região vê-se os produtos dessa expansão em todos os ecossistemas costeiros, trazendo efeitos diretos e indiretos nos ambientes marinhos resultando, como por exemplo, na perda de biodiversidade, mudança na capacidade de produção de biomassa e alteração nos ciclos biogeoquímicos (Neves *et al.*, 2008; Aguilar *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2014).

As diferentes atividades humanas realizadas em áreas costeiras têm ocasionado sérios problemas de contaminação, disponibilizando no ambiente diferentes estressores. Derísio (1992) já caracterizava diversas fontes de contaminação provenientes de atividades antrópicas. Sendo estas desde fontes industriais, produzindo efluentes tóxicos compostos de óxidos de cobre, arsênio, chumbo, zinco e cobalto (Hortellani, 2008; Abessa, 2012; Muniz *et al.*, 2019); fontes urbanas, responsáveis pela liberação de matéria orgânica, fármacos, drogas entre outros (Nero *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2016; Merhaby *et al.*, 2020); além das fontes acidentais, caracterizada pelo derramamento de substâncias poluentes como petróleo, detergentes e metais, que podem chegar aos corpos d'água (Lins *et al.*, 2010; Magris & Giarrizzo, 2020).

Dentre os diferentes corpos d'água que sofrem com atividades antrópicas, temos os ambientes estuarinos. Ambientes que apresentam uma predominância fluvial sobre as forças marinhas, as quais formam áreas de baixo relevo com abundante suprimento de água (Aquino da Silva *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2019). Devido a sua hidrodinâmica é uma região favorável à retenção de nutrientes, sustentando uma atividade biológica intensa como fito e zooplâncton, e se transformando em viveiros de peixes e crustáceos. Além disso, este ambiente apresenta alta complexidade devido à interação de fenômenos como escoamento fluvial, ação da maré, mistura e dispersão de

salinidade e até mesmo a geometria do canal (Duarte & Vieira, 1997). Por conta desses fatores o ambiente estuarino é propício a realização de diversas atividades antrópicas como pesca, lazer, localização de portos, cidades, desportos náuticos, indústrias, atividades estas já relacionadas como possíveis fontes de contaminação (Derísio, 1992; Prósperi, 1993).

1.2 Zona Costeira – Estado de São Paulo

No Brasil, das 25 regiões metropolitanas (figura 1), 14 encontram-se em regiões estuarinas abrangendo cerca de 27% da população (Diegues, 1987; Lamparelli, 2001; Carriço & Pinho, 2021).

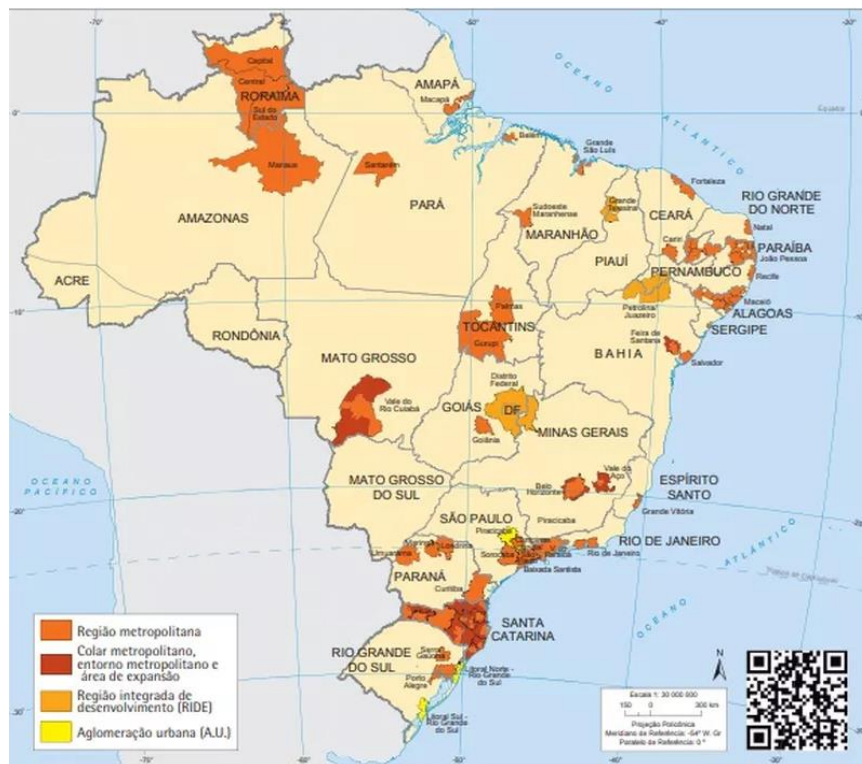


Figura 1. Cidades metropolitanas do Brasil (Fonte: Banco de imagens google imagens).

Dentre estas regiões metropolitanas, São Paulo destaca-se por ser o quinto estado com maior extensão litorânea e por possuir o maior porto da América Latina. Devido a esta extensão, o estado de São Paulo é dividido em quatro setores (figura 2), sendo: Litoral Norte, Baixada Santista, Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape (ou Litoral Sul) e Vale do Ribeira (Filet *et al.*, 2001).

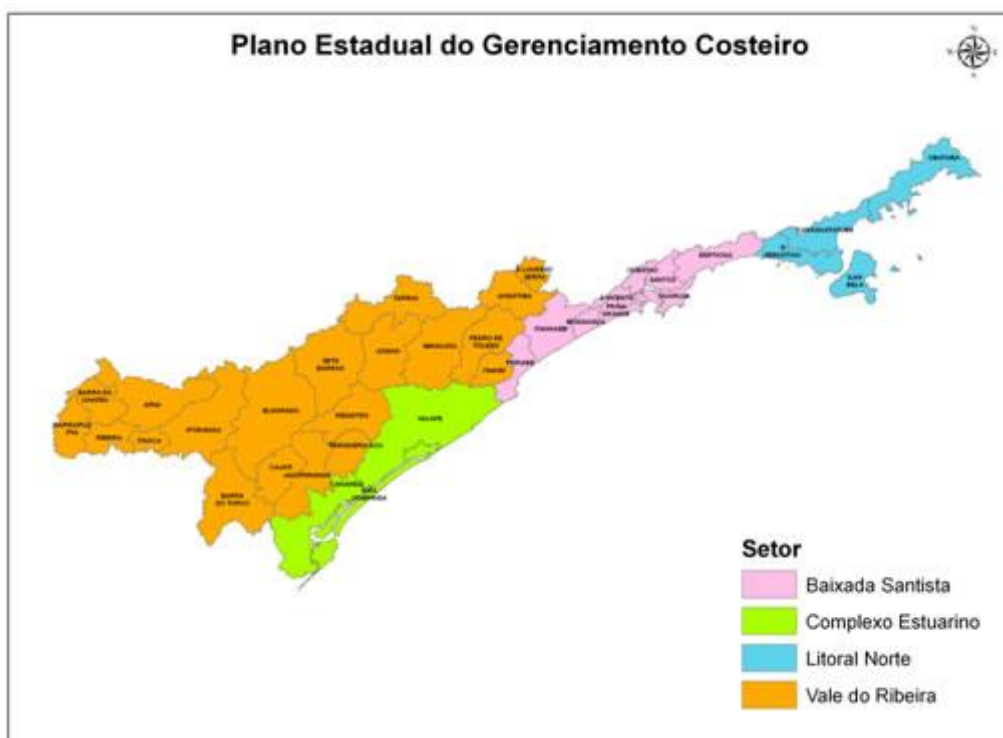


Figura 2. Plano Estadual do Gerenciamento Costeiro do Estado de São Paulo, caracterizando a divisão do litoral paulista em quatro setores (Fonte: Infraestrutura e meio ambiente governo de São Paulo, 2021).

O Litoral Norte é caracterizado pelo turismo de veraneio e a crescente especulação imobiliária. Em épocas de temporada, a região chega a duplicar seu número de habitantes. Além disso, as cidades de São Sebastião e Caraguatatuba possuem atividades portuárias. Devido às atividades exercidas, o Litoral Norte apresenta histórico de derramamento de petróleo e descarga de efluentes domésticos sem tratamento (Migotto *et al.*, 1993; Cetest, 1996; Carmona *et al.*, 2001). Entretanto, apesar das interferências antrópicas, o Litoral Norte é considerado uma região preservada apresentando mais de 80% do seu território inserido em unidades de conservação, que compõem uma das porções mais significativas de Mata Atlântica no país (SMA-CPLA, 2010).

O setor da Baixada Santista, com cerca de 1,7 milhões de habitantes, é caracterizada por possuir o maior porto da América Latina e o complexo industrial de Cubatão. Por consequência das intensas atividades econômicas locais e urbanização, a Baixada Santista recebe grande aporte de efluentes industriais, além das dragagens de sedimentos e efluentes domésticos (Muto *et al.*, 2001; Alisson, 2017; Kim *et al.*, 2019; 2020).

Por fim, o Vale do Ribeira e o Complexo Estuarino Lagunar Cananéia-Iguape possuem uma extensa área de proteção ambiental, desde áreas de proteção integral a reservas de desenvolvimento sustentável. Nestas regiões encontram-se pequenas cidades que vivem da atividade pesqueira, rural e turismo. Além disso, devido às suas características geográficas, foi historicamente explorada para a agricultura e mineração, atividades estas que ainda se fazem presentes economicamente (Marques, 2005; Ramires, 2012).

Estes quatro setores abrangem características ambientais e socioeconômicas distintas, trazendo desde áreas rigidamente protegidas a outras extremamente impactadas. Apesar da presença de unidades de conservação, a proteção da biodiversidade destas áreas depende de diversos fatores (Marinsek *et al.*, 2019). Entre esses fatores podemos citar o assoreamento e homogeneização dos leitos de rios, redução da diversidade de habitats, eutrofização e a própria contaminação química, que, juntos, acarretam a perda de qualidade ambiental (Lopes *et al.*, 2019).

Dessa forma, se fazem necessários estudos de monitoramento ambiental em ambientes relacionados a atividades antrópicas a fim de compreender o status de preservação destes ambientes e avaliar a efetividade das políticas e planos de manejo já existentes, assim como fornecer informações para viabilização de novas políticas e criação de planos de remediação.

1.3 Caracterização das áreas de estudo

1.3.1 Estação Ecológica Juréia – Itatins

A Estação Ecológica Juréia – Itatins (EEJI), foi criada em 1986 e regulamentada pela Lei n. 6.902/81 que dispõe sobre as Estações Ecológicas e as áreas de Proteção Ambiental. A EEJI possui uma área de 79.24ha abrangendo os municípios de Peruíbe (situado na Baixada Santista), Iguape, Miracatu e Itariri (situados no Vale do Ribeira). Trata-se de uma das maiores áreas protegidas no domínio da Mata Atlântica, além de ser considerada uma das mais restritivas dentre as unidades de conservação, destinando-se à conservação de ecossistemas naturais abrindo margem apenas para pesquisas. Na região existem também moradores residentes anteriores a criação da estação, que hoje vivem isolados e praticam com restrições atividades como agricultura e pesca (Marques & Duleba, 2004; Maier, 2016).

Por se tratar de uma unidade de conservação de proteção integral a região só recebe visitas relacionadas a pesquisa, ausentando qualquer atividade antrópica que pudesse ser exercida no local. Esta região vem sendo utilizada como área referência em diferentes estudos, que demonstram a ausência de contaminantes de origem antropogênica, reforçando a permanência como área de proteção ambiental (Souza & Barella, 2001; Pinheiro *et al.*, 2013; Baptista & Vieira, 2014; Duarte, 2014; Souza, 2016; Gonçalves *et al.*, 2020).

1.3.2 Sistema Estuarino Lagunar Cananéia – Iguape

O sistema estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape está localizado no litoral sul do Estado de São Paulo, fazendo parte da maior planície costeira de São Paulo, o complexo é formado por quatro ilhas: Iguape, Cananéia, Comprida e Cardoso (Suguio & Tessler, 1992). Devido seu tamanho esta região possui uma grande complexidade de características, dificultando seu enquadramento nas classificações de estuário, por isso denominado sistema estuarino lagunar (Miyao, 1977; Maluf, 2009). As principais atividades econômicas exercidas no local são o turismo, agricultura, pecuária e a pesca, sendo em escala local com o principal objetivo subsistência.

Apesar dessas atividades serem exercidas com maior intensidade nos dias de hoje, durante os séculos XVI ao XIX a região do Vale do Ribeira foi palco da mineração e refino de metais, abrindo portas para minas de chumbo, zinco e cobre (Maluf, 2009). Até o ano de 1990, os rejeitos da mineração eram diretamente lançados no Rio Ribeira de Iguape, principal afluente da região, contaminando os sedimentos ao longo do seu curso. Durante o século XIII, um canal artificial foi construído no intuito de facilitar a exportação de arroz, no entanto com aumento da mineração nos séculos seguintes, este canal serviu como um segundo destino dos rejeitos mineradores, fazendo com que o destino do aporte de metais fosse o sistema estuarino de Cananéia-Iguape (Mahiques, 2013).

Vários estudos pretéritos apontam a presença de metais, como Ferro (Fe), Cobre (Cu), Cádmio (Cd), Manganês (Mn), Chumbo (Pb), Zinco (Zn) e Níquel (Ni), sendo registrados não só no sedimento, mas em suspensão na coluna d'água dos rios e estuários, e em inúmeras espécies biomarcadora, como moluscos, artrópodes e peixes (Guimarães & Sígolo, 2008; Maluf, 2009; Mahiques, 2009; Choueri *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 2019; Pecoraro *et al.*, 2019). Na utilização de critérios canadenses, a CETESB

encontrou níveis de metais acima dos permitidos pela guia de qualidade em diferentes anos de monitoramento (Perina & Abessa, 2020). As concentrações destes elementos tendem a mudar conforme o local, sendo as maiores concentrações reportadas em locais próximos à abertura do canal. No sistema estuarino lagunar em si, os níveis de metais tendem a ser mais baixos, sendo considerados apenas moderados, seguindo os mesmos critérios internacionais que a CETESB (Environment Canada e Ministère Du Développement Durable, 2005; Environment Canada and De L'Environnement Et Des Parcs Du Québec, 2007; Chueri *et al.*, 2015).

Adicionalmente, as cidades litorâneas que compõem a região apresentam um déficit no tratamento e coleta de esgotos, resultando no despejo de efluentes diretamente no mar (Morais, 2014; CETESB, 2019), disponibilizando metais, fármacos, detergentes, entre outros que podem causar efeitos na biota (Mendonça, 2015; Collaço *et al.*, 2015; Souza, 2016; Mahiques *et al.*, 2013; 2019).

Mesmo com a presença de contaminantes de diferentes atividades antrópicas, a região em questão pode ser indicada como contaminada em níveis baixos a moderados. Considerada uma área de proteção ambiental (APA) apresenta um dos maiores berçários da vida marinha, trazendo consigo uma importância ecológica pelo número de espécies que abriga. Além de ser classificada como patrimônio da humanidade pela UNESCO (Bernardes, 2001; Amorim, 2012).

1.3.3 Canal de Santos-São Vicente

Os municípios de Santos e São Vicente estão localizados na região da Baixada Santista – Litoral Sul, região com aproximadamente 1,7 milhões de habitantes composta por 9 municípios: Santos, São Vicente, Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém, Cubatão, Guarujá, Bertioga e Peruíbe. O sistema estuarino de Santos-São Vicente é uma região muito exposta à poluição, devido a infinidade de atividades exercidas no local como o grande parque industrial de Cubatão, porto de Santos, agricultura, além do grande número de habitantes. Com quase 800 mil habitantes, Santos e São Vicente são as cidades mais populosas da Baixada Santista, com seus atrativos econômicos e turísticos esse número tende a subir (Hortellani *et al.*, 2008; IBGE, 2020).

Dentre as principais fontes de poluição tem-se o polo industrial de Cubatão, responsável pela emissão de elementos metálicos (Braga *et al.*, 2019), fertilizantes fosfatados (Santos *et al.*, 2020) e a disposição irregular de resíduos sólidos, que

acarretam um prejuízo a toda cadeia trófica através de bioacumulação ou biomagnificação. Outra fonte de poluição é o maior porto da América Latina, localizado no canal de Santos, canal este que sofre constantemente com obras de dragagem. Devido ao grande movimento do porto, esta região possui um intenso tráfego de navios ocorrendo perdas durante as operações de carga/descarga, armazenamento, transferências de produtos químicos e lavagens de porões/containers.

Vários estudos relatam contaminação por metais (Kim *et al.*, 2017; Braga *et al.*, 2019), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Martins *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2020), antiincrustantes biocidas (Santos *et al.*, 2016; Abreu *et al.*, 2020) e *pellets* de plástico (Taniguchi *et al.*, 2016; Gimiliani *et al.*, 2020). Além das atividades industriais e portuárias, os efluentes sanitários demonstraram ser um problema ambiental presente neste estuário em questão apresentando contaminantes “legados” emergentes (como compostos farmacêuticos e cocaína) (Gimiliani *et al.*, 2016; Pusceddu *et al.*, 2019). Ademais, as estações de tratamento de esgotos, o emissário submarino, descargas de esgotos domésticos clandestinos e os aterros sanitários são grandes fontes de poluição (CETESB, 2019). Devido as inúmeras fontes de poluição, estudos mostraram que o sistema estuarino de Santos-São Vicente contém alto risco ecológico e alta toxicidade (Pusceddu *et al.*, 2018; 2019).

1.4 Ferramentas de avaliação de qualidade ambiental

1.4.1 Análises físico-químicas

Sendo o estuário uma região extremamente procurada por diferentes atividades antrópicas também encontramos diferentes contaminantes disponibilizados nestes ambientes. Os resíduos descartados podem alterar a qualidade da água e do sedimento (Jardim, 2004). Dessa forma análises físico-químicas auxiliam na adequação destes ambientes a uma legislação específica e/ou prevenir danos a biota aquática como a saúde destes ambientes (Betemps *et al.*, 2014).

Além disso alguns contaminantes específicos, como os metais, podem ser encontrados naturalmente nos ambientes devido a composição rochosa de cada região, contudo, estes contaminantes apresentam como característica a incorporação no meio aquático (Martins *et al.*, 2017). O sedimento se caracteriza como um ótimo sumidouro para os metais pesados, já que estes se precipitam e através de interações físico-químicas conseguem se fixar definitivamente (Martins *et al.*, 2017). Sendo o sedimento um compartimento ativo em ambientes aquáticos, os contaminantes presentes nele

podem ser remanejados e redistribuídos para a coluna d'água e biota aquática. Assim, além de características físico-químicas da água, a análise de metais no sedimento pode nos predizer a saúde do ambiente em questão.

1.4.2 Biomarcadores

No início os estudos de avaliação de qualidade ambiental consideravam apenas as quantificações de características físico-químicas da água (Parron *et al.*, 2011). Contudo, as análises físico-químicas isoladas não mostram todo o contexto do efeito da contaminação no ecossistema, e tão pouco podem ser relacionadas diretamente com os efeitos biológicos (Baptista, 2008).

Por conseguinte, o monitoramento biológico surgiu com o interesse de se conhecer a qualidade ambiental avaliando a toxicidade de efluentes com a utilização de organismos ou sistemas biológicos expostos a contaminantes (Benincá, 2006; Sousa *et al.*, 2014). Quando se utiliza organismos como marcadores de poluição percebe-se que vários poluentes são capazes de afetar diferentes níveis biológicos (Calabrese, 1991; Bagliano, 2012). Estudos com contaminantes orgânicos e inorgânicos como pesticidas, metais e fármacos mostraram respostas como bioacumulação, alterações respiratórias, vulnerabilidade à predação, alterações endócrinas e moleculares em peixes; além de alterações na locomoção, alimentação, e reprodução de crustáceos e moluscos (Arunachalam *et al.*, 1980; Zhadan *et al.*, 1992; Kamble, 2008; Brodin *et al.*, 2017; Dhara *et al.*, 2017; Maciel, 2019).

Estudos avaliando os efeitos dos agrotóxicos demonstraram comprometimento nas taxas de crescimento e reprodução, mudanças bioquímicas, fisiológicas e comportamentais nos organismos aquáticos (Van der Oost *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2018; Vianna *et al.*, 2019; Dourado, 2019). Análises com tintas antiincrustantes também mostraram efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos e obesogênicos, em peixes, crustáceos, protocordados e mamíferos (Varela-Ramirez *et al.*, 2011; Kanimozhi *et al.*, 2016; Silva, 2019; Santos *et al.*, 2020).

Desta forma, os contaminantes podem afetar desde níveis biológicos inferiores (molecular, bioquímico, celular, tecidual e sistêmico) à superiores (organismo, população, comunidade e ecossistema) (Pusceddu *et al.*, 2018). Qualquer variação nestes níveis pode ser avaliada em tecidos ou fluidos corporais, e até mesmo em nível de organismo, estas respostas e/ou variações em questão são consideradas biomarcadores (Depledge, 1993). No biomonitoramento, quanto mais rápido for a

identificação de fatores que afetam de maneira adversa o ambiente ou as espécies estudadas, maior serão as chances de mitigação deste impacto aos níveis superiores da organização biológica (Arias *et al.*, 2007). Considerando que variações em níveis superiores são precedidas com modificações nos processos biológicos, biomarcadores em níveis hierárquicos inferiores podem servir como alerta sobre os efeitos dos contaminantes ambientais.

Podemos classificar os biomarcadores em três classes, o de susceptibilidade, os de efeito e os de exposição (Who, 1993; Amorim, 2003; Choueri, 2015), sendo neste trabalho o enfoque em biomarcadores de efeito e de exposição:

- Os biomarcadores de efeito, são usados em casos de alterações pré-clínicas ou alterações que trazem prejuízos a saúde em resposta à exposição a um xenobiótico. Como por exemplo, a enzima acetilcolinesterase (AChE);
- Por último temos os biomarcadores de exposição, utilizados para avaliar a resposta de um indivíduo ou grupo em relação a uma substância específica. Como é o caso da ativação do sistema antioxidante em casos de metais no interior das células.

Sabendo que biomarcadores bioquímicos e celulares avaliados nos tecidos dos organismos podem determinar o estado de saúde de um indivíduo. O estudo dos tecidos (histologia) também se torna uma ferramenta sensível para se diagnosticar efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetem tecidos animais. Por isso é considerada um excelente método de avaliação de bioindicadores de impacto ambiental (Albinati, 2009). Dentro dos diversos tecidos usados na histologia, os tecidos de brânquias e fígado são considerados órgão alvo dos efeitos de contaminantes, sendo amplamente usados em estudos com contaminação aquática.

Estudos mostram que as brânquias estão em contato direto com os poluentes do ambiente, e podem ser usadas como indicadores sensíveis de toxicidade (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2010). Em águas contaminadas com metais e surfatantes foram encontradas patologias como hipertrofia e descamação do epitélio respiratório (Randi *et al.*, 1996; Arellano *et al.*, 1999; Rosety-Rodriguez *et al.*, 2002). Já fusão lamelar foi encontrada em áreas com fontes específicas de contaminantes como efluentes de indústria de papel clorado, cobre e efluentes de esgoto com tratamento secundário (Arellano *et al.*, 1999; Valdez Domingos, 2001; Pacheco & Santos, 2002). O

descolamento de epitélio também foi observado em ambientes com cobre e organofosforados (Fanta *et al.*, 2003; Fonseca, 2017). Tanto o descolamento do epitélio quanto a fusão lamelar prejudicam as trocas gasosas, além de causar distúrbios na osmorregulação, mecanismos essenciais à sobrevivência dos organismos. Sendo a brânquia o principal órgão de osmorregulação e trocas gasosas, qualquer mudança em suas funções traz um efeito direto na saúde do animal.

O fígado é um órgão muito utilizado nos estudos para avaliar contaminação, devido sua função de detoxificação, dada pela capacidade dos hepatócitos de metabolizar e excretar substâncias tóxicas ao organismo (Roberts, 2001). Alterações como vacuolização dos hepatócitos, inflamação, alteração no formato dos capilares sinusóides podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, dessa forma seriam indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (TEH *et al.*, 1997; Santos, 2010).

Alterações como degeneração celular e nuclear, hipertrofia celular e nuclear, vacuolização citoplasmática, e centro de melanomacrófagos, já foram associadas a áreas contaminadas por esgoto doméstico e agroindustriais (Silva, 2004). Locais próximos a polos petroquímicos, exposição metabólica a agentes patogênicos e metais também se relacionaram a patologias como necrose e vacuolização dos hepatócitos (Rabitto *et al.*, 2006; Figueiredo-Fernandes, 2007; Flores & Malarbarba, 2007).

Estudos mostram que peixes expostos a ambientes aquáticos degradados apresentam como patologias as respostas inflamatórias, como tentativa primária de defesa e desintoxicação (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005; Oliveira Ribeiro & Narciso, 2016; Vieira *et al.*, 2019). Patologias como estas podem se relacionar com alterações na morfologia e funcionalidade dos hepatócitos acarretando numa possível falha de função. Sendo os hepatócitos as principais células do fígado, este pode deixar de realizar suas funções de detoxificação e/ou funções ligadas ao metabolismo provocando um déficit na saúde do animal (Bernet *et al.*, 1999).

Como visto, alterações histopatológicas são comumente utilizadas como biomarcadores na avaliação da saúde do organismo. Atrelado a respostas teciduais temos as respostas subcelulares, os biomarcadores bioquímicos. Sua utilização oferece diversas vantagens já que são considerados os primeiros a serem detectados, além de serem sensíveis e específicos (Berenger *et al.*, 2013). Os biomarcadores bioquímicos apresentam uma grande diversidade abrangendo desde enzimas antioxidantes até

enzimas de biotransformação. Ao usarmos biomarcadores bioquímicos e histológicos em conjunto cria-se uma ferramenta útil para a análise preditiva da saúde dos organismos.

Na ecotoxicologia aquática, estes tipos de respostas são vistos em diferentes organismos (Schulz & Martins-Junior, 2001). Dentre os diferentes organismos, os peixes são animais extremamente usados, principalmente por apresentarem respostas a componentes tóxicos de maneira semelhante aos grandes vertebrados. Além de se tratar de componentes essenciais na cadeia trófica, já que atuam como predadores e presas. Os peixes possuem também diferentes estratégias reprodutivas e comportamentais, estando expostos aos contaminantes por diferentes vias, desde sua respiração, reprodução e/ou alimentação, com diferentes taxas e tipos de contaminação (Schulz & Martins-Junior, 2001).

1.5 Espécie biomonitora

Algumas espécies marinhas apresentam um hábito bentofágico, caracterizando espécies que vivem e se alimentam perto do substrato (Pimentel, 2013). Dessa forma, animais que apresentam este hábito estão suscetíveis de forma direta a contaminantes depositados no sedimento.

O bagre branco (*Genidens barbatus*), pertencente à família Ariidae, habita águas profundas e em águas costeiras associadas a fundos lamacentos ou arenosos, buscando rios ou lagos no período da desova, caracterizando-se como uma espécie estuarina dependente (Ferraris, 2007; Tavares & Beneditto, 2017). Dessa forma, ao se utilizar bagres juvenis estamos utilizando um organismo que nunca saiu do estuário. Ademais, apresenta hábito carnívoro consumindo vertebrados e invertebrados, como peixes, crustáceos, moluscos e poliquetas (Froese & Pauly, 2017). Por conta de sua preferência alimentar podemos levantar mais uma via de contaminação, onde através da alimentação temos taxas de bioacumulação e biomagnificação.

Além disso, a família Ariidae é um grupo de peixes importante para a pesca comercial em todo o mundo. A espécie *Genidens barbatus* se distribui do sudeste brasileiro ao Uruguai, sofrendo grande pressão da pesca, principalmente pela frota industrial de cerco (traineiras) e espinhel (Mendonça *et al.*, 2017). Por conta disso tal espécie é tratada como ameaçada de extinção, trazendo consigo uma preocupação de conservação em águas brasileiras (Marceniuk, 2005; MMA, 2014).

OBJETIVOS GERAIS

Considerando que as regiões estuarinas do Litoral de São Paulo apresentam diferentes cenários de contaminação ambiental, e, portanto, a necessidade de uma avaliação de qualidade ambiental desse ecossistema, este trabalho teve por objetivo avaliar a saúde de bagres em estuários com diferentes interferências antrópicas ao longo da região costeira de São Paulo. Espera-se a partir dos resultados obtidos compreender os efeitos de diferentes cenários de contaminação e da natureza da contaminação sobre a qualidade destes ecossistemas.

O presente trabalho será apresentado em um capítulo em forma de artigo científico:

CAPÍTULO I

Capítulo formatado de acordo com as normas da revista “Marine Pollution Bulletin”

Integrated analysis of responses from three levels of biological organization of *Genidens barbatus* sampled in three estuaries off the coast of São Paulo, Brazil

Nathalia Sales Soares do Nascimento^{1*}; Alexandre Rodrigo Gonçalves¹; Paloma Kachel Gusso-Choueri²; Renata de Britto Mari¹.

¹Laboratório de Morfofisiologia Animal - LABMA, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Praça Infante Dom Henrique, s/n, CEP 11330-900 São Vicente, SP, Brazil.

²Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática - NEPEA, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Praça Infante Dom Henrique, s/n, CEP 11330-900 São Vicente, SP, Brazil.

*Corresponding author: N. S. S. Nascimento. Email: nathalia.sales@unesp.br
<https://orcid.org/0000-0002-6521-876X>

RESUMO

A diferença entre cenários ambientais e antrópicos em ambientes costeiros, traz características distintas ao ambiente que serão refletidas nos organismos. No entanto, a análise de qualidade e saúde ambiental acaba dependendo de análises físico-químicas. Assim, o objetivo do estudo atual foi investigar a qualidade ambiental e saúde de bagres coletados em três estuários com diferentes cenários políticos e ambientais, utilizando uma análise integrada de biomarcadores (subcelulares, teciduais e individuais) nas brânquias e no fígado. Viu-se maiores alterações subcelulares e teciduais no fígado em comparação as brânquias. Já em análise integrada, JES (área de proteção integral), CAN (APA com taxas moderadas de contaminação) e SSV (grandes interferências antrópicas), trouxeram diferenças na qualidade ambiental e saúde dos organismos que se relacionam aos cenários estudados, onde SSV apresenta alto risco ecológico com mudanças na histopatologia dos dois órgãos e CAN um pior índice de saúde no contexto bioquímico.

Palavras chaves: Sistema antioxidante – Histopatologia – Análise integrada – Contaminação – Bagre – Litoral paulista

1. INTRODUÇÃO

O conjunto da ocupação territorial e os impactos de atividades antrópicas causam uma cadeia de efeitos diretos e indiretos nos ambientes costeiros, como, perda da biodiversidade, mudança na capacidade de produção de biomassa, e entre outros efeitos que provocam uma grande preocupação global quanto ao futuro da região, principalmente por se tratar de um meio “sem barreiras” onde diferentes cenários podem ser afetados por atividades antrópicas (Sousa *et al.*, 2014; Tesser *et al.*, 2021). Dentre os ambientes da zona costeira, os estuários são considerados altamente complexos devido suas variáveis. Características como a variação da salinidade, diferentes padrões hidrográficos, temperaturas, pH, diferentes níveis de nutrientes etc., fazem com que este ambiente esteja sob estresse naturalmente, dificultando o seu monitoramento (Elliott & Quintino, 2019).

O Estado de São Paulo o mais populoso do Brasil, e da América Latina, classificando-se entre os 10 maiores estados do mundo (IBGE, 2017; U.S. Censures, Resident population, 2020), apresenta uma extensão de faixa de litorânea de aproximadamente 700km distribuídas por 15 municípios (Governo de São Paulo, 2013). Dentro do litoral paulista encontram-se diferentes cenários de proteção ambiental, socioeconômicos e consequentemente de contaminação. Por exemplo, têm-se a região de Cananéia considerada um sítio Ramsar de interesse global, sendo um dos maiores berçários de vida marinha. Do outro lado tem-se a Baixada Santista composta por 9 municípios e um alto histórico de desenvolvimento populacional, imobiliário, industrial e portuário. Esta região traz consigo níveis de proteção mais brandos, permitindo uma diversidade de atividades antrópicas que atualmente geram uma série de ameaças ao saneamento público e ambiental (Carriço & Pinho, 2021).

Ainda no sudeste do estado de São Paulo encontra-se o Vale do Ribeira, apresentando grandes remanescentes florestais da Mata Atlântica, muitos deles inseridos em áreas de proteção integral ou ocupação sustentável (Ramires, 2012). Mas, considera-se este território um dos mais pobres de São Paulo, apresentando em sua maioria atividades de subsistência ou de baixo impacto ambiental (Munari, 2009). Esta

discrepância entre os cenários socioeconômicos e ambientais também serão refletidos na biodiversidade destes ambientes. Cenários como os de proteção integral tendem a manter a ausência de interferências antrópicas. Já em regiões com legislações mais brandas vê-se a realização de diferentes atividades, como ocupação do território, turismo, atividades industriais, mineradoras etc., atividades como estas disponibilizam diferentes xenobióticos capazes de afetar diferentes níveis biológicos (Calabrese, 1991).

A maioria destes contaminantes tendem a atingir os sedimentos, componentes cruciais dos ecossistemas aquáticos (Liu *et al.*, 2019). Ao contrário da coluna d'água, por conta de suas características mais estáveis, estão sujeitos ao acúmulo de uma infinidade de contaminantes inorgânicos e orgânicos (Ustaoglu & Tepe, 2019). Sem dúvida, uma das principais estratégias foi a elaboração de guias de qualidade de sedimentos (SOGs), guias criadas após anos de experiência, que retratam que perspectivas de longo prazo no gerenciamento de ambientes aquáticos requerem “estratégias integradas”, nas quais diversas linhas de evidências devem ser consideradas. As SOGs são, em sua maioria, derivadas da integração entre níveis de contaminantes no ambiente, nos indivíduos e a toxicidade destes poluentes em uma abordagem de pesos de evidência a fim de avaliar o risco a saúde do ecossistema (Birch, 2018).

Dada a esta complexidade, diversos foram os esforços para se elaborar ferramentas de tomada de decisão tanto no âmbito regulatório como de monitoramento ambiental e assim quantificar a magnitude da ameaça da contaminação. Diversas abordagens biológicas utilizadas no desenvolvimento e aplicação para avaliação de qualidade de ambientes marinhos (Marine Strategy Framework directives) são reconhecidamente importantes, porém muitos dos órgãos ambientais muitas vezes consideram apenas respostas em nível individual (e.g. letalidade, efeitos na reprodução). Estratégias que utilizem repostas subletais, consideradas como sinais prévios de efeitos deletérios devem ser incentivadas e aplicadas no contexto regulatório com o objetivo de refinar os resultados e realizar uma gestão mais preventiva que preditiva.

Dentre os organismos utilizados como marcadores biológicos de qualidade ambiental têm-se os peixes (Tesser *et al.*, 2021). Além de apresentarem uma diversidade de espécies, trazem diferentes hábitos alimentares, comportamentais e particularidades fisiológicas (Lacerda *et al.*, 2020). Para análise da saúde desses animais são extremamente usados os biomarcadores, já que estes são repostas de diferentes vias

dentro do organismo, como enzimas metabólicas, alterações nos tecidos, índices de condição, e que muitas vezes respondem ao ambiente (Van der Oost *et al.*, 2003). As brânquias, por exemplo, se trata de um órgão em contato direto com o ambiente e/ou seus contaminantes, já que apresenta como função as trocas gasosas e todo aparato respiratório do animal, dessa forma as alterações encontradas apresentam um papel importante no entendimento da saúde deste animal (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002). Por seu contato direto com o ambiente, também são indicadores sensíveis de toxicidade (Pereira, 2010). A presença de xenobióticos pode influenciar as atividades enzimáticas e fisiológicas das brânquias, causando alterações bioquímicas e morfológicas (Macedo *et al.*, 2020). Diferentes estudos trazem respostas como aumento do estresse oxidativo, apresentando inibição de enzimas ou maior ativação das mesmas em peixes expostos a metais pesados (Khalil *et al.*, 2020). Alterações histopatológicas como fusão lamelar, alterações no epitélio, inclusões fibrilares foram encontradas em peixes (*Channa punctatus*) expostos a herbicidas, e em *Menticirrhus americanus* e *Micropogonias furnieri* coletados em regiões com atividades industriais (Badroo *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2020).

Além das brânquias, dentre os órgãos encontrados nos peixes, o fígado também é um órgão altamente escolhido para análise destas alterações por apresentar um papel importante no metabolismo e desintoxicação de diferentes xenobióticos (Bernt *et al.*, 1999). Sua capacidade de biotransformação e acumulação de xenobióticos faz com que a concentração seja mais elevada do que em outros órgãos, e até mesmo do que o meio ambiente (Novaes, 2019). A concentração de xenobióticos e/ou seus metabólitos no fígado pode alterar o metabolismo, ligações, morfologias, como o aumento ou inibição de enzimas antioxidantes, aumento da concentração de lipídios, e entre outras alterações (AnvariFar *et al.*, 2018; Weber *et al.*, 2020). Estudos com rejeitos de mineração mostraram grande taxa de bioacumulação no fígado de peixes, além de um aumento nas respostas oxidativas (Gabriel *et al.*, 2020). Em peixes coletados no Rio Sena, região afetada por atividades portuárias e industriais, mostrou-se uma capacidade reduzida de controlar o estresse oxidativo além de acúmulo de lipídios no tecido hepático (Borcier *et al.*, 2020).

Dessa forma, considerando as diferentes políticas de preservação ambiental e interferência antrópica encontradas no Litoral de São Paulo, este estudo teve como objetivo utilizar 3 áreas com distintos históricos de atividade antrópica e cenários de

integridade ambiental como estudo de caso no contexto de uma abordagem integrada de avaliação de qualidade ambiental. Para tanto, foram avaliadas respostas em nível sub-celular (GST, GPx, GSH, LPO e danos em DNA), respostas em nível celular e tecidual (alterações histopatológicas), como em nível individual (índice de condição e índice hepatossomático) nas brânquias e no fígado de uma espécie de peixe (*Genidens barbus*) que habita os sedimentos. O intuito desta abordagem é compreender e prever a biodisponibilidade e os efeitos adversos dos contaminantes presentes nestes ambientes e fornecer informações a cerca da qualidade destes ambientes para os tomadores de decisão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

As coletas foram realizadas em três estuários do litoral do Estado de São Paulo com diferentes políticas de preservação ambiental e interferência antrópica (Figura 1). Os estuários utilizados no atual estudo não possuem ligação entre si, apresentando em média 90km de distância entre os pontos.

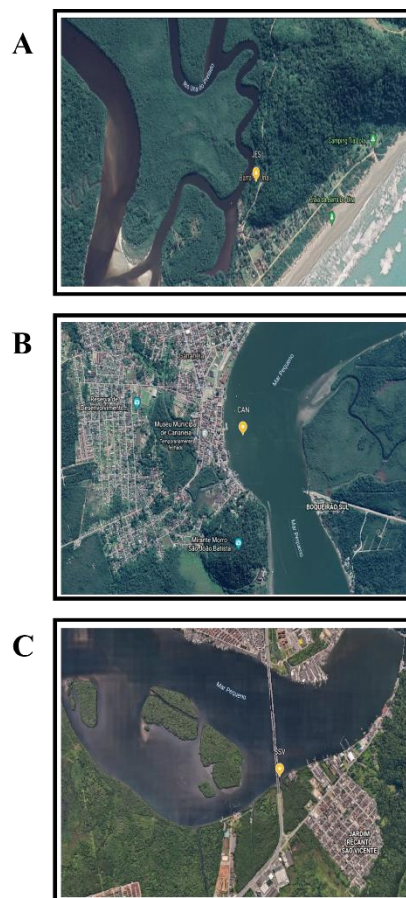


Figura 1. Mapa indicando as regiões de coleta de *Genidens barbatus*. A: JES – Estação Ecológica Juréia – Itatins (24°26'16"S 47°04'16"W). B: CAN – Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia Iguape (25°00'59"S 47°55'29"W). C: SSV – Sistema Estuarino de Santos-São Vicente (23°59'04"S 46°24'02"W).

O primeiro ponto de coleta (Figura 1A) é a região do Rio Una localizado dentro da Estação Ecológica Juréia – Itatins (EEJI). A EEJI abrange uma das maiores áreas protegidas da Mata Atlântica. A região é considerada por lei como uma área de proteção ambiental restrita permitindo apenas pesquisas científicas, além de comunidades tradicionais anteriormente existentes no local, dessa forma diferentes estudos a utilizam por se considerar uma região sem interferências antrópicas (Marinsek *et al.*, 2018; Nascimento, 2018; Gonçalves *et al.*, 2020).

O segundo ponto de coleta está localizado em um estuário na região de Cananéia (Figura 1B), área considerada uma área de proteção ambiental (APA) (Bernardes, 2001). Ao longo dos anos, a região tem sido estudada como parte de análises ambientais e estudos de biomonitoramento, já que apresenta níveis altos de oxigênio dissolvido, mas níveis moderados de metais, por exemplo (Braga *et al.*, 2019; Chagas, 2020; Perina & Abessa, 2020). Mesmo sendo classificada como uma região com impactos naturais e/ou influência antropogênica baixa a moderada, estudos sugerem que a contaminação tende a aumentar na região como resultado de diferentes fontes (Perina & Abessa, 2020).

O terceiro ponto de coleta (Figura 1C), no sistema estuarino de Santos-São Vicente, encontra-se uma região com histórico de degradação ambiental resultante de múltiplas e intensas atividades antrópicas (Oliveira *et al.*, 2020). Apresentando como atividades principais, o centro industrial de Cubatão disponibilizando componentes orgânicos e inorgânicos no ambiente (Braga *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020), e o complexo portuário de Santos disponibilizando diferentes xenobióticos relacionados a contaminação hídrica e sedimentar (Abreu *et al.*, 2020; Gimiliani *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020). Sendo assim, trata-se de uma região com altos índices de contaminação.

2.2 Análise metais no sedimento

Nas três áreas de estudo, amostras de sedimento foram coletadas, armazenadas e mantidas refrigeradas em geladeira 4°C, até a análise. As amostras foram liofilizadas e homogeneizadas para análise de elementos traços seguindo SW 846 US EPA 350b (USEPA, 1996). A quantificação dos metais (As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Sc, Sr, Ti V e Zn) foi realizada através de espectrometria óptica por plasma acoplada indutivamente

(ICP-OES). Para elaboração das curvas padrão foi utilizado o *Qhemis High Purity* como material de referência e para controle de qualidade das análises baseou-se no método de adições padrão (MSA) (USEPA, 1996). Todas as amostras foram duplicadas além da utilização da amostra em branco. Os resultados serão apresentados em mg/kg.

2.3 Espécie biomonitora e coleta de amostras

O modelo biológico escolhido para o presente trabalho foi *Genidens barbatus* pertencente à família Ariidae, família que apresenta grande importância econômica por conta da pesca, e por esse mesmo ponto uma importância ecológica (Mendonça *et al.*, 2017; MMA, 2014). Se trata de um animal com hábitos bentofágicos e preferência alimentar carnívora (Froese & Pauly, 2017), apresentando assim contato direto com a contaminação através do sedimento e da água, e o contato indireto através da alimentação.

Além disso, se trata de uma espécie estuarina dependente fazendo que os organismos juvenis apresentem características relacionadas ao estuário em que vivem já que estes só seguirão para mar aberto quando adultos. Assim, foram coletados 20 exemplares juvenis em cada uma das três regiões (JES, CAN e SSV) durante o inverno. Em seguida, em aeração constante, os animais foram transferidos para o Laboratório de Morfofisiologia Animal do Instituto de Biociências – Campus do Litoral Paulista, onde passaram por 12 horas de aclimação para padronizar e prevenir o estresse da coleta e do transporte. As determinações físico-químicas básicas como pH, oxigênio dissolvido, salinidade e temperatura da água foram feitas em cada ponto no momento da coleta. Após eutanásia com tempo padronizado em benzocaína a 50ppm (diluída em 10mL de acetona), foram mensurados o peso e o comprimento total para cálculo do índice de condição.

O índice de condição de Fulton foi calculado a partir da fórmula, $K = 100 \cdot (W/L^3)$, onde W corresponde ao peso (g) e L ao comprimento (cm) elevado a 3ª potência (Nash *et al.*, 2016). Outro índice utilizado relacionado a saúde do peixe foi o índice hepatossomático (IHS), baseado na relação do peso do órgão (fígado) e o peso total do animal. Para sua determinação foi usada a equação (peso do órgão/peso total) x 100.

Além disso, amostras de brânquias e fígado foram coletadas e destinadas para as análises bioquímicas e histológicas. As amostras para bioquímica foram colocadas em *ependorffs* e armazenadas em freezer -80°C até o processamento. Para histologia

foram fixadas por 24 horas em solução de formol 10%, depois lavadas e conservadas em etanol 70% até o início do processo histológico.

2.4 Biomarcadores bioquímicos

Para análise do sistema antioxidante foram avaliados biomarcadores de exposição: as enzimas antioxidantes Glutathione S- Transferase (GST) e Glutathione Peroxidase (GPx), assim como a quantificação de tióis reduzidos não proteicos (GSH), e biomarcadores de efeito: a peroxidação lipídica (LPO) e danos de DNA (Van der Oost *et al.*, 2003). As amostras foram homogeneizadas em Tampão Tris-HCl (Tris 50mM; EDTA 1mM; DTT 1mM; surose 50mM; KCl a 150 mM; PMSF 1mM, pH 7,6) a 4% p/v. Após a homogeneização, as alíquotas foram utilizadas para as análises de dano em DNA e peroxidação lipídica (LPO). Através da quantificação da concentração de ácido 2-tiobarbitúrico reativo substratos (TBARS) através de fluorescência (λ_{ex} 532 nm e λ_{em} 556 nm) foram determinados os níveis de peroxidação lipídica (LPO) (Wills, 1987). Os resultados são expressos em micrograma de TBARS por miligrama de proteínas totais. Já para os danos em DNA foi usado um ensaio de precipitação alcalina (Olive, 1988; Gagne & Blase, 1995). As fitas de DNA são quantificadas usando fluorescência (λ_{ex} 360nm e λ_{em} 450 nm). Para elaboração da curva padrão foi utilizado DNA genômico de esperma de Salmão. Os resultados são expressos em micrograma de DNA sobrenadante por miligrama de proteína.

Após esse processo o restante das amostras foi centrifugado a 12.000g durante 20min a 4°C e destinadas à análise das enzimas do sistema antioxidante. Em espectrofotometria a 340 nm foram determinadas as atividades de GST e GPx (Keen *et al.*, 1976; Sies *et al.*, 1979). E em 415 nm para análise dos níveis de GSH (Sedlak & Lindsay, 1968). Os resultados de GPx são expressos em nanomoles de NADPH. Os de GST são expressos em nanomoles de GSH-CDNB por minuto. E de GSH em nanomoles de tióis por miligrama de proteínas totais.

Todos os resultados obtidos foram normalizados para a concentração de proteínas totais de acordo com Bradford, 1976. Foi utilizado um leitor de microplacas para todas as leituras de absorbância e fluorescência.

2.5 Processamento histológico

2.5.1 Análise histopatológica das brânquias

Foram utilizados três cortes semi-seriados de 5µm com distância de 200µm foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise histopatológica e

mensuração do comprimento lamelar secundário (CL), espessura da lamela (EL), distância interlamelar (DL) e espessura da base (EB). Para análise da densidade de células mucosecretoras do epitélio branquial 3 cortes semi-seriados de 5µm de espessura foram corados com ácido periódico de Schiff e contra corados com Azul de Alcian (pH 2,5) para evidênciação das células secretoras de muco neutro (PAS+) e ácido (AB+).

A análise histopatológica foi feita de acordo com adaptações dos seguintes trabalhos Poleksic & Mitrovic (1994) e Bernet *et al.* (1999):

2.5.1.1 Análise por Poleksic & Mitrovic (1994)

Na análise de Poleksic & Mitrovic (1994), as patologias (tabela 1) foram divididas em três estágios: (I) Alterações que não danificam os tecidos branquiais; (II) Alterações mais graves, mas reparáveis; e (III) Alterações que não permitem restauração da estrutura das brânquias. Cada estágio recebe então um grau de severidade, 10⁰ para o estágio I, 10¹ para o estágio II e 10² para o estágio III.

Tabela 1. Patologias branquiais de acordo com Poleksic & Mitrovic (1994).

Hipertrofia e hiperplasia do epitélio	Levantamento do epitélio Infiltração Leucocitária Afundamento do epitélio Ruptura do epitélio lamelar Hiperplasia focal Hiperplasia da base Hiperplasia irregular Fusão das lamelas primárias Espessamento descontrolado Encurtamento da lamela secundária Fusão da lamela secundária Fusão completa
Mudanças em células da mucosa e/ou células de cloreto	Hipertrofia e hiperplasia de células mucosas Ausência de células mucosas Hipertrofia e hiperplasia das células de cloreto Células de cloreto na lamela secundária
Mudanças nos vasos sanguíneos	Telangiectasia lamelar Alargamento de vasos sanguíneos Hemorragia Ruptura do epitélio
Parasitas	Presença

Estágios terminais	Fibrose Necrose
---------------------------	--------------------

Para o cálculo do índice é feita uma multiplicação do grau de severidade pelo somatório de patologias presentes do estágio em questão. A fórmula usada para tal foi definida da seguinte forma:

$$I = \sum_{i=1}^{19} a_i + 10 \sum_{i=1}^5 b_i + 10^2 \sum_{i=1}^2 c_i$$

onde I é o índice de alterações em uma brânquia de peixe, a é o primeiro estágio de alterações, b o segundo estágio e c o terceiro estágio de alteração. Ao final o índice foi classificado de acordo com os efeitos das alterações no peixe (tabela 2).

Tabela 2. Classificação do índice de alteração de brânquias de acordo com Poleksic & Mitrovic (1994).

Índice de patológico	Danos
0-10	Funções normais
11-20	Dano significativo a moderado
21-50	Dano moderado a risco a saúde
>50	Danos irreparáveis

Análise por Bernet *et al.* (1999)

No caso da classificação por Bernet *et al.* (1999), a relevância de uma lesão (tabela 3) depende de sua importância patológica, ou seja, como ela afeta a função do órgão. Para isso as alterações foram classificadas em três fatores de importância: (1) Importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível, pois a exposição ao estressante termina; (2) Importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos se o estressor for neutralizado; (3) Grande importância patológica, a lesão geralmente é irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão.

Tabela 3. Patologias branquiais de acordo com Bernet *et al.* (1999).

PATOLOGIAS		
Hipertrofia do Epitélio	Ruptura do Epitélio	Fusão Lamelar
Levantamento	Hiperplasia L2 ^a	Encurtamento Epitélio
Infiltração	Hiperplasia Irregular	Fusão Completa
Hiperplasia das células Mucosas.	Hemorragia	Esteatose

Hipertrofia das células
Mucosas

Fibrose

Necrose

Presença de parasitas

Cada alteração foi avaliada através de uma pontuação de 0 a 6, dependendo do grau e da extensão da alteração: (0) ausente; (2) ocorrência leve; (4) ocorrência moderada; e (6) ocorrência grave (lesão difusa). Usando fatores de importância e valores de pontuação, o índice total pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$I = \sum_{org} \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{orgrpalt} \cdot w_{orgrpalt}),$$

onde: org = órgão (constante); rp = padrão de reação; alt = alteração; a = valor de pontuação; w = fator de importância. Este índice representa uma medida do estado geral de saúde com base nas lesões histológicas, calculado através da somatória dos índices de peixes individuais.

2.5.2 Análise histopatológica do fígado

Cortes semi-seriados de 5µm foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Nas lâminas coradas foi realizada a contagem de hepatócitos (mm²) em 5 campos aleatórios (aumento de 1000x) em cada corte. Para análise de alterações histopatológicas (tabela 4) foi realizado um método qualitativo e semiquantitativo, segundo o método proposto por Bernet *et al.* (1999).

Tabela 4. Patologias hepáticas de acordo com Bernet *et al.* (1999).

PATOLOGIAS		
Congestão Vascular	Hemorragia	Edema
Necrose	Apoptose	Núcleo Pleomórfico
Colestase	Esteatose	Hiperplasia
Inclusões Fibrilares	Hipertrofia Tecidual	Hipertrofia Celular
Infiltração Leucocitária	Centro de Melanomacrófagos	Tumor Benigno
	Tumor Maligno	

Cada alteração foi avaliada através de uma pontuação de 0 a 6, dependendo do grau e da extensão da alteração: (0) ausente; (2) ocorrência leve; (4) ocorrência moderada; e (6) ocorrência grave (lesão difusa). Além da extensão, é agregado um fator de importância (1 a 3) para cada patologia. Usando fatores de importância e valores de pontuação, o índice total pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$I = \sum_{org} \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{org rp alt} \cdot w_{org rp alt})$$

onde: org = órgão (constante); rp = padrão de reação; alt = alteração; a = valor de pontuação; w = fator de importância. Este índice representa uma medida do estado geral de saúde com base nas lesões histológicas, calculado através da somatória dos índices de peixes individuais.

2.6 Tratamento de dados

Os dados obtidos nas análises quantitativas e qualitativas foram planilhados em Excel 2020 e SigmaPlot 12.5. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, e valores de diferentes áreas foram comparados por ANOVA, sendo sua normalidade testada pelo teste Shapiro Wilk, para os dados considerados normais foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, já para os que se apresentaram não normais foi utilizado o teste de Maan-Whitney.

A significância das diferenças entre os tratamentos foi avaliada por meio da Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA “*main test*”) univariada e multivariada (Anderson, 2008), considerando as diferenças entre as áreas de estudo. As variáveis da matriz multivariada foram normalizadas para que tivessem igual importância na análise. Quando o teste principal apresentou resultado significativo ($p < 0,05$), foi aplicado teste a posteriori (“*pairwise multipli comparisons test*”) para identificar quais níveis diferiram entre si. A homogeneidade das variâncias foi analisada utilizando PERMDISP. Uma vez que o resultado da PERMANOVA é sensível à heterocedasticidade dos dados, em casos em que foi identificada, foi observado se as séries de dados, apesar da sua heterocedasticidade, possuíam locação suficientemente distintas para corroborar uma eventual diferença significativa apontada pela PERMANOVA.

Todos os testes foram realizados baseados em matrizes de semelhança de distâncias Euclidianas para os dados univariados e multivariados. Os resíduos foram permutados usando permutação irrestrita de dados brutos. Os valores de p Monte Carlo foram usados quando o número de permutação era menor que 50 (Anderson *et al.*, 2008). Para estas análises foi utilizado o software PRIMER 6.0.

Os resultados dos biomarcadores também foram integrados por meio do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) proposto por Liu *et al.*, (2013). Para

isso foram criados índices, a partir da normalização de cada valor de resposta de biomarcador individual, sendo realizado por subtração do valor médio geral e dividido por seu desvio padrão. Cada valor normalizado foi então adicionado ao valor mínimo obtido para cada biomarcador (score Z). Os índices foram calculados, cada pontuação média do biomarcador Z foi então multiplicada por uma ponderação (GST, GSH e GPX = 1, LPO = 2, DNA = 2 e índice histopatológico = 3), designado de acordo com a importância sistêmica de cada biomarcador. Os scores de resposta do biomarcador foram plotados como gráficos de radar. Para obter o índice integrado de resposta de biomarcador (IBR), a soma de todas as pontuações de resposta de biomarcador para cada tratamento foi dividida pela soma de todas as ponderações, fornecendo o grau final de efeito para cada tratamento.

3. RESULTADOS

3.1 Concentrações de metais no sedimento

Concentrações de 12 (doze) metais foram analisadas no sedimento das áreas escolhidas no presente estudo (tabela 5).

Tabela 5. Concentrações (mg/kg) de metais no sedimento coletados em JES, CAN e SSV, respectivamente.

Elemento	Áreas de estudo		
	JES	CAN	SSV
	Cal. Conc. (mg/kg)	Cal. Conc. (mg/kg)	Cal. Conc. (mg/kg)
As	4,78	1,96	3,88
Cd	0,19	0,04	0,20
Cr	12,68	2,98	12,32
Cu	4,29	103,46	7,19
Mn	76,48	55,86	89,93
Ni	5,12	10,87	4,11
Pb	6,73	78,01	5,31
Sc	1,95	0,37	1,21
Sr	22,93	7,87	245,89
Ti	92,75	59,22	134,66
V	15,34	3,94	9,61

Zn	21,90	187,12	38,98
----	-------	--------	-------

As concentrações de metais nos sedimentos foram comparadas com as Guias de Qualidade de sedimentos locais (CONAMA, 454) e internacionais (Environment Canadá). Em CAN, observou-se que três metais apresentaram concentrações maiores do que as já descritas, sendo eles: chumbo (Pb), cobre (Cu) e zinco (Zn). Comparando com nossa área referência (JES) tais metais apresentaram concentrações 1000%, 2000% e 750% maior em CAN, respectivamente. Já em SSV encontrou-se concentrações parecidas, merecendo destaque a elevada concentração de estrôncio (Sr) na região de SSV, sendo aproximadamente 980% maior do que em JES.

3.2 Parâmetros físico-químicos

Nos resultados da análise dos parâmetros físico-químicos houve uma semelhança na temperatura, pH e oxigênio dissolvido. Apenas a salinidade se mostrou diferente entre as três regiões analisadas, sendo nossa área referência com o menor valor (tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos do estuário do Rio Una-Juréia (JES), Cananéia (CAN) e Santos-São Vicente (SSV).

Fatores Físico-Químicos				
Região	Salinidade	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio Dissolvido (mg/L)
JES	15	22,7	7	6,2
CAN	25	23,0	6	7,3
SSV	30	23,4	6	6,0

3.3 Análises dos biomarcadores

3.3.1 Biomarcadores subcelulares

Ao analisar os biomarcadores bioquímicos de efeito das brânquias (figura 2) apenas a peroxidação lipídica apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) de CAN para JES, enquanto o dano em DNA não apresentou diferença ($p > 0,05$). Já em relação aos biomarcadores bioquímicos de exposição (figura 3) foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para ambas as áreas impactadas no GSH, e em GPX e GST quando comparado CAN e JES.

Para os biomarcadores bioquímicos de efeito do fígado (figura 2) novamente apenas a peroxidação lipídica apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) de CAN para JES. Em relação aos biomarcadores de exposição (figura 3) não foi observada diferença significativa em GPx e em GSH, apenas GST apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) de CAN para JES.

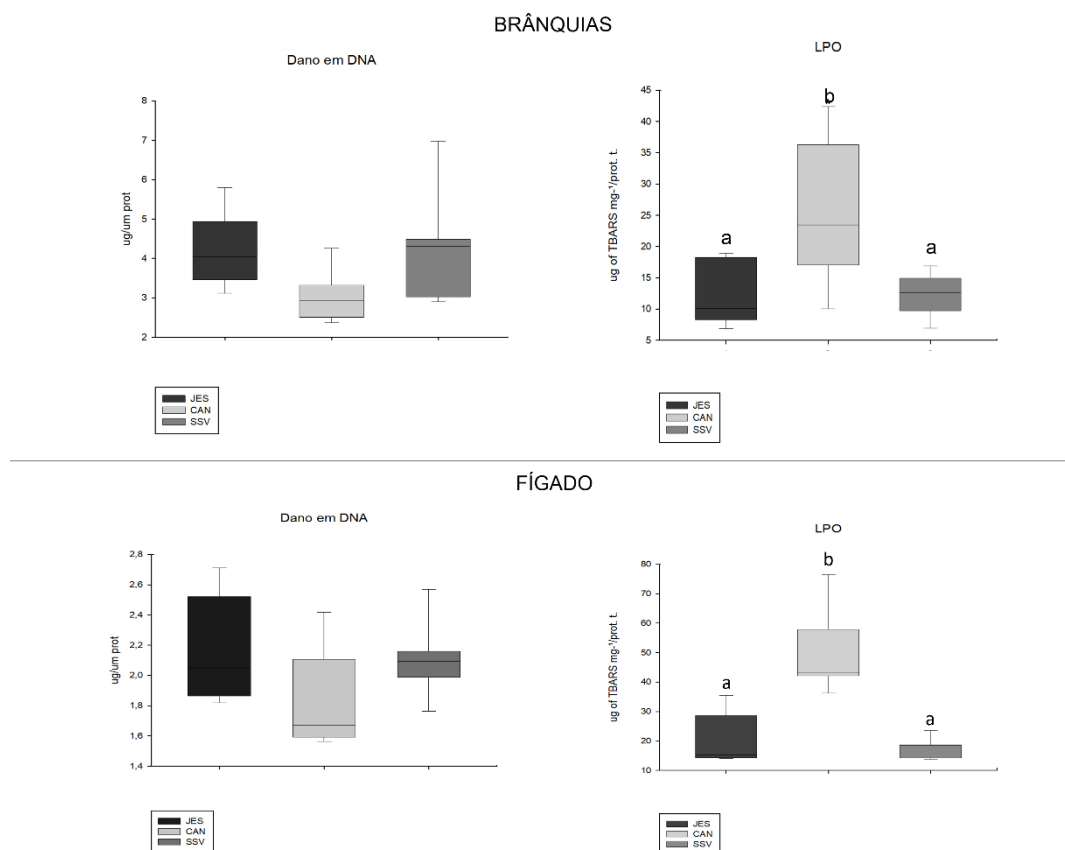


Figura 2. Representação gráfica dos valores médios e erro padrão (eixo y) de biomarcadores de efeito (danos em DNA e LPO) nas brânquias (superior) e no fígado (inferior) de *G. barbus* (n=10) coletados em JES, CAN e SSV (eixo x). *Significância ($p < 0,05$) entre as áreas representada por letras diferentes.

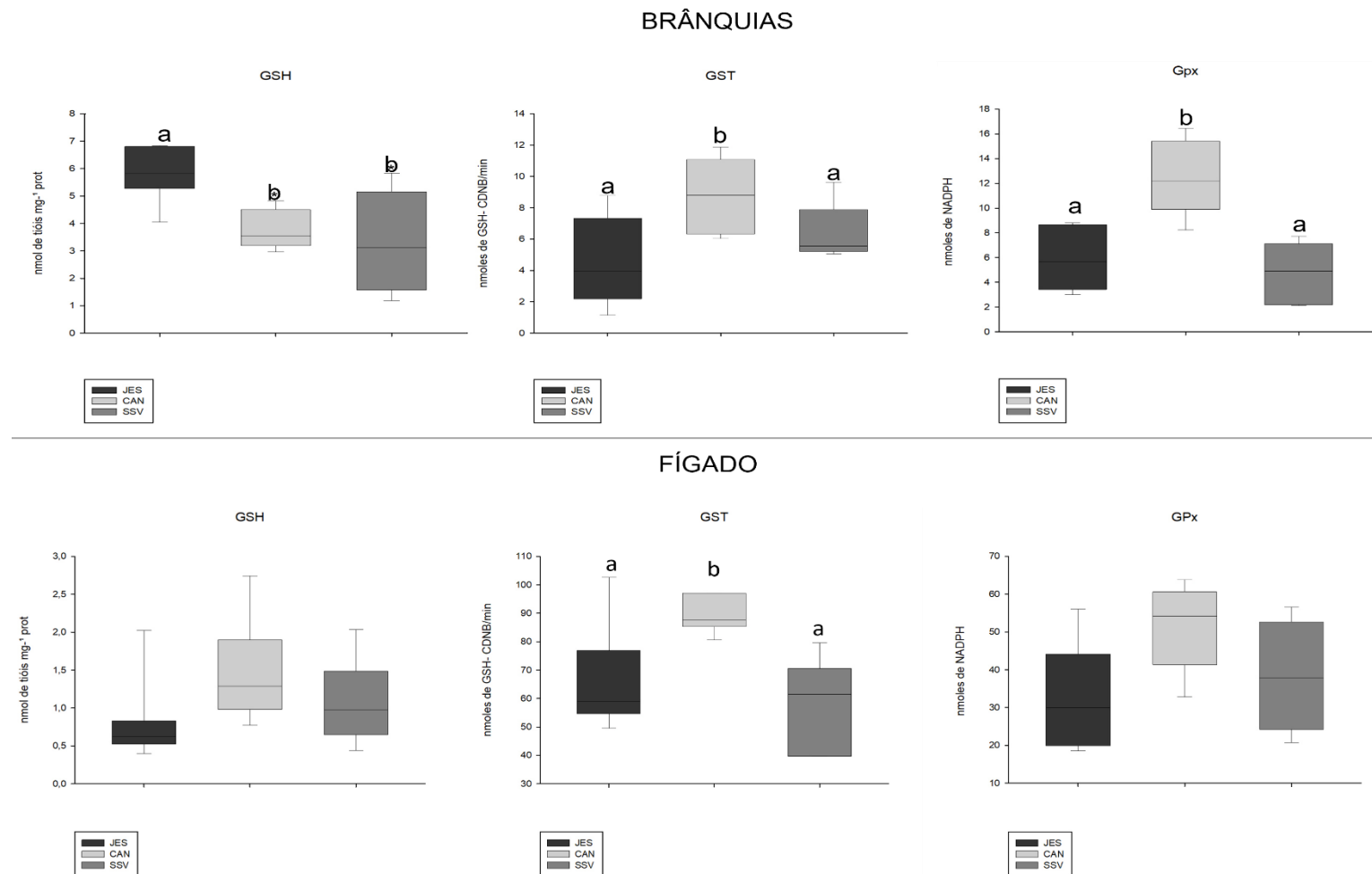


Figura 3. Representação gráfica dos valores médios e erro padrão (eixo y) de biomarcadores de exposição (GPx, GST e GSH) nas brânquias (superior) e no fígado (inferior) de *G. barbus* (n=10) coletados em JES, CAN e SSV (eixo x). *Significância ($p < 0,05$) entre as áreas representada por letras diferentes.

3.3.2 Biomarcadores celulares e teciduais

No que diz respeito a morfometria das brânquias, observou-se alterações significativas no comprimento da lamela (CL) e na espessura da base (EB) nos animais das áreas impactadas. Sendo o CL 20% maior em CAN e 30% menor em SSV, quando comparadas a área referência. A espessura da base (EB) nos animais de ambas as áreas impactadas apresentaram-se aumentadas, sendo de 50% maior em CAN e de 100% em SSV, quando comparadas com JES. Em relação a distância da lamela (DL) apenas SSV apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), apresentando uma distância 50% menor que a apresentada pela área referência. Não foi observada significância estatística na espessura da lamela (EL) (tabela 7).

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão das medidas morfométricas do comprimento da lamela (CL), espessura da base (EB), espessura da lamela (EL) e distância interlamelar (DL) das brânquias de *G. barbus* (n=10) coletados em JES, CAN e SSV, respectivamente. *Significância ($p < 0,05$) entre as áreas (linha) representada por letras diferentes.

REGIÕES			
MEDIDAS (μm)	JES	CAN	SSV
CL	1512,29 $\pm$ 327,437 ^a	1805,775 $\pm$ 434,857 ^b	1164,35 $\pm$ 382,862 ^b
EB	27,261 $\pm$ 11,441 ^a	42,489 $\pm$ 21,997 ^b	56,539 $\pm$ 33,183 ^b
EL	34,261 $\pm$ 18,575 ^a	40,821 $\pm$ 18,739 ^a	40,318 $\pm$ 9,312 ^a
DL	136,165 $\pm$ 69,862 ^a	129,661 $\pm$ 38,701 ^a	79,804 $\pm$ 26,800 ^b

Em relação a densidade de células mucossecretoras ambas as áreas impactadas apresentaram diferença significativa (figura 4), sendo observado em uma densidade 75% maior nos animais em CAN e 120% em SSV em relação aos animais da área referência.

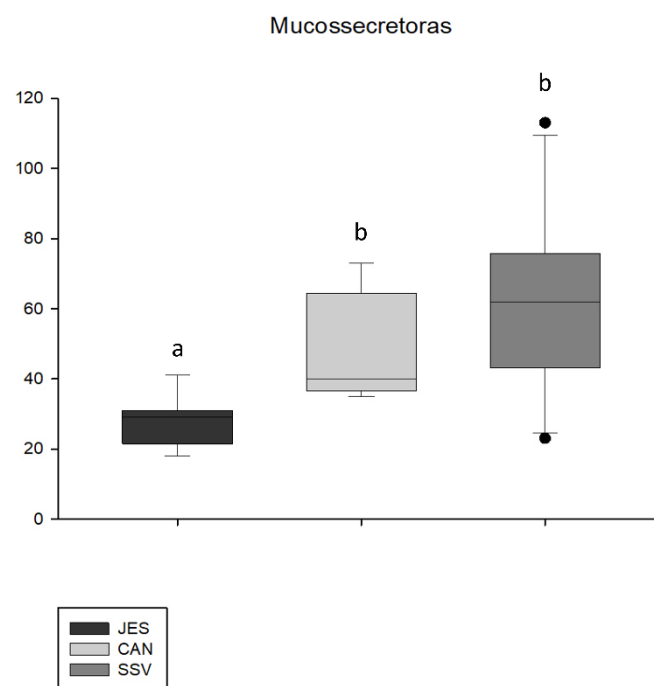


Figura 4. Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da contagem numérica de células mucossecretoras (eixo y) de *G. barbus* (n=10) coletados em JES, CAN e SSV (eixo x). Significância ($p < 0,05$) entre as áreas representada por letras diferentes.

Na análise histopatológica das brânquias os animais de JES foram classificados como “dano significativo a moderado”, CAN como “dano moderado a risco à saúde” e SSV como “danos irreparáveis” (figura 5).

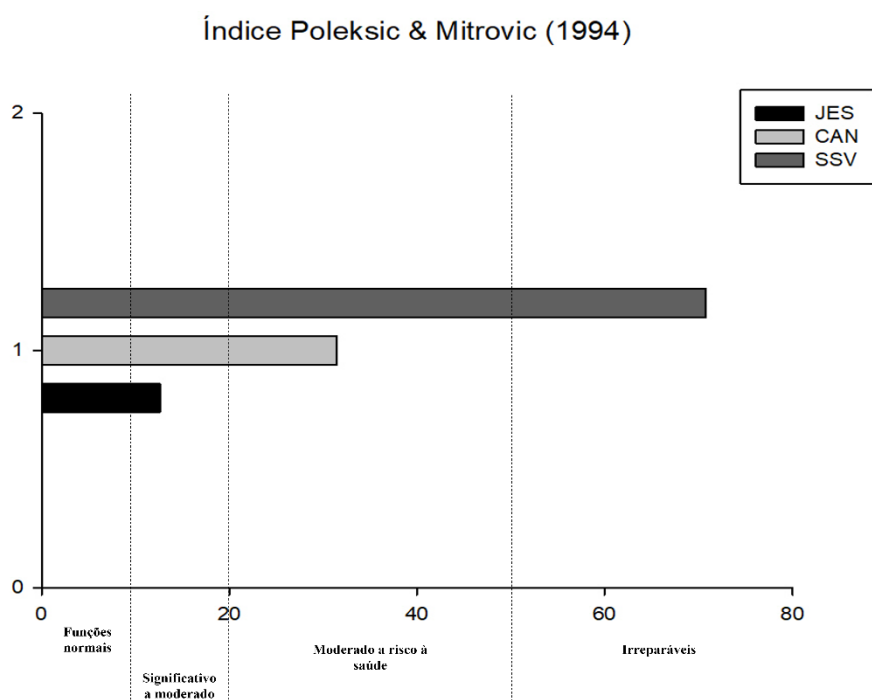


Figura 5. Índice histopatológico das brânquias, obtido pela análise adaptada de Poleksic & Mitrovic (1994), de *G. barbus* (n=20) coletados em JES, CAN e SSV, respectivamente.

Quando analisamos de acordo com Bernet *et al.* (1999), o índice geral apresenta uma diferença estatística apenas para SSV em relação a nossa área referência. Ainda que não significativo CAN apresentou um aumento de 160% no índice geral e SSV um aumento de 400% (figura 6).

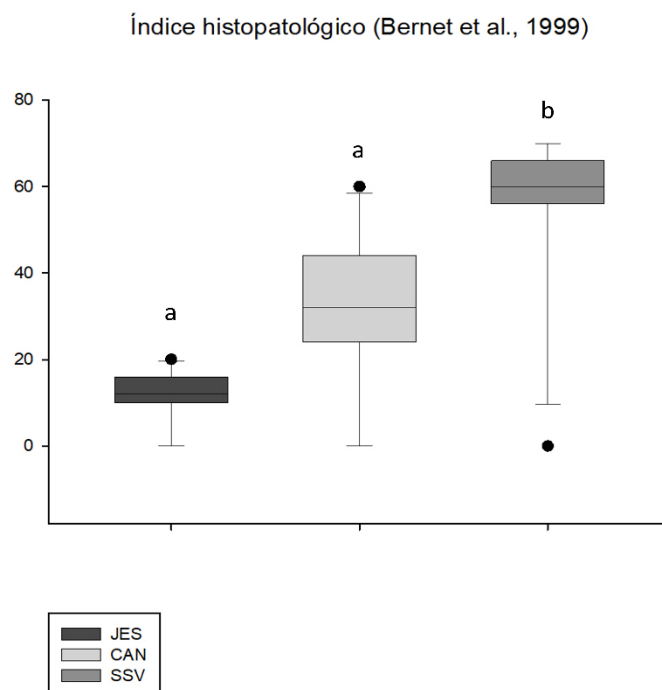


Figura 6. Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão do Índice histopatológico das brânquias (eixo y), adaptado de Bernet *et al.* (1999), de *G. barbus* (n=20) coletados em JES, CAN e SSV (eixo x). Significância ($p < 0,05$) entre as áreas representada por letras diferentes.

Dentro do índice de cada região, foram separados os scores para cada patologia (tabela 8), onde foram destacadas as três patologias mais presentes para posterior discussão.

Tabela 8. Score de obtido após análise histopatológica das brânquias de *G. barbus* (n=20) coletados em JES, CAN e SSV, de acordo com Bernet *et al.* (1999).

HISTOPATOLOGIAS	SCORE		
	JES	CAN	SSV
Hipertrofia do Epitélio	4	10	14

Levantamento do Epitélio	32	36	40
Infiltração	0	20	64
Ruptura do Epitélio	0	0	8
Hiperplasia Lamela Secundária	44	72	116
Hiperplasia Irregular	4	24	72
Fusão Lamelar	2	20	50
Fusão Lamela Primária	0	8	8
Fusão Severa Lamela Secundária	0	24	52
Encurtamento Lamela Secundária	28	36	38
Fusão Completa	0	44	76
Espessamento Incontrolável	8	12	10
Hipert. ou Hiperp. Cél. Mucos.	10	32	12
Ausência de Cél. Mucos.	0	4	24
Hemorragia	0	0	4
Ampliação de Vasos	2	8	26
Esteatose	0	0	4
Parasitas	0	0	4

As patologias mais presentes (figura 7) no Rio Una-Juréia (JES) foram hiperplasia da lamela secundária, levantamento do epitélio e encurtamento da lamela secundária. Em Cananéia (CAN) foram hiperplasia da lamela secundária, fusão completa, encurtamento da lamela secundária/levantamento do epitélio. Já na região de Santos-São Vicente (SSV) as patologias mais frequentes foram a hiperplasia da lamela secundária, fusão completa e hiperplasia irregular.

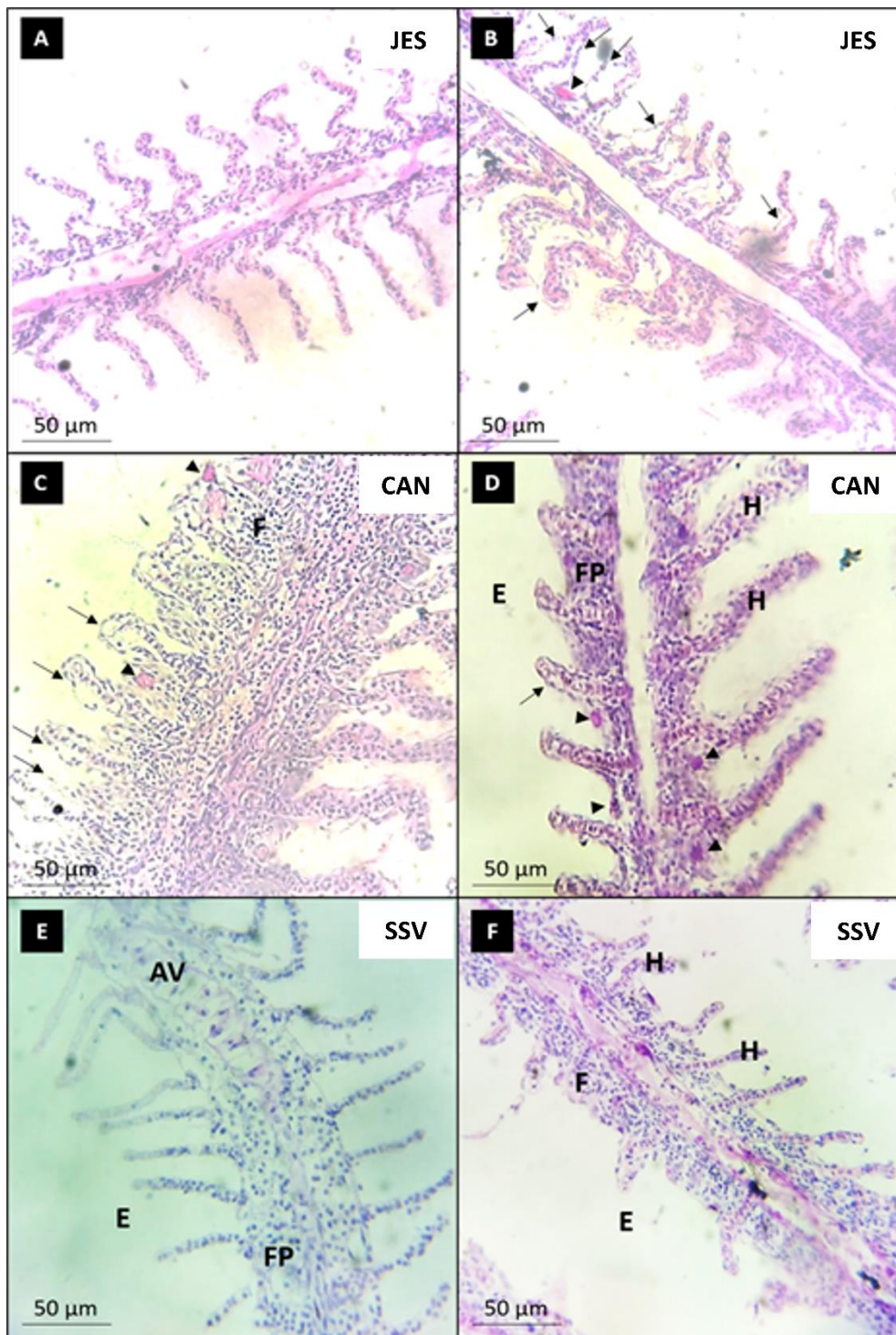


Figura 7. Fotomicrografia do tecido branquial de *G. barbus* (n=20) coletado em JES, CAN e SSV, respectivamente. Onde se observa: Cabeça de seta – células mucossecretoras; Seta – levantamento do epitélio; F – fusão completa; FP – fusão parcial; E – encurtamento das lamelas; H – hiperplasia da lamela secundária; AV – ampliação dos vasos sanguíneos.

No que diz respeito as análises histológicas do fígado, a contagem de hepatócitos apresentou uma diminuição de 30% nas áreas impactadas (CAN e SSV) em relação a área referência (JES) (Figura 8).

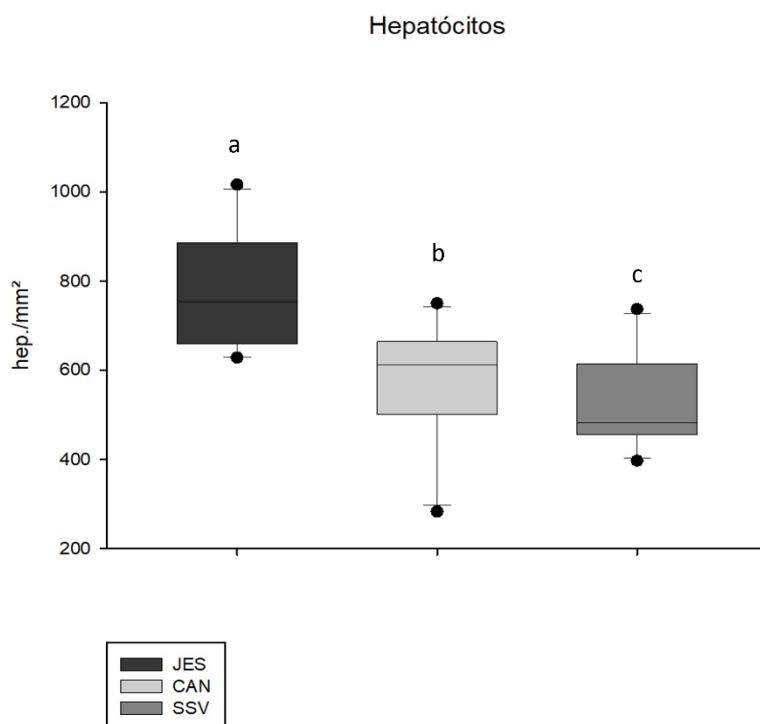


Figura 8. Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (eixo y) da contagem de hepatócitos (hep/mm²) de *G. barbatus* (n=10) coletados em JES, CAN e SSV (eixo x). *Significância (p<0,05) entre as áreas representada por letras diferentes.

O índice histopatológico geral apresentou diferença significativa apenas para SSV (Figura 9), sendo mais expressivo em 90% em relação a JES. Apesar de não significativo, CAN apresentou o índice 50% maior em relação a JES. Dentro do índice de cada região, foram separados os scores para cada patologia (tabela 9), onde foram selecionadas as quatro patologias mais presentes para posterior discussão.

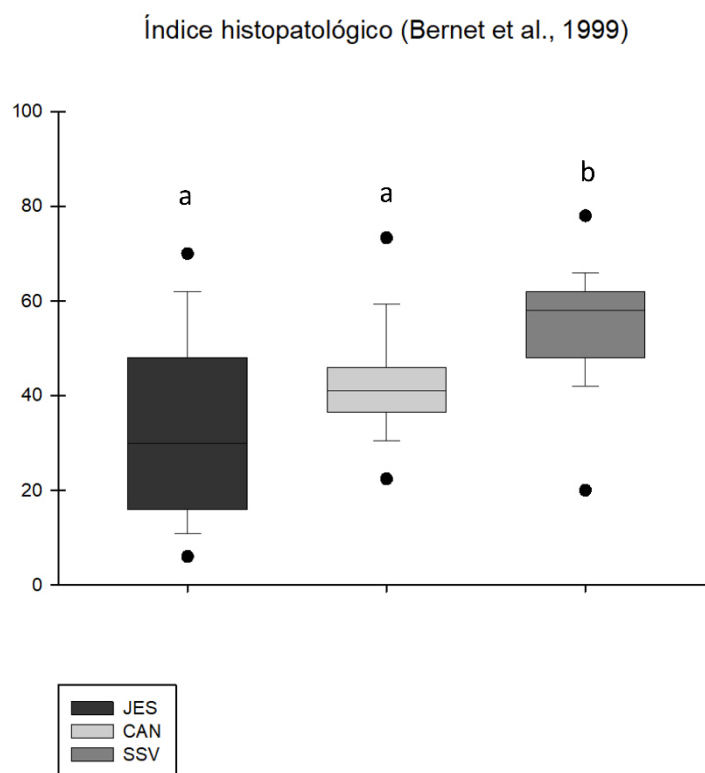


Figura 9. Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão do somatório (eixo y) referente ao Índice histopatológico do fígado, de acordo com Bernet *et al.* (1999), de *G. barbus* (n=20) coletados em JES, CAN e SSV (eixo x). Significância ($p < 0,05$) entre as áreas representada por letras diferentes.

Tabela 9. Score de patologias obtido após análise histopatológica do fígado de *G. barbus* (n=20) coletados em JES, CAN e SSV, de acordo com Bernet *et al.* (1999).

HISTOPATOLOGIAS	SCORE		
	JES	CAN	SSV
Congestão Vascular	0	2	58
Hemorragia	60	12	80
Edema	16	34	30
Necrose	102	156	228
Apoptose	0	0	0
Núcleo Pleomórfico	20	20	72
Colestase	24	64	88
Esteatose	12	76	0
Inclusões Fibrilares	112	100	96
Hipertrofia Tecidual	0	82	0

Hipertrofia Celular	6	16	8
Hiperplasia	0	8	0
Infiltração	108	224	204
CMM	58	26	58
Tumor benigno	40	28	16
Tumor maligno	0	0	102

As patologias mais presentes no Rio Una-Juréia (JES) foram inclusões fibrilares, infiltração leucocitária, necrose e hemorragia (Figura 10). Em Cananéia (CAN) foram infiltração leucocitária, necrose, inclusões fibrilares e hipertrofia tecidual (Figura 10). Já na região de Santos-São Vicente (SSV) as patologias mais frequentes foram necrose, infiltração, tumor maligno e inclusões fibrilares (Figura 10).

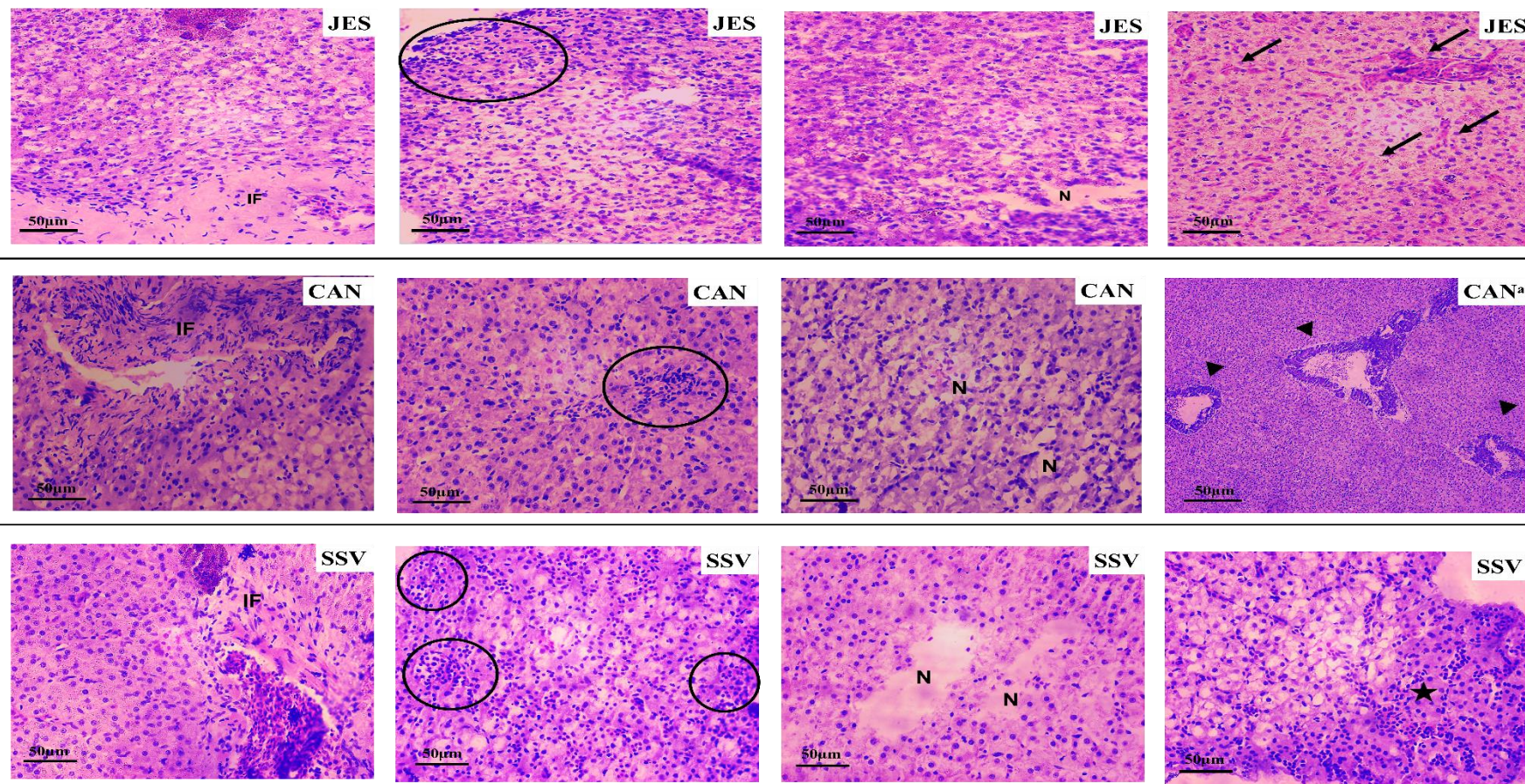


Figura 10. Fotomicrografia mostrando o parênquima hepático de *G. barbus* (n=20) coletados em JES, CAN e SSV. Onde se observa: IF – Inclusões fibrilares; Círculo – Pontos de infiltração leucocitária; N – Necrose; Seta – Pontos de hemorragia; Cabeça da seta – Hipertrofia tecidual; Estrela – Tumor. Observações: a imagem definida com “CAN^a” foi utilizado um aumento de 100x.

3.3.3 Biomarcadores individuais

Em relação aos índices biométricos (figura 11), não foi observada nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) no índice de condição (K). Já em relação ao índice hepatossômico, diferença significativa, em ambas as áreas impactadas em comparação a área referência, foi observada.

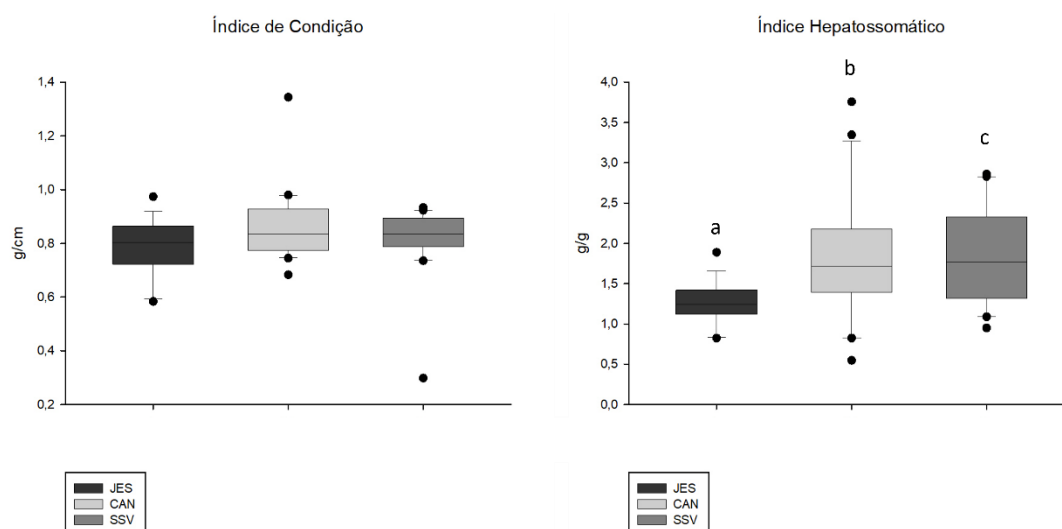


Figura 11. Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão (eixo y) do índice de condição (K) e índice hepatossômico (IHS) de *G. barbatus* coletados em JES, CAN e SSV (eixo x). Significância ($p < 0,05$) entre as áreas representada por letras diferentes.

3.4 Integração dos biomarcadores

Para de fato compreender se os pontos de coleta eram distintos entre si também foi realizada uma Permanova multifatorial para cada órgão, esta análise contemplou os resultados dos biomarcadores bioquímicos e os resultados do índice histopatológico. Os resultados demonstraram que os 3 pontos são diferentes entre si utilizando os dados das brânquias e que as variâncias destes dados são homogêneas (tabela 10).

Tabela 10. Permanova multifatorial com os resultados dos biomarcadores bioquímicos e índice histopatológico das brânquias de *G. barbatus* coletados em JES, CAN e SSV.

Grupos	t	P(Perm)	Perms	P (MC)
JES, CAN	3,0003	0,001	770	0,001
JES, SSV	3,2132	0,002	748	0,001
CAN, SSV	2,7938	0,001	768	0,001

Foi então realizado um SIMPER para compreender quais são as principais diferenças entre os pontos amostrais e observou-se que as variáveis que mais contribuem para que JES seja diferente de CAN e SSV são a GST, GSH e o índice histopatológico. JES e CAN ainda se diferenciam nos resultados de LPO, enquanto JES e SSV nos resultados de dano em DNA. CAN e SSV se distanciam nos resultados de GPX, GST, LPO, DNA e no índice histopatológico.

Analisando o conjunto de biomarcadores das brânquias (tabela 11) através do índice integrado de respostas dos biomarcadores (EIBR), CAN apresenta o maior EIBR sendo considerada como o pior ponto, seguido de SSV e por último JES.

Tabela 11. Score do índice de biomarcadores (EIBR) nas brânquias de *Genidens barbatus* coletados em JES, CAN e SSV.

JES	1,022824
CAN	1,426362
SSV	1,318367

Na análise das respostas dos biomarcadores através do EIBR (figura 12) é possível observar que em CAN há uma indução das enzimas antioxidantes (GPX e GST) e uma inibição da GSH causando um aumento na peroxidação lipídica. Enquanto SSV apresentou resultados das enzimas antioxidantes e da peroxidação lipídica muito similares a referência JES, porém com um maior dano em DNA e um considerável aumento no índice histopatológico.

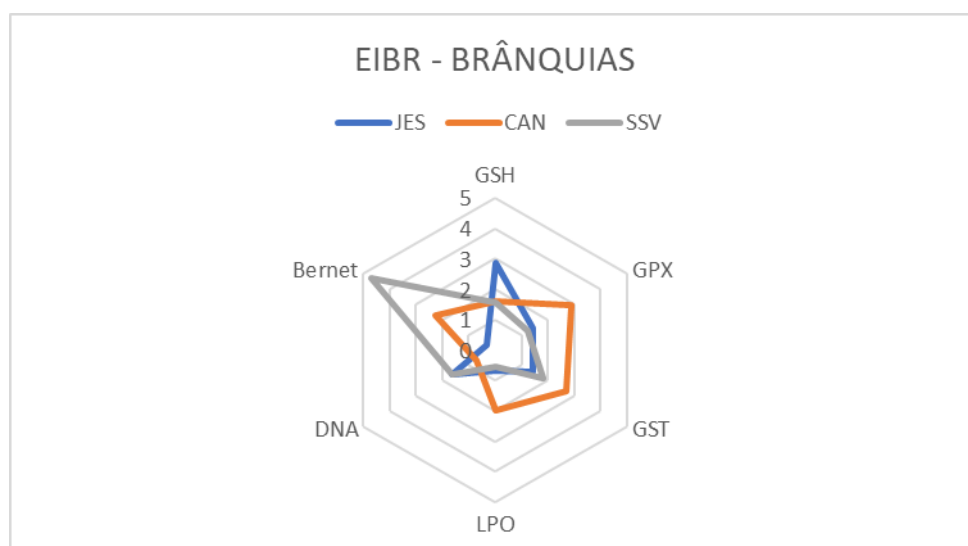


Figura 12. Representação gráfica do Índice de biomarcadores nas brânquias de *Genidens barbatus* coletados em JES, CAN e SSV, respectivamente.

Na análise de componentes principais (PCA) foi observada uma associação entre as respostas histopatológicas e bioquímicas. O fator 1 da PCA (tabela 12) que responde por cerca de 68% das associações relacionou as alterações histopatológicas nas brânquias (hipertrofia do epitélio, ruptura do epitélio, hiperplasia L.2ª, hiperplasia irregular, fusão lamelar, fusão severa L.2ª, fusão completa, ausência de mucossecretoras, hemorragia, ampliação de vasos, esteatose, parasitas, necrose) com as respostas antioxidantes (inibição da GSH e indução da GPX) sendo estas respostas mais frequentes em SSV.

O segundo fator da PCA (tabela 12) que responde por cerca de 32% das associações relacionou as alterações histopatológicas (levantamento, fusão L.1ª, encurtamento L. 2ª, espessamento incontrolável, hipertrofia ou hiperplasia das células mucossecretoras) com uma indução da atividade antioxidante (GST) e aumento da peroxidação lipídica (LPO). Os maiores scores deste fator foram observados em CAN.

Tabela 12. PCA dos biomarcadores das brânquias de *Genidens barbatus* coletados em JES, CAN e SSV, onde apenas variáveis maiores ou iguais ao corte 0,7 (em negrito) foram considerados componentes dos fatores.

%	Factor 1	Factor 2
	67,636	32,364
Hipertrofia do Epitélio	0,856	0,517
Levantamento	0,665	0,746
Infiltração	0,990	0,144
Ruptura Epitélio	0,979	-0,203
Hiperplasia L.2ª	0,962	0,274
Hiperplasia irregular	0,992	0,123
Fusão lamelar	0,975	0,223
Fusão L. 1ª	0,602	0,799
Fusão severa L.2ª	0,945	0,326
Encurtamento L.2ª	0,490	0,872
Fusão completa	0,886	0,463
Espessamento incontrolável	-0,059	0,998
Hipert. Ou Hiperp. Células mucos.	-0,224	0,975
Ausência de mucossecretoras	1,000	-0,031
Hemorragia	0,979	-0,203
Ampliação de vasos	0,998	0,067
Esteatose	0,979	-0,203
Parasitas	0,979	-0,203
Necrose	0,979	-0,203
GSH	-0,777	-0,629
GPX	0,948	-0,319
GST	0,099	0,995

LPO	-0,330	0,944
DNA	0,298	-0,955

Já com os resultados dos biomarcadores bioquímicos e o índice histopatológico do fígado, a permanova multifatorial (tabela 13) demonstrou que apenas CAN se mostra diferente significativamente ($p < 0.001$) das outras regiões, sendo que as variâncias destes resultados foram consideradas homogêneas.

Tabela 13. Permanova multifatorial de biomarcadores bioquímicos (GST, GSH, GPx, LPO e danos em DNA) e morfológicos (índice histopatológico) no fígado de *Genidens barbatus* coletados em JES, CAN e SSV, respectivamente.

Regiões	t	P (perm)	perms	P (MC)
JES – CAN	2,6466	0,002	759	0,001
JES – SSV	1,0496	0,33	752	0,352
CAN - SSV	2,6403	0,001	763	0,001

Pelo fato de SSV apresentar similaridade com JES, foi realizado o SIMPER (tabela 13) na intenção de aprofundar e entender se algumas variáveis poderiam diferenciar das demais. Os resultados mostram que a histopatologia é a variável que mais contribui para a dissimilaridade entre JES e SSV, sendo que em SSV os resultados do índice histopatológico são bem maiores.

Tabela 13. SIMPER realizado com resultados de biomarcadores bioquímicos (GST, GSH, GPx, LPO e danos em DNA) e morfológicos (índice histopatológico) no fígado de *Genidens barbatus* coletados em JES e SSV.

Variável	Av. Value	Av. Value	Av. Sq. Value	Sq. Dist/SD	Contrib%	Cum.%
HISTOPATO	-0,25	0,313	2,28	0,95	26,52	26,52
GST	-0,229	-0,661	1,67	0,63	19,50	46,02
GPX	-0,585	-0,222	1,49	0,76	17,33	63,34
GSH	-0,726	7,99E-2	1,45	0,74	16,91	80,25
DNA	0,389	0,253	1,43	0,78	16,66	96,92

Com o conjunto de biomarcadores também foi realizada a integração das respostas dos biomarcadores através do EIBR (figura 13). Os resultados do índice demonstram que os animais coletados em CAN apresentaram uma indução das enzimas

antioxidantes seguidas por um aumento da peroxidação lipídica. Em SSV os indivíduos apresentaram respostas bioquímicas muito similares aos animais coletados em JES, porém cabe ressaltar que existe um grande aumento no índice histopatológico dos animais em SSV.

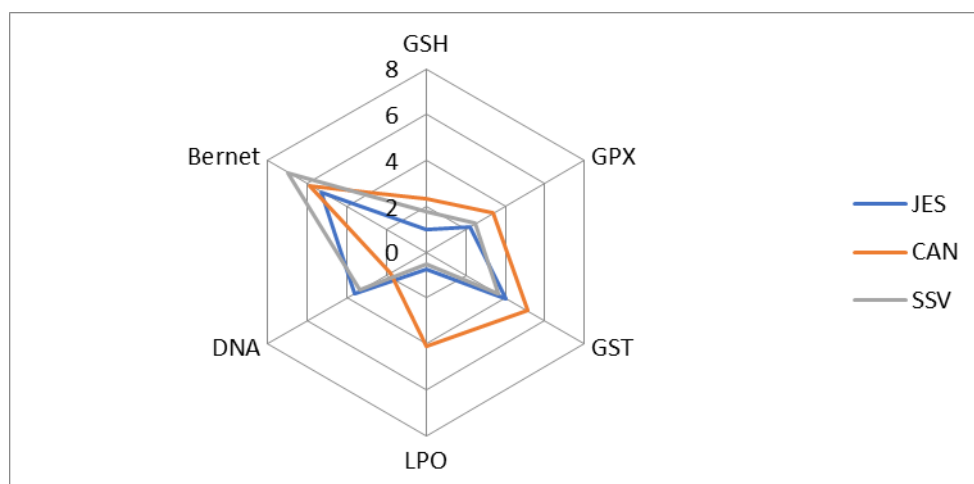


Figura 13. Índice de biomarcadores no fígado de *Genidens barbatus* coletados em JES, CAN e SSV, respectivamente.

Os resultados do EIBR (tabela 14), provavelmente refletindo os resultados da bioquímica demonstram que para os biomarcadores medidos, os indivíduos de CAN possuem a pior condição de saúde, seguidos de SSV e por último de JES.

Tabela 14. Score do índice de biomarcadores no fígado de *Genidens barbatus* coletados em JES, CAN e SSV.

	EIBR
JES	1,686472
CAN	2,256358
SSV	1,868899

Em seguida, para entender quais variáveis se relacionam foi realizada uma PCA integrando as médias dos biomarcadores bioquímicos e as alterações histopatológicas (tabela 15).

Tabela 15. PCA realizada com biomarcadores bioquímicos (GST, GSH, GPx, LPO e danos em DNA) e morfológicos (índice histopatológico) do fígado de *Genidens barbatus* coletados em JES, CAN e SSV, onde apenas variáveis maiores ou iguais ao corte 0,7 (em negrito) foram considerados componentes dos fatores.

%	Factor 1	Factor 2
---	-----------------	-----------------

	60.32	39.68
Congestão Vascular	-0,451	0,893
Hemorragia	-0,950	0,311
Edema	0,691	0,723
Necrose	-0,056	0,998
Núcleo Pleomórfico	-0,477	0,879
Colestase	0,168	0,986
Esteatose	0,985	-0,172
Inclusões Fibrilares	-0,302	-0,953
Hipertrofia tecidual	1,000	-0,026
Hipertrofia celular	0,987	0,164
Hiperplasia	1,000	-0,026
Infiltração	0,653	0,757
CMM	-1,000	0,026
Tumor benigno	-0,026	-1,000
Tumor maligno	-0,477	0,879
GSH	0,826	0,563
GPX	0,974	0,226
GST	0,956	-0,295
LPO	0,994	-0,109
DNA	-0,995	-0,096

O Fator 1 da PCA, que responde por cerca de 62% das associações demonstrou uma relação entre as alterações histopatológicas (edema, esteatose, hipertrofia tecidual, hipertrofia celular, hiperplasia) e bioquímicas (GSH, GPX, GST e LPO) conforme apresentado na tabela 7, estas relações foram mais fortes em CAN.

O Fator 2 que responde por cerca de 40% das associações demonstrou apenas relações entre as alterações histopatológicas (congestão vascular, infiltração, edema, núcleo pleomórfico, colestase, necrose e tumor maligno) (tabela 7), sendo estas relações particularmente verdadeiras em SSV.

4. DISCUSSÃO e CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que as três áreas estudadas não são diferentes apenas nas políticas de preservação ambiental e interferências antrópicas, mas também na qualidade ambiental. Diferentes achados foram observados nestes ambientes e serão discutidos abaixo.

Dentre os parâmetros físico-químicos as regiões de estudo apresentaram características em comum. As três áreas são consideradas salobras, apresentando salinidade de 0.5ppm a 30ppm (Johnson, 1973). Em JES vemos a menor salinidade, isso

se deve a localização do ponto de coleta tendo uma maior influência do ciclo de marés (Pecoraro *et al.*, 2019). Em relação ao pH e OD, em todas as áreas analisadas se vê o cumprimento das normas ditadas pelas leis ambientais brasileiras (CONAMA 357).

Em relação a análise de metais no sedimento, em JES as concentrações encontradas estão nos parâmetros já descritos em legislação brasileira e canadense. Diferentemente, em CAN há concentrações elevadas de cobre (Cu), chumbo (Pb) e zinco (Zn). Elementos como esses podem se relacionar com diferentes atividades antrópicas como efluentes de resíduos de mineração, esgotos domésticos, entre outras (Lima *et al.*, 2001). Dessa forma, atividades mineradoras um dia realizadas em Cananéia, assim como os efluentes domésticos justificam as elevadas concentrações encontradas neste local. Artigos pretéritos já apresentavam altos níveis de metais (Pb, Zn, Cu, Cr, As), no sedimento e em suspensão na coluna d'água, assim como outros contaminantes (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal) nesta área (Tramonte *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2019; Salgado *et al.*, 2019; Perina & Abessa, 2020).

A região de SSV, diferente de CAN, também apresentou concentrações dentro da legislação canadense e brasileira, apesar de ser considerada uma região com altas taxas de contaminação. Isto demonstra que estes metais dosados nos sedimentos não necessariamente seriam um problema ambiental, porém existe vasta literatura demonstrando que a área é impactada por outros contaminantes como fertilizantes fosfatados, resíduos sólidos, PAHs, biocidas, fármacos e entre outros (Braga *et al.*, 2019; Pusceddu *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020; Abreu *et al.*, 2020; Gimiliani *et al.*, 2020). O elemento estrôncio (Sr) se destacou com a maior elevação de concentração, onde apesar de fazer parte de processos biológicos, em alta quantidade pode trazer problemas a músculos, ossos e carapaças de animais marinhos (Figueira & Cunha, 1998). Elementos como o estrôncio e o cézio são altamente utilizados em atividades industriais e portuárias, devido às suas características nucleares (Figueira & Cunha, 1998), o que explica sua alta concentração em SSV, região caracterizada pela presença do complexo industrial de Cubatão e o maior porto da América Latina. Ainda que não tenham sido observadas concentrações relevantes dos metais dosados nos sedimentos desta área artigos pretéritos apontam contaminação por outros contaminantes na área como: fertilizantes fosfatados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, antiincrustantes

biocidas e pellets de plástico (Santos *et al.*, 2020; Abreu *et al.*, 2020; Gimiliani *et al.*, 2020).

A presença destes contaminantes no ambiente faz com que os organismos entre em contato com tais xenobióticos. As brânquias, por exemplo, por se tratar de um órgão responsável pela respiração são a primeira barreira a estes xenobióticos ou patógenos naturais existentes no ambiente. Assim, este tecido tem um grande papel em processos pró-oxidantes e antioxidantes (Trabelsi *et al.*, 2020), sendo o sistema antioxidante formado por formas enzimáticas (GPx e GST) e as não enzimáticas (GSH) (Huber *et al.*, 2008). Enquanto os animais coletados em SSV apresentaram respostas antioxidantes bastante similares com a área de referência JES, os indivíduos de CAN demonstraram justamente o contrário. Nesta região se vê uma indução de GST, da GPx e inibição da GSH, o que justifica o aumento de peroxidação lipídica. Tendo CAN apresentado uma alta concentração de Cu, Pb e Zn, pode-se dizer que os metais em questão ao estimularem a produção de espécies reativas de oxigênio, fazem com que este sistema seja ativado ou até mesmo inibido. As diferenças significativas nas respostas do sistema antioxidante em CAN podem ser explicadas pela contaminação encontrada no local, já que é pré-estabelecida a relação entre a contaminação por metais e a ocorrência de estresse oxidativo (Gusso-Choueri *et al.*, 2015). Os metais podem causar estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), assim como peróxido de hidrogênio que juntos oxidam proteínas, lipídeos, trazendo um dano a estrutura celular (Cao *et al.*, 2010). Organismos desenvolveram mecanismos de defesa para remover EROs antes que causem danos na célula, dentre esses mecanismos de defesa têm-se as enzimas antioxidantes e moléculas eliminadoras de radicais livres (Atli & Canli, 2010).

Ainda em relação ao estresse oxidativo nos indivíduos coletados em SSV, foi possível observar altos valores de dano em DNA nas brânquias destes animais. A região de Santos-São Vicente apresenta em sua maioria contaminantes orgânicos como PAHs (Santos *et al.*, 2020), biocidas (Abreu *et al.*, 2020), PCBs (Bícego *et al.*, 2006), compostos farmacêuticos e drogas (Pusceddu *et al.*, 2019), onde sua toxicidade se relaciona com ligações e alterações na conformação de sítios ativos e estruturas quaternárias. A interação de um xenobiótico com o DNA pode danificar os cromossomos, causar quebras em suas fitas, interferir nos mecanismos envolvidos na reparação de danos e entre outros efeitos genotóxicos (Klingelfus *et al.*, 2015). A alta

presença de contaminantes orgânicos e sua toxicidade explicam os altos valores de dano em DNA nos organismos de SSV.

Apesar das brânquias servirem como primeira barreira, apresentando uma alta resposta subcelular, outros órgãos podem entrar em contato com os próprios xenobióticos e/ou seus metabólitos ativando ou inibindo o sistema antioxidante. No presente estudo os biomarcadores bioquímicos dosados no fígado apresentaram alterações relevantes apenas nos indivíduos coletados em CAN. Na intenção de proteger o tecido da peroxidação e de possíveis radicais livres, o organismo apresentou um aumento significativo de GST na região de CAN, o que podemos relacionar a uma resposta direta a alta taxa de LPO também encontrado nesta região. Apesar de não se encontrar diferenças significativas nas respostas de GPx e GSH, ambos fatores foram aumentados em relação a região referência, também se relacionando a um aumento da resposta antioxidante. Assim como nas brânquias, acredita-se que as respostas encontradas do sistema antioxidante tenham relação com a concentração de metais entrados na região, já que a relação do estresse oxidativo e a presença de metais já foi levantada em estudos anteriores (Gabriel *et al.*, 2020; Ibrahim *et al.*, 2021; Pastorino *et al.*, 2021).

Seguindo os níveis biológicos, a presença de xenobióticos também pode refletir em respostas celulares e teciduais. O tecido branquial, por exemplo, possui a característica de primeira barreira de defesa do organismo, assim a presença de diferentes estressores e em diferentes quantidades podem exigir do tecido mais de uma via de resposta, como as respostas histológicas. Na análise feita de acordo com Bernet *et al.* (1999) é possível observar um aumento gradual do índice histopatológico conforme vamos da área referência para as regiões impactadas. A região JES apresenta um índice relativamente baixo quando comparada as outras áreas, sendo suas patologias classificadas como de importância mínima ou moderada (Bernet *et al.*, 1999). A presença destas patologias mesmo que em menor quantidade corroboram com os resultados da classificação de acordo com Poleksic & Mitrovic (1994) e sugerem que flutuações nos níveis de salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido podem gerar estresse sobre os animais, modificando seu estado homeostático (Baldissertoro, 2009).

Seguindo um gradiente para a área de baixa a moderada contaminação, a região de CAN apresentou índice histopatológico (Bernet *et al.*, 1999) 160% maior que JES, onde cerca de 50% das patologias mais frequentes nessa região são consideradas

moderadas. Patologias frequentes nessa região como a hiperplasia da lamela estão diretamente relacionadas as alterações morfométricas vistas no presente trabalho, onde com o aumento no número de células da lamela observou-se aumento da espessura da base assim como uma diminuição da distância interlamelar. Além disso, alterações nas lamelas como a hipertrofia e a hiperplasia do epitélio podem evoluir para uma fusão lamelar parcial ou completa consequentemente levando a um bloqueio no “caminho” percorrido pela água dificultando as trocas gasosas (Camargo & Martinez, 2007; Omrinde *et al.*, 2017).

Estudos anteriores já relacionavam as patologias em questão à presença de metais no ambiente. Fusão lamelar, levantamento do epitélio e hiperplasia foram observadas em *Cyprinus carpio* exposto a metais pesados (Vinoghini & Narayanan, 2009). Alterações no epitélio lamelar também foi relatada em tecidos brânquias de *Cyprinus carpio* e *Carasobarbus luteus* coletados no Rio Tigre (Mustafa *et al.*, 2020). Peixes (*Prochilodus lineatus*) expostos a metais durante 7 dias também apresentaram levantamento epitelial, hiperplasia e fusão lamelar (Marina & Martinez, 2007).

Em um estudo sobre o estado de saúde dos peixes (*Cirrhina mitigala*) em reposta a sedimentos contaminados por metais, foi relatado que quanto maior o tempo de exposição maior era a frequência de histopatologias encontradas (Jabeen *et al.*, 2018), patologias estas equivalentes às encontradas no presente estudo. As patologias encontradas e sua relação com a presença de metais no ambiente corroboram com o estado de saúde encontrado nos animais coletados em CAN. Classificados como de “dano moderado a risco à saúde” de acordo com o índice de Poleksic & Mitrovic (1994), os animais mesmo presentes em uma área de baixa a moderada contaminação, apresentam patologias que podem evoluir para patologias irreversíveis acarretando numa falha da função do órgão.

Na região SSV também vimos uma continuação do gradiente de contaminação, sendo o índice histopatológico (Bernet *et al.*, 1999) da região 400% maior que a área usada como referência se mostrando significativamente diferente. Novamente como patologias frequentes estão aquelas ligadas diretamente com a morfometria do órgão. Patologias como hiperplasia da lamela secundária, fusão completa e hiperplasia irregular justificam a diminuição da distância entre as lamelas assim como um aumento da espessura da base.

Das patologias frequentes de SSV, 100% delas são consideradas moderadas onde há o risco ao animal. Assim como em CAN, as patologias encontradas nessa região podem estar relacionadas a contaminação do local analisado. Estudos anteriores usando peixes como bioindicadores mostraram uma relação existente entre os aneurismas lamelares quando expostos a metais e pesticidas (Dane & Sisman, 2015; Subbujar *et al.*, 2018; Nimet *et al.*, 2020). Fusão lamelar e aneurismas foram vistos em *Menticrhrus americanos* e *Micropogonias furnieri* coletados na Baía de Sepetiba (Rio de Janeiro) contaminada por efluentes industriais (Carvalho *et al.*, 2020). A fusão e hiperplasia lamelar também foram vistas em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a antibióticos (Rodrigues *et al.*, 2017).

Estudos com outras espécies de bagres (*Clarias gariepinus* e *Genidens genidens*) em ambientes contaminados por hidrocarbonetos policíclicos corroboraram com os resultados encontrados em nosso trabalho (Obanya *et al.*, 2019; Freire *et al.*, 2020). Sendo Santos-São Vicente uma área com uma diversidade de contaminantes vemos que as patologias encontradas podem ser respostas de vários deles, explicando inclusive o alto índice histopatológico corroborando com a classificação como “danos irreparáveis” de acordo com Poleksic & Mitrovic (1994).

De modo geral as alterações encontradas nas três regiões são consideradas um mecanismo de defesa e/ou de adaptação em peixes dificultando o contato dos contaminantes com os organismos (Pal *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2017). A hiperplasia e a fusão lamelar diminuem a área de troca gasosa, atuando assim como uma tentativa de barreira à entrada de poluentes. Aumentando a área, as substâncias contidas na água têm que percorrer um caminho maior até a corrente sanguínea (Pereira *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2017).

Outra forma de defesa realizada pelo tecido branquial são as células mucosas. O muco secretado por essas células, além de ser importante para a regulação iônica, também serve como um mecanismo de defesa para o epitélio prevenindo a entrada de elementos tóxicos (Varadarajan *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2017). Em ambas as áreas impactadas houve um aumento na densidade de células mucosas, o que indica também um mecanismo contra as substâncias tóxicas contidas na água (David & Fontanetti, 2009; Nimet *et al.*, 2019). Mesmo se tratando de uma alteração caracterizada como mecanismo de defesa um grande aumento na quantidade de muco produzido nas brânquias pode dificultar suas trocas gasosas, atrapalhando assim a função do órgão.

Da mesma forma que as brânquias apresentam diferentes vias de defesa a presença de xenobióticos, nos peixes encontra-se um órgão que desempenha funções como detoxificação e biotransformação, o fígado. Por possuir tais funções, o fígado se tornou um parâmetro do estado de saúde dos peixes (Rodrigues *et al.*, 2017). Consequentemente, vários estudos relatam alterações hepáticas em diferentes ambientes e na presença de diferentes contaminantes.

Os animais que foram coletados na região de Rio Una-Juréia (JES) apresentaram algumas patologias relacionadas ao processo inflamatório, desde a infiltração de células migratórias revelando uma resposta imune do organismo, como a hemorragia representando um possível congestionamento dos vasos sanguíneos (Javed *et al.*, 2016). Apesar das patologias encontradas serem consideradas tardias, são classificadas (em sua maioria) como moderadas, ou seja, podem ser revertidas caso cesse o estressor. Devido ao índice histopatológico baixo e a classificação das patologias considera-se que os animais da região estão saudáveis, mas ainda sob alerta já que mesmo em uma região com alto grau de proteção se vê a presença de um estressor. Esse estresse em questão, pode ser ambiental, tendo vista que animais estuarinos estão constantemente lutando com drásticas variações ambientais.

CAN é considerada segundo os estudos de avaliação de qualidade de sedimentos, como uma área moderadamente contaminada (Choueri *et al.*, 2018), os resultados do índice histopatológico não apresentaram diferença significativa, mas apresentou um aumento de 50% em comparação a área referência (JES). Dentro de suas patologias frequentes três se repetem de JES, sendo elas infiltração leucocitária, necrose e inclusões fibrilares. Diferente surge a hipertrofia tecidual como quarta patologia mais frequente, onde em todo tecido hepático se vê um predomínio de vasos sanguíneos. Esta patologia surge na tentativa de aumentar e acelerar as respostas inflamatórias, assim como aumentar a vascularização do órgão relacionando-se diretamente como um mecanismo de defesa a xenobióticos (Bernet *et al.*, 1999).

Diversos estudos relacionam alterações hepáticas em exposições a metais no sedimento e da água. Hemorragia e necrose foram vistas em carpas (*Catla catla*) expostas a concentrações de cobre (1,25 mg/kg) e cádmio (4,5 mg/kg), concentrações essas menores do que as encontradas em CAN (Naz *et al.*, 2020). Necrose e alterações nos sinusóides também foram vistas em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) coletadas em um reservatório de água doce contaminado com metais pesados (Mahboob

et al., 2020). Lesões como hipertrofia tecidual e dilatação vascular também foram registradas em animais expostos a sedimento contaminado por metais, como o Zinco com concentrações de 0,2 a 0,4 mg/kg, em um período de 28 dias (Jabeen *et al.*, 2018). Resultados semelhantes ao nosso trabalho também foram vistos em *Salminus franciscabus* coletados em dois afluentes do alto da bacia do Rio São Francisco, avaliando os níveis de metais pesados (Savassi *et al.*, 2020). Assim como em JES, 50% das patologias mais frequentes são consideradas moderadas, levantando-se o alerta sob a evolução dessas para danos irreparáveis. Por sua vez, CAN é uma área de proteção com fontes de contaminação, onde mesmo sendo considerada de baixa a média concentração, a presença de contaminantes (como metais pesados) aumenta o risco a saúde dos animais presentes nesse ambiente.

SSV é considerado, segundo os valores propostos pelas Guias de Qualidade de Sedimentos, como altamente impactado (Choueri *et al.*, 2010). Os resultados do índice histopatológico do fígado destes animais foram cerca de 90% maior que JES. Novamente três patologias relacionadas ao processo inflamatório assim como na área referência, sendo elas, infiltração leucocitária, inclusões fibrilares e necrose. Como quarta patologia frequente observou a presença de tumores, caracterizado como uma má diferenciação, onde há uma alta multiplicação das células invadindo e destruindo o tecido residente (Bernet *et al.*, 1999), estas últimas alterações são de grande preocupação pois podem culminar com a perda da integridade do órgão. Ao observarmos as amostras do tecido hepático de SSV percebeu-se que as inclusões fibrilares acabaram evoluindo para uma intensa fibrose. Em 90% das amostras analisadas uma extensa fibrose se estendia por todo tecido hepático. Patologia como esta ocasiona importantes alterações estruturais e funcionais, dessa forma o que anteriormente era um microambiente inflamatório agora tem um papel proeminente no início de um tumor maligno (Waller *et al.*, 2015; Miranda, 2019).

Sendo SSV uma área com contaminantes diversos, as patologias encontradas podem ser relacionadas com vários deles. Estudos pretéritos já traziam relações de tais patologias com a contaminação existente no local. Em uma região portuária, bagres (*Sciades herzbergii*) apresentaram fibrose e infiltração leucocitária como alterações hepáticas (Pinheiro-Souza *et al.*, 2020). Infiltração leucocitária, vacuolização do citoplasma e alterações nos vasos sanguíneos também foram alterações hepáticas

encontradas em Dourados (*Salminus franciscanus*) coletados em região contaminada por efluentes industriais (Savassi *et al.*, 2020).

Estudos como estes corroboram para a relação dos nossos resultados com a contaminação existente em SSV. As patologias mais frequentes encontradas nesta região se dividem em moderadas e irreversíveis, mostrando o baixo nível de saúde dos animais analisados. Se tratando de uma região com intensas atividades antrópicas, e alta concentração de contaminantes o nível de saúde pode continuar decrescendo trazendo problemáticas ao número de indivíduos dessa espécie, e em grande escala para a biodiversidade do local.

Além das análises histopatológicas no fígado, foi realizada uma análise quantitativa de hepatócitos nas três áreas. Observou-se uma redução de 30% na densidade de hepatócitos em ambas as áreas contaminadas, resultado este que se relaciona diretamente com as patologias encontradas nas três regiões em questão, onde alterações como inclusões fibrilares e infiltração leucocitária substituem essas células por um tecido distinto, conjuntivo fibroso no caso das inclusões e sanguíneo no caso da infiltração (Bernet *et al.*, 1999). A diminuição também se relaciona com uma terceira patologia frequente, a morte celular (necrose), ocasionando uma diminuição da quantidade de células nos campos de visão analisados.

Nas três áreas analisadas o fígado apresentou três patologias em comum além da densidade de hepatócitos, mostrando que apesar das patologias serem consideradas, em sua maioria, como moderadas, a existência de um estressor contínuo e/ou de diferentes estressores ocasionam um aumento no índice histopatológico que pode se refletir na perda da função do fígado.

Como podemos ver, tanto as brânquias como o fígado apresentam alterações em nível subcelular, celular e tecidual. Contudo quando avançamos para nível individual não são vistos grandes efeitos. O índice de condição (K) não apresentou significância para nenhuma área impactada. O índice Fulton é uma indicação da saúde do peixe, onde abaixo de 1 é um peixe magro, acima de 1 é um peixe gordo e 1 um peixe saudável (De Vries *et al.*, 2020). Apesar dos nossos resultados não apresentarem significância as três áreas analisadas se aproximam de 1, onde poderíamos considerar que os peixes são saudáveis e/ou vivem em ambientes favoráveis ao seu crescimento. Já na utilização de outro índice biométrico (IHS) vemos diferenças significativas de CAN e SSV, para JES, ambas apresentando médias maiores que a área referência. O IHS é muito utilizado

como resposta as condições de estresse (Ribeiro *et al.*, 2013), dessa forma podemos sugerir que os animais de CAN e SSV estão sob condições mais estressantes que JES.

Em geral, os índices somáticos nos sugerem que se trata de animais saudáveis, mas em condições de estresse em ambas as áreas impactadas. Para entender essa diferença entre as áreas as respostas avaliadas foram ressaltadas na integração dos biomarcadores. No que diz respeito aos biomarcadores bioquímicos das brânquias, os indivíduos de CAN demonstram maior ativação do sistema antioxidante, porém ainda incapaz de conter o estresse oxidativo. Os indivíduos de SSV não apresentaram a ativação do sistema oxidante, porém foi observada a presença de altos valores de dano em DNA e de alteração histopatológica demonstrando que os danos nos indivíduos desta região podem ser mais severos aos organismos. O EIBR demonstrou que para as respostas avaliadas, os animais de CAN apresentam o pior estado de saúde. Além disso, através da PCA também foi possível observar que em CAN existe uma relação direta entre a ativação das defesas antioxidantes, estresse oxidativo e danos.

Estes resultados mostram que mesmo em uma área considerada moderadamente contaminada, os contaminantes presentes neste ambiente podem vir a comprometer a saúde das brânquias e consequentemente dos animais. Em SSV, temos uma resposta distinta de CAN, uma vez que os organismos não demonstram estresse oxidativo, porém apresentam altos valores do índice de lesões histopatológicas, principalmente relacionado a presença de lesões com carácter mais irreversível nesta região, o que pode ser explicado pela grande variedade de contaminantes presentes no ambiente e pelo baixo controle e aplicação das políticas de preservação ambiental.

Já em relação ao fígado viu-se maiores valores do EIBR, mas novamente CAN apresenta o pior estado de saúde. Através da PCA, foi possível constatar que novamente em CAN as histopatologias se relacionam com os biomarcadores bioquímicos mesmo que em um órgão diferente. As relações encontradas em CAN podem ser explicadas pela condição do ambiente, assim como o hábito comportamental do modelo biológico. Nossos resultados mostraram altas concentrações de metais nesta região, sendo o sedimento o compartimento de maior concentração de metais (Melo *et al.*, 2012), ao utilizarmos um modelo biológico com hábito bentofágico este estaria em contato com os contaminantes de maneira direta, como a alimentação, além da indireta por taxas de bioacumulação e biomagnificação. Dessa forma, exige-se que diferentes vias de defesa

sejam ativadas na tentativa de combater os contaminantes ingeridos, assim como o combate aos seus metabólitos.

Em SSV não foi observada uma relação entre a bioquímica e os danos no tecido, ainda que os danos relacionados tenham um caráter de maior irreversibilidade, outras vias que não o estresse oxidativo podem estar relacionadas a estas alterações (Lassen, 2020). Já a diferença no índice histopatológico pode se relacionar ao fato das respostas bioquímicas do fígado não sejam suficientes para a defesa, acarretando a progressão de patologias até que se tornem graves e irreparáveis, como é visto na região. Outra hipótese se relaciona, novamente, com o hábito bentofágico do modelo biológico onde através da alimentação e aproximação com o sedimento, este entra em contato com substâncias como o estrôncio (elemento com alta concentração na região) que trazem efeitos diretos na estrutura hepática além de outros efeitos hepatotóxicos (Chiu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019).

Os resultados demonstram que o fígado apresenta maiores resultados na integração de biomarcadores quando comparado com as brânquias. Acredita-se que isto se relaciona diretamente com a forma de contato com o xenobiótico. As brânquias por se tratar da primeira barreira de proteção enfrentam os próprios xenobióticos. Já o fígado recebe estes xenobióticos pela circulação, podendo enfrentar xenobióticos já transformados, assim como sua função de biotransformação disponibiliza diferentes metabólitos que podem ser mais tóxicos do que o próprio contaminante cobrando assim, uma maior resposta de defesa do órgão em questão.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os animais coletados no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape, apresentam os piores estados de saúde. Embora reconhecida como uma área de proteção ambiental com contaminação moderada os animais vem sofrendo gravemente com os efeitos dos contaminantes, principalmente os metais.

Já os resultados encontrados em Santos-São Vicente demonstram animais muito comprometidos na histoarquitetura dos dois órgãos avaliados, podendo ser este o motivo das baixas respostas subcelulares. A diferença encontrada neste índice pode ser explicada pela grande variedade e concentrações de contaminantes disponíveis em SSV. As brânquias também apresentaram altos índices de danos em DNA que podem também se relacionar com estes achados. Assim, sugere-se mais estudos de monitoramento para se entender como a diversidade de contaminantes está influenciando neste ambiente.

Conclui-se então que os diferentes históricos de atividades antrópicas, assim como os diferentes cenários de políticas ambientais realmente influenciam na saúde dos organismos, onde vemos que CAN nossa área intermediária apresenta o pior estado de saúde no contexto bioquímico, menor nível de organização biológica, enquanto SSV, a área mais impactada, evidencia danos em níveis teciduais bastante preocupantes. Através destes resultados se questiona a não efetividade ou não aplicação de leis ambientais nestes locais.

Por fim, mostra-se a importância e eficácia da utilização de diferentes biomarcadores em diferentes tecidos de maneira integrada para entendimento da resposta do animal aos xenobióticos existentes no ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELE, D. & PUNTARULO, S. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 138, n. 4, p. 405-415.
- ABREU, F. E.; DA SILVA, J. N. L.; CASTRO, Í. B. & FILLMANN, G. 2020. Are antifouling residues a matter of concern in the largest South American port?. *Journal of Hazardous Materials*, v. 398, n. 122937.
- ALMEIDA, D. S. M. 2017. Histopathological evaluation of two Blennius fishes exposed to microplastics via feeding. 46 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova Lisboa.
- AMORIM, L. C. A. 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, p. 158-170.
- ANVARIFAR, H.; AMIRKOLAIE, A. K.; JALALI, A. M.; MIANDARE, H. K.; SAYED, A. H.; ÜÇÜNCÜ, S. İ. & ROMANO, N. 2018. Environmental pollution and toxic substances: Cellular apoptosis as a key parameter in a sensible model like fish. *Aquatic toxicology*, v. 204, p. 144-159.
- ATLI, G., & CANLI, M. 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, n. 8, p. 1884-1889.
- BACIC, M. C. & VIDAL, E. P. 2018. Diversidade cultural do Vale do Ribeira: percepções de alunos do primeiro ano do ensino médio de uma escola pública de Jacupiranga/SP. *Ambiente & Amp; Educação*, v. 23, n. 2, p. 438-451.
- BADROO, I. A., NANDURKAR, H. P., & KHANDAY, A. H. 2020. Toxicological impacts of herbicide paraquat dichloride on histological profile (gills, liver, and kidney) of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 31, p. 39054-39067.

- BAGLIANO, R. V. 2012. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. *Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade*, v. 2, n. 1, p. 24 - 40.
- BALDISSEROTO, B. 2009. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. 2ª ed. Santa Maria. UFSM, p. 349.
- BELIAEFF, B. & BURGEOT, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 21, n. 1316–1322.
- BERNARDES, M. E. C. 2001. Circulação estacionária e estratificação de sal em canais estuarinos parcialmente misturados: simulação com modelos analíticos. 18f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P. & WAHLI, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*, v. 22, n. 1, p. 25-34.
- BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S. YOGUI, G. T.; MONTONE, R. C.; DA SILVA, D. A. M.; LOURENÇO, R. A. & WEBER, R. R. 2006. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, n. 12, p. 1804-1816.
- BIRCH, G. F. 2018. A review of chemical-based sediment quality assessment methodologies for the marine environment. *Marine pollution bulletin*, v. 133, p. 218-232.
- BLASINA, G. E.; RONDA, A. C.; BOTTÉ, S. E.; MOLINA, J. M.; LABUDÍA, A. C.; MARCOVECCHIO, J. E. & LOPEZ-CAZORLA, A. 2020. Metabolic and physiological responses of a coastal fish in highly and lightly impacted habitats. *Journal of Marine Systems*, v. 212, n. 103423.
- BORCIER, E.; CHARRIER, G.; COUTEAU, J.; MAILLET, G.; LE GRAND, F.; BIDEAU, A. & LAROCHE, J. 2020. An Integrated Biomarker Approach Using Flounder to Improve Chemical Risk Assessments in the Heavily Polluted Seine Estuary. *Journal of Xenobiotics*, v. 10, n. 2, p. 14-35.
- BRAGA, E. S.; AZEVEDO, J. S.; KUNIYOSHI, L. & FAVARO, D. I. 2019. Zn, Co, Cr, As, and genotoxic effects in the ichthyofauna species from polluted and non-polluted/protected estuaries of the São Paulo Coast, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, ed. 91.
- BRASIL, Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U. 2005
- BRASIL. Decreto No 5.300, de 07 de dezembro de 2004. Regulamenta a Lei No 7.661, de 16 de maio de 1988, que institui o Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro PNGC, dispõe sobre regras de uso e ocupação da zona costeira e estabelece critérios de gestão da orla marítima, e dá outras providências. Brasília, DF: Diário Oficial da União (DOU), 08/12/2004.
- BURGESS, R. M.; BERRY, W. J.; MOUNT, D. R. & DI TORO, D. M. 2013. Mechanistic sediment quality guidelines based on contaminant bioavailability: equilibrium partitioning sediment benchmarks. *Environ Toxicol Chem.* v. 32, n. 1, p. 102-14.

- CAMARGO, M. M. P. & MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, vol. 5, n. 3, p. 327-336. 2007.
- CAO, L.; HUANG, W.; LIU, J.; YIN, X. & DOU, S. 2010. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 151, n. 3, p. 386-392.
- CARDOSO, M. A. 2021. Complexidade nas Relações Terra e Mar: Estudo Exploratório sobre a Elaboração do Zoneamento Ecológico-Econômico da Baixada Santista. 61p.
- CARRIÇO, J. M., & PINHO, R. M. L. 2021. A urbanização na zona costeira e os impactos ambientais—o caso da rmbs no estado de São Paulo. *Leopoldianum*, v. 47, n. 131, p.20-20.
- CARVALHO, T. L. A. D. B.; NASCIMENTO, A. A. D.; GONÇALVES, C. F. D. S.; SANTOS, M. A. J. D. & SALES, A. 2020. Assessing the histological changes in fish gills as environmental bioindicators in Paraty and Sepetiba bays in Rio de Janeiro, Brazil. *Latin american journal of aquatic research*, v. 48, n. 4, p. 590-601.
- CENSUS U. S., 2020. Change in Resident Population of the 50 States, the District of Columbia, and Puerto Rico: 1910 to 2020. *census.gov*. Departamento do Censo dos Estados Unidos.
- CHAGAS, P. I. G. 2020. Disponibilidade de arsênio em dois estuários com diferentes graus de antropização: Santos-São vicente e Cananéia, São Paulo. 63f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia.
- CHIU, C. Y.; CHIU, H. C.; LIU, S. H. & LAN, K. C. 2019. Prenatal developmental toxicity study of strontium citrate in Sprague Dawley rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 101, p. 196-200.
- CHOUERI, P. K. G. 2015. Uso de bagre amarelo (*Cathorops spixii*) como modelo biológico de exposição e efeito de contaminantes no complexo estuarino-lagunar Cananéia-Iguape-Peruíbe.
- CHOUERI, R. B.; CESAR, A.; ABESSA, D. M. D. S.; TORRES, R. J.; RIBA, I.; PEREIRA, C. D. S. & DELVALLS, T. A. 2010. Harmonised framework for ecological risk assessment of sediments from ports and estuarine zones of North and South Atlantic. *Ecotoxicology*, v.19, n. 4, p. 678-696.
- CRUZ, A. C. F.; GUSSO-CHOUERI, P.; ARAUJO, G. S.; CAMPOS, B. G.; ABESSA, D. M. S. 2019. Levels of metals and toxicity in sediments from a Ramsar site influenced by former mining activities. *Ecotoxicology and Environmental safety*, v. 171, p. 162-172.
- DA MOTA ARAUJO, H. R., FERNANDES, M. N., & DA CRUZ, A. L. 2019. Gill morphology and Na⁺/K⁺-ATPase activity of *Gobionellus oceanicus* (Teleostei: Gobiidae) in an estuarine system. *Biological trace element research*, v. 187, n. 2, p. 526-535.
- DANE, H. & SISMAN, T. 2015. Histopathological changes in gill and liver of *Capoeta capoeta* living in the Karasu River, Erzurum. *Environmental Toxicology*, v. 30, n. 8, p. 904–917.
- DAVID, J. A. O. & FONTANETTI, C. S. 2009. The role of mucus in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gills from polluted environments. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 203, p. 261–266.

- DE PAULA, B. C. S. & GRANZIERA, M. L. M. 2017. Jureia-Itatins. *Revista de Direitos Difusos*, v. 68, n. 2, p. 83-104.
- DE VRIES, A. N.; GOVONI, D.; ÁRNASON, S. H. & CARLSSON, P. 2020. Microplastic ingestion by fish: Body size, condition factor and gut fullness are not related to the amount of plastics consumed. *Marine pollution bulletin*, v. 151, n. 110827.
- DEPLEDGE, M. H. 1993. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: FOSSI, M.C., LEONZIO, C., *Nondestructive Biomarkers in Higher Vertebrates*. Lewis, Boca Raton, Florida, p. 261- 285.
- ELLIOTT, M. & QUINTINO, V. 2019. The Estuarine Quality Paradox Concept. *Encyclopedia of Ecology*, p. 78-85.
- FATIMA, S.; MUZAMMAL, M.; REHMAN, A.; RUSTAM, S. A.; SHEHZADI, Z.; MEHMOOD, A. & WAQAR, M. 2020. Water pollution on heavy metals and its effects on fishes. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, v. 8, n. 3, p. 6-14.
- FIGUEIRA, R. C. L & CUNHA, I. I. L. 1998. A contaminação dos oceanos por radionuclídeos antropogênicos. *Química Nova*, v. 21, p. 73-77.
- FREIRE, M. M.; AMORIM, L. M. F.; BUCH, A. C.; GONÇALVES, A. D.; SELLA, S. M.; CASSELLA, R. J. & SILVA-FILHO, E. V. 2020. Polycyclic aromatic hydrocarbons in bays of the Rio de Janeiro state coast, SE-Brazil: Effects on catfishes. *Environmental research*, v. 181, p. 108959.
- FROESE, R. & PAULY D. FishBase. 2017. <http://www.fishbase.org>. Acessado em 14 de janeiro de 2019.
- GABRIEL, F. Â.; HAUSER-DAVIS, R. A.; SOARES, L.; MAZZUCO, A. C. A.; ROCHA, R. C. C.; SAINT PIERRE, T. D.; SAGGIORO, E.; CORREIA, F. V.; FERREIRA, T. O. & BERNARDINO, A. F. 2020. Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. *PeerJ* 8, e. 10266
- GAGNE, F. & BLASE, C. 1995. Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environ Toxicol Water Qual* v. 10, p. 217–229.
- GAO, Y.; FANG, L.; XIANG, Q. Q.; WANG, D.; DING, L. Y.; DING, C. Z. & CHEN, L. Q. 2020. Ecological risk assessment of heavy metals in fish from the Dianchi Lake, China using the integrated biomarker response approach. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 36, p. 45712-45721.
- GEORGE, O. O.; AMAEZE, N. H.; BABATUNDE, E. & OTITOLOJU, A. A. 2017. Genotoxic, histopathological and oxidative stress responses in catfish, *Clarias gariepinus*, exposed to two antifouling paints. *Journal of Health and Pollution*, v. 7, n. 16, p. 71-82.
- GIMILIANI, G. T.; FORNARI, M.; REDÍGOLO, M. M.; BUSTILLOS, J. O. W. V.; DE SOUZA ABESSA, D. M. & PIRES, M. A. F. 2020. Simple and cost-effective method for microplastic quantification in estuarine sediment: A case study of the Santos and São Vicente Estuarine System. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, v. 2, n. 100020.
- GNATYSHYNA, L.; KHOMA, V.; MISHCHUK, O.; MARTINYUK, V.; SPRINÇE, G. & STOLIAR, O. 2020. Multi-marker study of the responses of the *Unio tumidus* from the

- areas of small and micro hydropower plants at the Dniester River Basin, Ukraine. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 10, p. 11038-11049.
- GOMES, E. G.; MACHADO, A. A. S.; HOFF, M. L. M. & BIANCHINI, A. 2011. Avaliação da lipoperoxidação em peixe como potencial biomarcador de contaminação aquática. *Proceedings of the IV Workshop e I Simpósio de Ecotoxicologia*.
- GONÇALVES, A. R. N.; MARINSEK, G. P.; DE SOUZA ABESSA, D. M. & DE BRITTO MARI, R. 2020. Adaptive responses of myenteric neurons of *Spherooides testudineus* to environmental pollution. *Neurotoxicology*, v. 76, p. 84-92.
- GUSSO-CHOUERI, P. K.; CHOUERI, R. B.; DE ARAÚJO, G. S.; CRUZ, A. C. F.; STREMEL, T.; CAMPOS, S. & RIBEIRO, C. A. O. 2015. Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 22, p. 18047-18065.
- GUSSO-CHOUERI, P. K.; DE ARAÚJO, G. S.; CRUZ, A. C. F.; DE OLIVEIRA STREMEL, T. R.; DE CAMPOS, S. X.; DE SOUZA ABESSA, D. M. & CHOUERI, R. B. 2018. Metals and arsenic in fish from a Ramsar site under past and present human pressures: Consumption risk factors to the local population. *Science of the Total Environment*, v. 628, p. 621-630.
- GUZMAN, M. A. L. G.; ESPIRITU, E. Q.; UNSON, J. R.; ALBA, V. J.; HERNANDEZ, M. L.; SY, L. A. & ESPINAS, J. R. 2019. Comparative Study of the Ecotoxicological and Histopathological Impacts of Effluent, Sludge Water, and Commonly Used Inorganic Fertilizers on Juvenile *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Philippine Journal of Science*, v. 148, n. 1, p. 129-135.
- HAGGER, J. A.; GALLOWAY, T. S.; LANGSTON, W. J. & JONES, M. B. 2009. Application of biomarkers to assess the condition of European Marine Sites. *Environ. Pollut.* v. 157, p. 2003–2010.
- HAGGER, J. A.; JONES, M. B.; LOWE, D.; LEONARD, D. R. P.; OWEN, R. & GALLOWAY, T. S. 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. *Mar. Pollut. Bull.* v. 56, p. 1111–1118.
- HISMAYASARI, I. B.; MARHENDRA, A. P. W.; RAHAYU, S.; SAIDIN, S. D. & SUPRIYADI, D. S. 2015. Gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI) and proportion of oocytes stadia as an indicator of rainbowfish *Melanotaenia boesemani* spawning season. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, v. 2, n. 5, p. 359-362.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. & FÁTIMA, Â. de. 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1170-1179.
- ISLAM, M. A.; DAS, B.; QURAISHI, S. B.; KHAN, R.; NAHER, K.; HOSSAIN, S. M. & HOSSEN, M. B. 2020. Heavy metal contamination and ecological risk assessment in water and sediments of the Halda river, Bangladesh: A natural fish breeding ground. *Marine Pollution Bulletin*, v. 160, p. 111649.
- JABEEN, G.; MANZOOR, F.; JAVID, A.; AZMAT, H.; ARSHAD, M. & FATIMA, S. 2018. Evaluation of fish health status and histopathology in gills and liver due to metal

contaminated sediments exposure. Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 100, n. 4, p. 492-501.

- JAVED, M.; AHMAD, I.; USMANI, N. & AHMAD, M. 2016. Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. Chemosphere, v. 151, p. 210-219.
- JHA, A. N.; CHEUNG, V. V.; FOULKES, M. E.; HILL, S. J & DEPLEDGE, M.H. 2000. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. v. 464, p. 213–228
- JOHNSON, D. S. 1973. Brackish waters. Animal Life and Nature in Singapore. Singapore University Press, Singapore, p. 128-139.
- KEEN J. H.; HABIG, W. H. & JAKOBY, W. B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. J Biol Chem, v. 251, p. 6183– 6188.
- KHALIL, A., JAMIL, A., & KHAN, T. 2020. Assessment of heavy metal contamination and human health risk with oxidative stress in fish (*Cyprinus carpio*) from Shahpur Dam, Fateh Jang, Pakistan. Arabian Journal of Geosciences, v. 13, n. 18, p. 1-10.
- KLINGELFUS, T., COSTA, P. M. D., SCHERER, M., & CESTARI, M. M. 2015. DNA damage in the kidney tissue cells of the fish *Rhamdia quelen* after trophic contamination with aluminum sulfate. Genetics and molecular biology, v. 38, p. 499-506.
- KROON, F.; STRETEN, C.; & HARRIES, S. 2017. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. PloS one, v. 12, n. 4, e. 0174762.
- LACERDA, D.; DOS SANTOS VERGILIO, C.; DA SILVA SOUZA, T.; COSTA, L. H. V.; RANGEL, T. P.; DE OLIVEIRA, B. C. V. & DE REZENDE, C. E. 2020. Comparative metal accumulation and toxicogenetic damage induction in three neotropical fish species with distinct foraging habits and feeding preferences. Ecotoxicology and environmental safety, v. 195, p. 110449.
- LASSEN, M. F. M. 2020. Alterações histopatológicas, genotóxicas e estresse oxidativo em peixes submetidos a águas superficiais antropizadas. 97f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo, RS.
- LIMA, M. C.; GIACOMELLI, M. B. O.; STÜPP, V.; ROBERGE, F. D. & BARRERA, P. B. 2001. Especiação de cobre e chumbo em sedimento do rio Tubarão (SC) pelo método Tessier. Química Nova, v. 24, n. 6, p. 734-742.
- LIU, J.; REN, S.; ZHOU, Y.; TSANG, D. C.; LIPPOLD, H.; WANG, J. & CHEN, Y. 2019. High contamination risks of thallium and associated metal (loid) s in fluvial sediments from a steel-making area and implications for environmental management. Journal of environmental management, v. 250, e. 109513.
- LIU, Z.; CHEN, B.; LI, X.; WANG, L. A.; XIAO, H. & LIU, D. 2019. Toxicity assessment of artificially added zinc, selenium, and strontium in water. Science of the total environment, v.670, p. 433-438.
- MACÊDO, A. K. S.; DOS SANTOS, K. P. E.; BRIGHENTI, L. S.; WINDMÖLLER, C. C.; BARBOSA, F. A. R.; DE AZAMBUJA RIBEIRO, R. I. M. & THOMÉ, R. G. 2020. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken,

- 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 735, n. 139505.
- MAHBOOB, S.; AL-GHANIM, K. A.; AL-BALAWI, H. F.; AL-MISNED, F. & AHMED, Z. 2020. Toxicological effects of heavy metals on histological alterations in various organs in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from freshwater reservoir. *Journal of King Saud University-Science*, v. 32, n. 1, p. 970-973.
- MAIER, H. L. 2016. Regulação da proteína HSP70 em *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) de áreas contaminadas por metais-traço. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 43p.
- MARIA, V. L. & BEBIANNO, M. J. 2011. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo (a) pyrene and copper. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 154, n. 1, p. 56-63.
- MARINA M. P. & MARTINEZ B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop Ichthyol*, v. 5, p. 327–336. 2007
- MARINSEK, G. P. 2018. "Alterações morfofuncionais no intestino de *Sphoeroides testudineus* decorrentes de diferentes níveis de contaminação em três estuários do litoral do estado de São Paulo." Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista – Instituto de Biociências. 84f.
- MARINSEK, G. P.; DE SOUZA ABESSA; D. M.; GUSSO-CHOUERI, P. K.; CHOUERI, R. B.; GONÇALVES, A. R. N.; BARROSO, B. V. D. A. & DE BRITTO MARI, R. 2018. Enteric nervous system analyses: new biomarkers for environmental quality assessment. *Marine pollution bulletin*, v. 137, p. 711-722.
- MARQUES, O. A.V. & DULEBA, W. 2004. Estação Ecológica Juréia-Itatins - Ambiente Físico, Flora e Fauna. Holos, Editora Ltda-ME, Ribeirão Preto, SP, 384p.
- MELO, V. D. F.; ANDRADE, M. D.; BATISTA, A. H.; FAVARETTO, N.; GRASSI, M. T. & CAMPOS, M. S. D. 2012. Chumbo e zinco em águas e sedimentos de área de mineração e metalurgia de metais. *Química nova*, v. 35, n. 1, p. 22-29.
- MIRANDA, M. L. P. 2019. Efeito quimiopreventivo da Beta-ionona na hepatocarcinogênese associada à fibrose hepática. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 98f.
- MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). 2018. MMA divulga municípios da zona costeira. 19 dez. 2018^a.
- MOKHBATLY, A. A. A.; ASSAR, D. H.; GHAZY, E. W.; ELBIALY, Z.; RIZK, S. A.; OMAR, A. A. & DAWOOD, M. A. 2020. The protective role of spirulina and β -glucan in African catfish (*Clarias gariepinus*) against chronic toxicity of chlorpyrifos: hemato-biochemistry, histopathology, and oxidative stress traits. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. (25), p. 31636-31651.
- MUNARI, L. C. 2009. Memória social e ecologia histórica: a agricultura de coivara das populações quilombolas do Vale do Ribeira e sua relação com a formação da mata atlântica local. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 218 p.
- MUSTAFA, S. A.; AL-RUDAINY, A. J.; AL-SAMAWI, S. M. 2020. Histopathology and level of bioaccumulation of some heavy metals in fish, *Carasobarbus luteus* and *Cyprinus*

carpio tissues caught from Tigris river, Baghdad. The Iraqi Journal of Agricultural Science, v. 51, n. 2, p. 698-704.

- NASCIMENTO, N. S. S. 2019. Respostas histopatológicas do fígado de *Sphoeroides testudineus* e *Genidens barbatus* oriundos de locais com diferentes interferências antrópicas. 33f. Trabalho de conclusão de curso em Ciências biológicas. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” Instituto de Biociências Câmpus do Litoral Paulista, São Vicente.
- NASH, R. D. M.; VALENCIA, A. H. & GEFFEN, A. J. 2006. The origin of Fulton’s condition factor—setting the record straight. Fisheries, v. 31, n. 5, p. 236-238.
- NAZ, S.; HUSSAIN, R.; ULLAH, Q.; CHATHA, A. M. M.; SHAHEEN, A. & KHAN, R. U. 2021. Toxic effect of some heavy metals on hematology and histopathology of major carp (*Catla catla*). Environmental science and pollution research, v. 28, n. 6, p. 6533-6539.
- NEPHALE, L. E.; MOYO, N. A. & RAPATSA, M. M. 2021. Use of biomarkers in monitoring pollution status of urban rivers, Limpopo, South Africa. Environmental Science and Pollution Research, v. 1-13.
- NIMET, J.; NEVES, M. P.; VIANA, N. P.; DE ARRUDA AMORIM, J. P. & DELARIVA, R. L. 2020. Histopathological alterations in gills of a fish (*Astyanax bifasciatus*) in neotropical streams: negative effects of riparian forest reduction and presence of pesticides. Environmental monitoring and assessment, v. 192, n. 1, p. 1-13.
- OBANYA, H. E.; OMOARUKHE, A.; AMAEZE, N. H. & OKOROAFOR, C. U. 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Ologe lagoon and effects of Benzo [b] fluoranthene in African Catfish. Journal of Health and Pollution, v. 9, n. 22.
- OLIVE, P. L. 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. Environ Mol Mutagen, v. 11, p. 487–495.
- OLIVEIRA, C. R. M.; DE CASTRO, L. M.; DA CRUZ NAZARETH, M. A.; HARAYASHIKI, C. A. Y. & CASTRO, Í. B. 2020. Shell structure and composition alterations in the limpet *Lottia subrugosa* along a contamination gradient in the Santos Estuary, Brazil. Ecological Indicators, v. 115, p. 106417.
- OMIRINDE, J. O.; AUDU, B. S.; MOHAMMED, O. M. & GOSOMJI, I. J. 2017. Histomorphometric changes in the gill of *Clarias gariepinus* exposed to acute concentrations of chlorpyrifos. Journal of Morphological Sciences, v. 34, n. 03, p. 197-202.
- PAL, S.; KOKUSHI, E.; KOYAMA, J.; UNO, S. & GHOSH, A. R. 2012. Histopathological alterations in gill, liver and kidney of common carp exposed to chlorpyrifos. Journal of Environmental Science and Health, Part B, v. 47, n. 3, p. 180-195.
- PASTORINO, P.; PIZZUL, E.; BARCELÓ, D.; ABETE, M. C.; MAGARA, G.; BRIZIO, P. & ELIA, A. C. 2021. Ecology of oxidative stress in the Danube barbel (*Barbus balcanicus*) from a winegrowing district: Effects of water parameters, trace and rare earth elements on biochemical biomarkers. Science of The Total Environment, v. 772, p. 145034.
- PAUL, T.; KUMAR, S.; SHUKLA, S. P.; PAL, P.; KUMAR, K.; POOJARY, N. & MISHRA, A. 2020. A multi-biomarker approach using integrated biomarker response to assess the effect of pH on triclosan toxicity in *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878). Environmental Pollution, v. 260, e. 114001.

- PECORARO, G. D.; HORTELLANI, M. A.; HAGIWARA, Y. S.; BRAGA, E. S.; SARKIS, J. E. & AZEVEDO, J. S. 2019. Bioaccumulation of total mercury (THg) in catfish (Siluriformes, Ariidae) with different sexual maturity from Cananéia-Iguape Estuary, SP, Brazil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 102, n. 2, p. 175-179.
- PEREIRA, B. F.; DA SILVA ALVES, R. M.; PITOL, D. L.; SENHORINI, J. A.; DE ALCÂNTARA ROCHA, R. C. G. & CAETANO, F. H. 2012. Morphological gill analysis of fish species *Prochilodus lineatus* after exposure to pollutants. *J Environment Analytic Toxicol*, v. 2, n. 130, p. 2161-0525.
- PERINA, F. C. & ABESSA, D. M. de S. 2020. Contamination and toxicity in a subtropical Estuarine Protected Area influenced by former mining activities. *Ocean and Coastal Research*, v. 68.
- POLEKSIC, V. & MITROVIC-TUTUNDZIC, V. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In MÜLLER, R. and LLOYD, R. (Eds.). *Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford: Fishing News Books, p. 339-352.
- REMYA VARADARAJAN, H. S. H.; JOSE, J. & PHILIP, B. 2004. Sublethal effects of phenolic compounds on biochemical, histological and ionoregulatory parameters in a tropical teleost fish *Oreochromis mossambicus* (Peters).
- RIBEIRO, C. O.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A. & ROCHE, H. É. L. È. N. E. 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, v. 74, n. 1, p. 53-69.
- RODRIGUES, S.; ANTUNES, S. C.; NUNES, B. & CORREIA, A. T. 2017. Histological alterations in gills and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to the antibiotic oxytetracycline. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 53, p. 164-176.
- SALGADO, L. D.; MARQUES, A. E. M. L.; KRAMER, R. D.; DE OLIVEIRA, F. G.; MORETTO, S. L.; DE LIMA, B. A. & DE ASSIS, H. C. S. 2019. Integrated assessment of sediment contaminant levels and biological responses in sentinel fish species *Atherinella brasiliensis* from a sub-tropical estuary in south Atlantic. *Chemosphere*, v. 219, p. 15-27.
- SANCHEZ, W.; BURGEOT, T. & PORCHER, J. M. 2013. A novel —Integrated Biomarker Response— calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci Pollut.*, v. 20, p. 2721-2725.
- SANTOS, F. R.; NEVES, P. A.; KIM, B. S.; TANIGUCHI, S.; LOURENÇO, R. A.; TIMOSZCZUK, C. T. & BÍCEGO, M. C. 2020. Organic contaminants and trace metals in the western South Atlantic upper continental margin: anthropogenic influence on mud depocenters. *Marine pollution bulletin*, v. 154, n. 111087.
- SANTOS, J. V. N. D.; MARTINS, R.; FONTES, M. K.; CAMPOS, B. G. D.; MAIA, F.; ABESSA, D. M. D. S. & PERINA, F. C. 2020. Can Encapsulation of the Biocide DCOIT Affect the Anti-Fouling Efficacy and Toxicity on Tropical Bivalves?. *Applied Sciences*, v. 10, n. 23, p. 8579.
- SAVASSI, L. A.; PASCHOALINI, A. L.; ARANTES, F. P.; RIZZO, E. & BAZZOLI, N. 2020. Heavy metal contamination in a highly consumed Brazilian fish: immunohistochemical

- and histopathological assessments. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 192, n. 8, p. 1-14.
- SCHLENK, D. 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 39, n. 1-12, p. 48-53.
- SEDLAK, J. & LINDSAY, R. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* v. 25, p. 192–205.
- SIES, H; KOCH, O. R.; MARTINO, E & BOVERIS, A. 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett* v. 03, p. 287–290.
- SINHA, A. K.; ROMANO, N.; SHRIVASTAVA, J.; MONICO, J. & BISHOP, W. M. 202). Oxidative stress, histopathological alterations and anti-oxidant capacity in different tissues of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to a newly developed sodium carbonate peroxyhydrate granular algacide formulated with hydrogen peroxide. *Aquatic Toxicology*, v. 218, n. 105348.
- SOUSA, E. C. P. M. D.; ZARONI, L. P.; GASPARRO, M. R. & PEREIRA, C. D. S. 2014. Review of ecotoxicological studies of the marine and estuarine environments of the Baixada Santista (São Paulo, Brazil). *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 62, p. 133-147.
- SUBBURAJ, A.; JAWAHAR, P.; JAYAKUMAR, N.; SRINIVASAN, A. & AHILAN, B. 2018. Acute toxicity bioassay of Malathion (EC 50%) on the fish, *Oreochromis mossambicus* (tilapia) and associated histological alterations in gills. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 6, n. 1, p. 103–107.
- TABACHNIC, B. G. & FIDELL, L. S. 1996. Using multivariate statistics. Harper Collins College Publishers, New York.
- TESSER, T. T.; ROCHA, C. D. & CASTRO, D. 2021. Metal contamination in omnivores, carnivores and detritivores fish along the tramandaí river basin, rs, brazil. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, v. 100496.
- TRABELSI, W.; FOUZAI, C.; CHETOUI, I.; BEJAOU, S.; TELAHIGUE, K.; RABEH, I. & SOUDANI, N. 2020. Oxidative stress biomarkers in the gills of the bivalve *Macrtr stultorum* exposed to acrylamide. *Scientia Marina*, v. 84, n. 2, p. 143-150.
- TRAMONTE, K. M.; FIGUEIRA, R. C. L.; DE LIMA FERREIRA, P. A.; RIBEIRO, A. P.; BATISTA, M. F.; DE MAHIQUES, M. M. 2016. Environmental availability of potentially toxic elements in estuarine sediments of the Cananéia-Iguape coastal system, Southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, s. 1, v. 103, n. 1-2, p. 260-269.
- TRIPATHI, S., & SRIVASTAV, A. K. 2010. Branchial histopathological study of Catfish *Heteropneustes fossilis* following exposure to purified neem extract, Azadirachtin. *World journal of zoology*, v. 5, n. 4, p. 239-243.
- USTAOĞLU, F., & TEPE, Y. 2019. Water quality and sediment contamination assessment of Pazarsuyu Stream, Turkey using multivariate statistical methods and pollution indicators. *International Soil and Water Conservation Research*, v. 7, n. 1, p. 47-56.
- VAN DER OOST R.; BEYER J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers. in environmental risk assesement: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149.

- VARZIM, C. S.; HADLICH, H. L.; ANDRADES, R.; MAZZUCO, A. C. D. A. & BERNARDINO, A. F. 2019. Tracing pollution in estuarine benthic organisms and its impacts on food webs of the Vitoria Bay estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 229, n. 106410.
- VASCONCELOS, R. P.; BATISTA, M. I. & HENRIQUES, S. 2017. Current limitations of global conservation to protect higher vulnerability and lower resilience fish species. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-12.
- VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E. & KOEHLER, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* v. 146, p. 281–300.
- VINODHINI, R. & NARAYANAN, M. 2009. Heavy metal Induced histopathological alterations in selected organs of the *Cyprinus carpio* L. (Common Carp). *International Journal Environmental Research*, v. 3, p. 95–100.
- WALLER, L. P.; DESHPANDE, V. & PYRSOPOULOS, N. 2015. Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review. *World Journal Hepatology*, v. 7, n. 26, p. 2648-63.
- WEBER, A. A.; SALES, C. F.; DE SOUZA FARIA, F.; MELO, R. M. C.; BAZZOLI, N. & RIZZO, E. 2020. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 190, n. 110165.
- WHO, International Programme on Chemical Safety (IPCS). 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155, World Health Organization, Geneva.
- WILLS, E. D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell K, Mullack B (eds) *Biochemical toxicology: a practical approach*. IRL Press, Oxford.
- ZÜNDT, C. 2006. Baixada Santista: uso, expansão e ocupação do solo, estruturação de rede urbana regional e metropolização. *Novas metrópoles paulistas: população, vulnerabilidade e segregação*. Campinas: Núcleo de Estudos de População/Unicamp.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ABESSA, D. M. S. *et al.* Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: Uma revisão. *Mundo da Saúde*, v. 36, n. 4, p. 643-661. 2012.
- ABREU, F. E. L. *et al.* Are antifouling residues a matter of concern in the largest South American port?. *Journal of Hazardous Materials*, v. 398, p. 122937. 2020.
- AGUILAR, C. A. *et al.* American oyster (*Crassostrea virginica*) and sediments as a coastal zone pollution monitor by heavy metals. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v.9, n. 4, p. 579–586. 2012.
- ALBINATI, A. C. I., *et al.* Biomarcadores histológicos – toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 3, p. 621-627. 2009.

ALI, M., & SREEKRISHNAN, T. R. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in environmental research*, v. 5, n. 2, p. 175-196. 2001.

ALISSON, E. Ambientes marinhos e de água doce no Brasil sofrem com poluição por microplásticos. *INFOCIRM*, v. 29, n. 2, p. 14-15. 2017.

ALMEIDA, M. D, *et al.* Estrogenic and anti-androgenic effects of the herbicide tebuthiuron in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicology*, v. 194, p. 86-93. 2018.

AMORIM, E. P. de. Avaliação da concentração de metais e outros elementos de interesse em amostras de sedimentos dos estuários de Santos/São Vicente e Cananéia, Estado de São Paulo, Brasil. 350f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, p. 158-170. 2003.

AQUINO DA SILVA, A. G. *et al.* Coastline change and offshore suspended sediment dynamics in a naturally developing delta (Paraíba Delta, NE Brazil). *Marine Geology*, v. 410, p. 1-15. 2019.

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

ARIAS, A.R.L. *et al.* Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência, saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v.12, n.1. p.61-72. 2007.

ARUNACHALAM, S.; JEYALAKSHMI, K.; ABOOBUCKER, S. Toxic and sublethal effects of carbaryl on a freshwater catfish, *Mystus vittatus* (Bloch). *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 9, n. 3, p. 307-316. 1980.

BAGLIANO, R. V. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. *Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade*, v. 2, n. 1, p. 24-40. 2012.

BAPTISTA, D. F. Uso de macroinvertebrados em procedimentos de biomonitoramento em ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 6. 2008.

BAPTISTA, B. W. M. & VIEIRA, L. G. S. Cultura como ferramenta de manutenção das raízes caiçaras da Juréia. *Revista Observatório da Diversidade Cultural*, v. 01, n. 01, 2014.

BENINCÁ, C. Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho-Jaguaruna (SC) e Santa Marta-Laguna (SC); utilizando *Geophagus bresiliensis* (Cichlidae). Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 112f. 2006.

BERENGER, J.N.; MOLISANI, M.M. & MORAES, J.C. Utilização de biomarcadores bioquímicos em *Genidens genidens* para avaliação do grau de contaminação por derivados de petróleo no estuário do rio macaé. 2013.

BERNARDES, M. E. C. Circulação estacionária e estratificação de sal em canais estuarinos parcialmente misturados: simulação com modelos analíticos. 18f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

BETEMPS, Glauco Rasmussen; KERSTNER, Talita; SANCHES FILHO, Pedro José. Caracterização físico-química da água e determinação de metais pesados (Cr, Cu, Pb e Zn) no sedimento do riacho Arroio do Padre (Arroio do Padre, Brasil/RS). *Revista Thema*, v. 11, n. 2, p. 4-20. 2014.

BRAGA, E. S. *et al.* Zn, Co, Cr, As, and genotoxic effects in the ichthyofauna species from polluted and non-polluted/protected estuaries of the São Paulo coast, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 91, n. 4. 2019.

BRODIN, T. *et al.* Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems-impacts through behavioral alterations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1656, p. 20130580. 2014.

CALABRESE, E. J. *Multiple Chemical Interactions*, Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, p. 704. 1991.

CARMONA, S. L. *et al.* Dados de Sensoriamento Remoto e de Geoprocessamento para apoio aos Planos de Contingência durante eventos de derramamentos de óleo em regiões costeiras: O Caso do litoral norte do Estado de São Paulo. XI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. p.431-438. 2003.

CARRIÇO, J. M., & PINHO, R. M. L. A urbanização na zona costeira e os impactos ambientais—o caso da rmbs no estado de são paulo. *Leopoldianum*, v. 47, n. 131, p. 20-20. 2021.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental; Dinâmica dos vazamentos de petróleo no canal de São Sebastião, São Paulo. 120f. 1996.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental; Sistema Estuarino Santos e São Vicente, São Paulo, 2001.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental; Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, São Paulo, 2015.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental; Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, São Paulo. 336f. 2019.

CRUZ, A. C. F. *et al.* Levels of metals and toxicity in sediments from a Ramsar site influenced by former mining activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 171, p. 162-172. 2019.

COLLAÇO, F.L. *et al.* Cultivo de bijupirá (*Rachycentron canadum*) em Cananeia, SP, Brasil. Avaliação da viabilidade utilizando geoprocessamento. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, v. 15, n. 2, p. 277-289. 2015a.

DEPLEDGE, M.H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C., Leonzio, C., *Nondestructive Biomarkers in Higher Vertebrates*. Lewis, Boca Raton, Florida, p. 261- 285. 1993.

DERÍSIO, J. C. Introdução ao controle de poluição ambiental. CETESB-Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo. 1992.

DIEGUES, A. C. Conservação e desenvolvimento sustentado de ecossistemas litorâneos no Brasil. In: Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. Cananéia. Anais. São Paulo, ACIESP, v. 3, p. 196-243. 1987.

DHARA, K.; SAHA, N. C. & MAITI, A. K. Studies on acute and chronic toxicity of cadmium to freshwater snail *Lymnaea acuminata* (Lamarck) with special reference to behavioral and hematological changes. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 35, p. 27326-27333. 2017.

DOURADO, P. L. R. Interferência do inseticida fipronil nas respostas ao estresse oxidativo de Tilápias do Nilo mediadas pelo ácido gama aminobutírico (GABA), durante períodos de hipóxia. Tese de Doutorado em Biociências. 119f. 2019.

DUARTE, A. A. L. & Vieira, J. M. Caracterização dos ambientes estuarinos: mistura em estuários. Universidade do Minho. Portugal. 15f. 1997.

DUARTE, L. F. A. Impacto genó e citotóxico em populações do caranguejo-uça, *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucidae), em manguezais do Estado de São Paulo, Brasil. Tese (doutorado) pela Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 154f. 2014.

DUURSMA, E.K., & MARCHAND, M. Aspects of Organic Marine Pollution (IAEA-TECDOC--187). International Atomic Energy Agency (IAEA). 1976.

ENVIRONMENT CANADA, ONTARIO MINISTRY OF THE ENVIRONMENT (EC/OME). CanadaOntario Agreement. Contaminated Sediment Assessment Decision-Making Framework. COA Sediment Task Group Final Draft, 2005.

ENVIRONMENT CANADA AND MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, DE L'ENVIRONNEMENT ET DES PARCS DU QUÉBEC, 2007. Criteria for the Assessment of Sediment Quality in Quebec and Application Frameworks: Prevention, Dredging and Remediation. 2007.

FANTA E. *et al.* Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 54, p. 119-130. 2003.

FERRARIS, Jr. C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, v. 1418. p. 1–628. 2007.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A. *et al.* Histopathological changes in liver and Gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, p.103-109. 2007.

FILET, M. *et al.* Gerenciamento costeiro e os estudos do Quaternário no Estado de São Paulo, Brasil. *Pesquisas em Geociências*, v. 28, n. 2, p. 475-486. 2001.

FLORES-LOPES, F.& MALABARBA, L. R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambari *Astyanax jacuhiensis* (COPE, 1894) (TELEOSTEI, CHARACIDAE) sob influência de efluentes petroquímicos. *Biociências*, v. 15, n. 2, p. 166-172. 2007.

FONSECA, A. R. *et al.* The impact of freshwater metal concentrations on the severity of histopathological changes in fish gills: A statistical perspective. *Science of the Total Environment*, v. 599-600, p. 217-226. 2017.

GIMILIANI, G. T. *et al.* Simple and cost-effective method for microplastic quantification in estuarine sediment: A case study of the Santos and São Vicente Estuarine System. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, p. 100020. 2020.

GIMILIANI, G. T.; FONTES, R. F. C. & ABESSA, D. M. de S. Modeling the dispersion of endocrine disruptors in the Santos estuarine system (Sao Paulo State, Brazil). *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 64, n. 1, p. 1-8. 2016.

GUIMARÃES V. & SÍGOLO J. B. Associação de resíduos da metalurgia com sedimentos em suspensão- rio Ribeira de Iguape. *Revista do Instituto de Geociências*, v. 8, n.2, p. 1–10. 2008.

HINTON, D. E. & LAUREN D. J. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. In: *American fisheries society*, v. 8, p. 51-66. 1990.

HORTELLANI, M. A. *et al.* Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do Estuário Santos-São Vicente. *Química Nova*, p. 10-19. 2008.

IBGE. População estimada: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Estimativas da população residente com data de referência 1o de julho de 2020.

JARDIM, G. M. Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do Rio Corumbataí, SP. Dissertação (Mestrado) – Estudo Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 126p. 2004.

KAMBLE, S. B. & KAMBLE, N. A. Behavioral changes in freshwater snail *Bellamya bengalensis* due to acute toxicity of copper sulphate and *Acacia sinuate*. International Journal of Environmental and Science Education, v. 27, n. 3, p. 8-14. 2008.

KANIMOZHI, V. *et al.* Tributyltin-mediated hepatic, renal and testicular tissue damage in male Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*): a study on impact of oxidative stress. SpringerPlus, v. 5, n. 1, p. 1523. 2016.

KIM, B. S. M. *et al.* Use of a chemometric tool to establish the regional background and assess trace metal enrichment at Baixada Santista–southeastern Brazil. Chemosphere, v. 166, p. 372-379. 2017.

KIM, B. S. M. *et al.* A multivariate approach and sediment quality index evaluation applied to Baixada Santista, Southeastern Brazil. Marine pollution bulletin, v. 143, p. 72-80. 2019.

KIM, B. S. M. *et al.* Geochemical behavior and remobilization potential of trace elements in surface sediments from the baixada santista industrial area, Southeastern Brazilian coast. Journal of Sedimentary Environments, v. 5, n. 4, p. 505-518. 2020.

LAMPARELLI, M. C. *et al.* Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. In: Sistema estuarino de Santos e São Vicente. 142f. 2001.

LINS, J. A. P. N. *et al.* Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. Revista Acadêmica Ciência Animal, v. 8, n. 4, p. 469-484. 2010.

LINS-DE-BARROS, F. M., & MILANÉS, C. Os limites espaciais da zona costeira para fins de gestão a partir de uma perspectiva integrada. Gestão Ambiental e sustentabilidade em áreas costeiras e marinhas: conceitos e práticas, v. 1, p. 22-50. 2020.

LOPES, M. G. *et al.* Qualidade da água em nascentes do município de Araraquara-SP: uma abordagem utilizando bioindicadores ambientais. Revista Brasileira Multidisciplinar, v. 22, n. 1. 2019.

MACIEL, C. F. Ecotoxicologia comportamental: uma revisão com enfoque na locomoção de invertebrados aquáticos. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Instituto Oceanográfico, University of São Paulo, São Paulo. 72f. 2019.

MAGRIS, R. A. & GIARRIZZO, T. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. Marine Pollution Bulletin, v. 153, p. 110961. 2020.

MAHIQUES, M. M. *et al.* 150 years of anthropogenic metal input in a biosphere reserve: The case study of the Cananéia– Iguape coastal system, southeastern Brazil. Environmental Earth Science. v. 4. n.68. p. 1073-1087. 2013.

MAIER, H. L. Regulação da proteína HSP70 em *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda. 2016. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, University of São Paulo, São Paulo. 43f. 2016.

MALUF, J. C. C. Estudo dos metais traço (zinco, cádmio e chumbo) em duas regiões do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape (SP) sob diferentes pressões antrópicas. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 145f. 2009.

MARCENIUK, A. P. Redescrição de *Genidens barbatus* (Lacépède, 1803) e *Genidens machadoi* (Miranda-Ribeiro, 1918), Bagres Marinhos (Siluriformes, Ariidae) do Atlântico Sul Ocidental. Pap. Avulsos Zool. (São Paulo), São Paulo, v. 45, n. 11, p. 111-125. 2005.

MARQUES, M. N. Avaliação do Impacto de agrotóxicos, em áreas de proteção ambiental, pertencentes a bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape, São Paulo. Uma contribuição à análise crítica da legislação sobre o padrão de potabilidade. Tese de Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear. Universidade de São Paulo. 218f. 2005.

MARQUES, O. A. V. & DULEBA, W. Estação Ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna. In Estação ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna, pp. 386-386. 2004.

MARTINS, C. C. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil): sources and depositional history. Marine pollution bulletin, v. 63, n. 5-12, p. 452-458. 2011.

MARTINS, R. O.; BRAIT, C. H. H & SANTOS, F. F. dos. Avaliação do teor de metais pesados e de parâmetros físico-químicos da água e sedimento do lago Bonsucesso, Jataí-GO. Revista Eletrônica do Curso de Geografia – UFG/REJ, n. 29. 2017.

MENDONÇA, J. T. Characteristics of small-scale fishing on the south coast of São Paulo (Brazil). Boletim do Instituto de Pesca, v. 41, n. 3, p. 479-492. 2015.

MENDONÇA, J. T. *et al.* Diagnóstico da pesca do bagre-branco (*Genidens barbatus* e *G. planifrons*) no litoral sudeste-sul do Brasil: subsídios para o ordenamento. Série de Relatórios Técnicos Instituto de Pesca, v. 56, p. 1-77. 2017.

MERHABY, D. *et al.* Assessment of persistent organic pollutants in surface sediments along Lebanese coastal zone. Marine Pollution Bulletin, v. 153, p. 110947. 2020.

MIGOTTO, A. E. *et al.* Malacofauna marinha da região costeira do Canal de São Sebastião, SP, Brasil: Gastropoda, Bivalvia, Polyplacophora e Scaphopoda. Boletim do Instituto oceanográfico, v. 41, n. 1-2, p. 13-27. 1993.

MIYAO, S. Y. Contribuição ao estudo da Oceanografia Física da região de Cananéia. Universidade de São Paulo. Instituto Oceanográfico, v.1, p. 87. 1997.

MMA - Ministério do Meio Ambiente (2014). Portaria MMA nº 445 de 17/12/2014.

MOORE, J. C. *et al.* Detritus, trophic dynamics, and biodiversity. Ecology letters, v.7, n. 7, p.584-600. 2004.

MORAIS, L. G. & ABESSA, D. PSR framework applied to the coastal management of “Complexo Estuarino-Lagunar Iguape-Cananéia”– CELIC (São Paulo, Brazil), in terms of sanitation and public health. Revista de Gestão Costeira Integrada-Journal of Integrated Coastal Zone Management, v. 14, n. 4. 2014.

MUNIZ, P. *et al.* Heavy metals and as in surface sediments of the north coast of the Río de la Plata estuary: Spatial variations in pollution status and adverse biological risk. Regional Studies in Marine Science, v. 28, p. 100625. 2019

MUTO, E. Y. *et al.* Biomagnificação de mercúrio na teia trófica marinha da Baixada santista (SP). V SBO Oceanografia e Políticas Públicas, Santos, SP, Brasil, p. 5. 2011.

NERO, V. *et al.* Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 63, n. 3, p. 365-377. 2006.

NEVES, R.; BARETTA, J. W. & MATHEUS, M. (Eds.). *Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America*. IST Press, Lisboa. 604f. 2008.

NOVAES, G. H. C. D. F. Atuação dos metais cobre e níquel em tecidos de *Danio rerio*: ênfase para análise de biomarcadores histológicos e histoquímicos da espécie *Danio rerio*. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia. Sorocaba. 86f. 2019.

OLIVEIRA, A. L. L. *et al.* Fitoplâncton como indicadores de zonas estuarinas em sistema deltaico–Costa Equatorial do Atlântico Sul. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Universidade Federal do Maranhão. 100f. 2019.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. *et al.* Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH, and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, v. 74, n. 1, p. 53-69. 2005.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. de *et al.* Histopathological evidence of inorganic Mercury and methyl toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research*, v. 90, n. 3, p. 217-225. 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. de & NARCISO, M. F. Histopathological markers in fish health assessment. *Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems*, p. 206. 2016.

PACHECO, M. & SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European Eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 53, n. 3, p. 331-347. 2002.

PARRON, L. M. *et al.* Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. Embrapa Florestas-Documents (INFOTECA-E). p.69. 2011.

PECORARO, G. D. *et al.* Bioaccumulation of total mercury (THg) in catfish (Siluriformes, Ariidae) with different sexual maturity from Cananéia-Iguape estuary, SP, Brazil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 102, n. 2, p. 175-179. 2019.

PEREIRA, C. D. S. *et al.* Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of the Total Environment*, v. 548, p. 148-154. 2016

PEREIRA NAVARRO, J. A. L. *et al.* Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 469-484. 2010.

PIMENTEL, M. F. Biomarcadores de contaminação aquática em baiacus (*Sphoeroides testudineus*) coletados no estuário do Rio Racoti - CE. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 143f. 2013.

PINHEIRO, M. A. A. *et al.* Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucidae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 185, p. 8273-8285. 2013.

POLETTE, M. & LINS DE BARROS, F. Os desafios urbanos na zona costeira brasileira frente às mudanças climáticas. *Costas*, v. 1, p. 165-180. 2012.

PRÓSPERI, V. A. Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para a análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, USP. 120f. 1993.

PUSCEDDU, F. H. *et al.* Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints. *Environmental Pollution*, v. 232, p. 274-283, 2018.

PUSCEDDU, F. H. *et al.* Estrogen levels in surface sediments from a multi-impacted Brazilian estuarine system. *Marine Pollution Bulletin*, v. 142, p. 576-580, 2019.

RABITTO, I. S. *et al.* Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Duluth, p. 1-10. 2006.

RAINBOW, P. S. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, v. 31, n. 4-12, p. 183-192. 1995.

RAMIRES, M.; BARRELLA, W. & ESTEVES, A. M. Caracterização da pesca artesanal e o conhecimento pesqueiro local no Vale do Ribeira e litoral sul de São Paulo. *Revista Ceciliana*, v. 4, n. 1, p. 37-43. 2012.

RANDI, A. S. *et al.* Histopathological effects of cádmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsorbycan uruguayanael* Eigenmann (Pisces, Athainidae). *Journal Fish diseases*, v. 19, p. 311-322. 1996.

ROBERTS, R. J. *Fish pathology*. London: W.B. Saunders. 472p. 2001.

ROSETY-RODRIGUEZ, M. *et al.* Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate. *Ecotoxicology Environmental safety*, v. 51, p. 223-228. 2002.

SANTOS, D. M. dos *et al.* Distribution of butyltin compounds in Brazil's southern and southeastern estuarine ecosystems: assessment of spatial scale and compartments. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 16, p. 1615216163. 2016.

SANTOS, D. M. S. Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru Mirim, Maranhão. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal – SP. 83f. 2010.

SANTOS, F. R. *et al.* Organic contaminants and trace metals in the western South Atlantic upper continental margin: Anthropogenic influence on mud depocenters. *Marine Pollution Bulletin*, v. 154, p. 111087. 2020.

SANTOS, J. V. N. *et al.* Can Encapsulation of the Biocide DCOIT Affect the Anti-Fouling Efficacy and Toxicity on Tropical Bivalves? *Applied Sciences*, v. 10, n. 23, p. 8579. 2020.

SCHULZ, U.H. & MARTINS-JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brasil. *Brazilian Journal Biology*, v. 61, n. 4, p. 1-8. 2001.

SILVA, A. G. Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores de contaminação aquática. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 74f. 2004.

SILVA, I. F. Envolvimento do receptor α e da peroxidação lipídica nos prejuízos de memória de reconhecimento causados pelo poluente ambiental Tributilestanho (tbt) em camundongos fêmeas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 56f. 2019.

SILVA, M. F. Análise histopatológica de fígado de tilápias (*Oreochromis Niloticus*) expostas ao herbicida 2, 4-D comercial. Tese apresentada para obtenção do grau em Ecologia. Instituto de Biociências – UNESP – Campus Rio Claro. 36f. 2015.

SMA – Secretaria do Meio Ambiente / Coordenadoria de planejamento ambiental (CPLA) – São Paulo (estado). Avaliação ambiental estratégica: dimensão portuária, industrial, naval e offshore no litoral paulista. São Paulo. v.3. 2010.

SOUSA, E. C. P. M. de *et al.* Review of Ecotoxicological Studies of The Marine And Estuarine Environments of The Baixada Santista (São Paulo, Brazil). Brazilian journal oceanography, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 133-147. 2014.

SOUZA, C. A. de. O canraguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), como espécie bioindicadora do estado de conservação de manguezais. Tese (doutorado) pela Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 112f. 2016.

SOUZA, M. R. & BARRELA, W. The popular knowledge about fish at a “caiçara” community of Juréia-Itatins Ecological Station-SP. Boletim do Instituto de Pesca, v.27, n.2, p.123- 130. 2001.

SUGUIO, K. & TESSLER, M. G. Depósitos quaternários de planície costeira de Cananéia-Iguape (SP). Publicação Especial do Instituto Oceanográfico/USP, v.9, p.1-33. 1992.

TANIGUCHI, S. *et al.* Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. Marine pollution bulletin, v. 106, n. 1-2, p. 87-94. 2016.

TAVARES, M. T. M. & DI BENEDITTO A. P. M. Feeding habits and behaviour of Bagre *Genidens barbatus*, two ariid catfishes (Pisces: Siluriformes) from southeastern Brazil. Journal of Threatened Taxa, v. 9, n. 10, p.10771–10775. 2017.

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

VALDEZ DOMINGOS, F. X. Utilização de biomarcadores imunológicos e morfológicos em *Fundulus heteroclitus* (Teleostei, Ciprinodontidae) na avaliação do impacto antropogênico em Pictou, Nova Scotia – Canadá. Curitiba. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Celular, UFPR. 93f. 2001.

VAN DER OOST R.; BEYER J. & VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers. in environmental risk assesement: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 13, p. 57-149. 2003.

VARELA-RAMIREZ, A. *et al.* Cytotoxic effects of two organotin compounds and their mode of inflicting cell death on four mammalian cancer cells. Cell biology and Toxicology, v. 27, n. 3, p. 159-168. 2010.

VIANNA, G. R. *et al.* Biosecurity for fishfarming cage systems due to the highly clogged screen aggravated by *Limnoperna fortunei*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 71, n. 1, p. 314-322.,2019.

VIEIRA, C. E. D. *et al.* An integrated approach in subtropical agro-ecosystems: Active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish. Science of The Total Environment, v. 666, p. 508-524. 2019.

ZHADAN, P. M. *et al.* The effect of environmental pollution, hydrocarbons, and heavy metals on reproduction of sea urchin and bivalves. In: Oceanic and anthropogenic controls of life in the Pacific Ocean. Dordrecht: Springer, p. 267-286. 1992.

ZHAI, T. *et al.* Assessing ecological risks caused by human activities in rapid urbanization coastal areas: Towards an integrated approach to determining key areas of

terrestrial-oceanic ecosystems preservation and restoration. Science of The Total Environment, v. 708, p. 135153. 2020.

WHO, International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva, 1993.