

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



**Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Instituto Chico
Mendes de Conservação da Biodiversidade- PIBIC/ICMBio**

Relatório de Final
Ciclo 2023-2024

**MODULAÇÃO NATURAL DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS
EM *LUTJANUS PURPUREUS* CAPTURADOS NA COSTA NORTE
DO BRASIL: SUBSÍDIO AO MONITORAMENTO DO GRANDE
SISTEMA DE RECIFES DA AMAZÔNIA.**

Nome do(a) estudante de IC: Yasmin Christiny de Aviz Freitas

Orientador(a): Alex Garcia Cavalleiro de Macedo Klautau

Coorientador(a): Rafael Anaisce das Chagas

**Instituição do coorientador: Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisas e
Conservação da Biodiversidade Marinha do Norte – CEPNOR / ICMBio**

BELÉM
JULHO / 2024

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos são gravemente afetados por poluentes químicos de diversas fontes, prejudicando organismos aquáticos, especialmente em ambientes costeiros e marinhos. Nos últimos anos, metodologias como biomarcadores têm sido desenvolvidas para avaliar a integridade ambiental, detectando alterações subletais na biota. O uso de biomarcadores é crucial para o monitoramento ambiental, complementando métodos tradicionais e auxiliando na gestão e preservação de recursos naturais, como o Grande Sistema de Recifes da Amazônia. O objetivo deste estudo foi elaborar um protocolo direcionado a pesquisas que utilizem os biomarcadores bioquímicos em pargo *Lutjanus purpureus* capturados no Grande Sistema de Recifes da Amazônia (GSRA), como forma de utilizar a espécie como biomonitora, possibilitando o monitoramento do ambiente estudado. A amostragem de espécimes foi realizada em embarques mensais de observadores científicos nas frotas que operam na pesca do pargo. Em cada embarque, após a retirada das armadilhas, os peixes amostrados foram crioadestesiados – anestesia pela imersão no gelo –. Após a morte do peixe, determinou-se o comprimento total e o peso individual, codificando e extraindo quatro tipos de tecidos: cérebro, fígado, brânquias e músculos de *Lutjanus purpureus*, sendo armazenado em nitrogênio líquido até o desembarque. Após o desembarque, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Pará – LABECOTOX/UFGA. Em laboratório, as amostras de tecido oriundo de cada local foram pesadas em balança analítica imediatamente antes do preparo das amostras para dosagens bioquímicas. As amostras de peixes foram homogêneas em tampão para vertebrados, determinando posteriormente as proteínas totais utilizando o kit comercial (Doles LTDA, Brasil). Desse modo, o protocolo inicial para análise bioquímica está concretizado. A partir deste ponto, os tecidos estão preparados e prontos para serem utilizados na determinação de biomarcadores. O Grande Sistema de Recifes na Amazônia (GSRA) é uma área com elevado nível de biodiversidade, ainda subestimado. Neste contexto, medidas que possibilitam o monitoramento e avaliação desta área são primordiais para sua conservação, principalmente, devido a intensa pescaria direcionada ao “Pargo” (*Lutjanus* spp.). Assim, os biomarcadores são essenciais pois trazem informações de suma importância para a conservação já que tem uma abordagem eficiente nos estudos de áreas em risco e no impacto ambiental, desse modo tornando se importante para mitigar os impactos e gerar proteção a esses ambientes.

Palavras-chave: Biomonitoramento. Biomarcadores. Protocolo.

ABSTRACT

Aquatic ecosystems are severely affected by chemical pollutants from various sources, harming aquatic organisms, especially in coastal and marine environments. In recent years, methodologies such as biomarkers have been developed to assess environmental integrity by detecting sublethal changes in biota. The use of biomarkers is crucial for environmental monitoring, complementing traditional methods and assisting in the management and preservation of natural resources, such as the Great Amazon Reef System. The objective of this study was to develop a protocol aimed at research using biochemical biomarkers in snapper *Lutjanus purpureus* captured in the Great Amazon Reef System (GSRA), as a way of using the species as a biomonitor, enabling the monitoring of the studied environment. The specimens were sampled in monthly expeditions by scientific observers from fleets operating in the snapper fishery. In each expedition, after removal of the traps, the sampled fish were cryoanesthetized – anesthetized by immersion in ice. After the death of the fish, the total length and individual weight were determined, coding and extracted by extracting four types of tissue were extracted: brain, liver, gills and muscles of *Lutjanus purpureus*, being stored in liquid nitrogen until unloading. After unloading, the samples were transported to the Ecotoxicology Laboratory of the Federal University of Pará – LABECOTOX/UFGPA. In the laboratory, the tissue samples from each location were weighed on an analytical balance immediately before preparing the samples for biochemical assays. The fish samples were homogenized in buffer for vertebrates, and total proteins were subsequently determined using a commercial kit (Dolas LTDA, Brazil). In this way, the initial protocol for biochemical analysis is complete. From this point on, the tissues are prepared and ready to be used in the determination of biomarkers.. The Great Reef System in the Amazon (GSRA) is an area with a high level of biodiversity, which is still underestimated. In this context, measures that enable the monitoring and evaluation of this area are essential for its conservation, mainly due to the intense fishing targeted at “Pargo” (*Lutjanus* spp.). Thus, biomarkers are essential because they provide information of utmost importance for conservation, as they have an efficient approach in the studies of areas at risk and environmental impact, thus becoming important to mitigate impacts and generate protection for these environments.

Keywords: Biomonitoring. Biomarkers. Protocol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de localização dos Grande Sistema Recife da Amazônia (GSRA).....	9
Figura 2. Retirada do apetrecho de pesca (Manzuá) da pesca do pargo praticada na costa norte do Brasil.	10
Figura 3. Determinação biométrica de um indivíduo do pargo sob papel centimetrado conhecido popularmente por “fura-fura”.....	11
Figura 4. Extração de brânquia (A), músculo localizado próximo ao pedúnculo caudal (B) e fígado (C) de pargos.	11
Figura 5. Procedimento de pesagem das amostras de tecido de pargos em balança analítica.....	12
Figura 6. Homogeneização das amostras de pargos.....	12
Figura 7. Retirada do sobrenadante das amostras de tecido após centrifugação.....	13
Figura 8. Preparação de uma placa branca para leitura em espectrofotômetro.....	13

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos Específicos	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Área de estudo	8
4. RESULTADOS	9
4.1 Desenvolvimento do protocolo de amostragem	10
4.2 Protocolo de preparação das amostras para análise bioquímica	12
<i>Preparação de Amostras</i>	12
5. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES	13
6. AGRADECIMENTOS.....	15
REFERÊNCIAS	17

1. INTRODUÇÃO

A nível global, os ecossistemas aquáticos estão sujeitos à ação de poluentes químicos oriundos dos mais diversos tipos de fontes (*p.ex.*, resíduos industriais, esgotos domésticos, agricultura) (AYLAGAS et al., 2018; BIGATTI et al., 2009; HALLETT et al., 2019). Estes efluentes resultam em contaminantes que são deletérios aos organismos aquáticos (CARVALHO-NETA; ABREU-SILVA, 2010; VAN DER OOST et al., 2003). Dos ecossistemas aquáticos, os ambientes costeiros e marinhos são aqueles acometidos de modo mais agressivo, principalmente, devido carregamento dos contaminantes pelos rios e seus afluentes (HALLETT et al., 2019). O impacto das atividades humanas sobre o ambiente e, principalmente, na biota aquática são relatados com frequência em estudos de monitoramento ambiental em todo o mundo (BORJA, 2004; NAMA et al., 2023; VEETIL et al., 2022; YANG et al., 2022).

Nas últimas décadas, diversas metodologias foram desenvolvidas objetivando a avaliação da integridade ambiental dos ambientes aquáticos. Neste contexto, inúmeras ferramentas para se avaliar a sanidade da biota e do ambiente foram desenvolvidas (AYLAGAS et al., 2018; BIGATTI et al., 2009; MONSERRAT et al., 2007; VEETIL et al., 2022; YANG et al., 2022). Contudo, os biomarcadores constituem-se como uma ferramenta eficaz que permitem a detecção de alterações na biota em níveis subletais, atuando como excelente indicador precoce às perturbações ambientais. Isso é possível pois os biomarcadores possibilitam uma leitura de modificações em estruturas ou funções bioquímicas, moleculares, celulares e fisiológicas naturais de um organismo, proveniente da exposição a estressores ambientais ou fontes naturais de estresse (AGUIRRE-MARTÍNEZ et al., 2013; AMORIM, 2003; COOKE et al., 2013; DEPLEDGE et al., 1995). Todas essas características fazem com que o uso dos bioindicadores seja uma excelente ferramenta no monitoramento ambiental, inclusiva em locais de pesca.

Neste contexto, pesquisas que objetivam o monitoramento dos ambientes costeiros e marinhos são importantes, pois criam diretrizes que possibilitam a gestão e preservação dos recursos naturais. As ferramentas desenvolvidas por esses estudos possibilitam a preservação e/ou conservação de ambientes, tais como o Grande Sistema de Recifes da Amazônia (GSRA). Assim, a estratégia de gestão dos impactos associados a esta atividade degradantes pode ser mais efetiva quando se tem conhecimento do ambiente, antes e durante as alterações antrópicas.

Nessa perspectiva, o monitoramento ambiental, com base na utilização de biomarcadores contribui para o diagnóstico prévio da situação dos estresses antrópicos e/ou naturais (WANG et al., 2016). Deste modo, o uso de biomarcadores para avaliar mudanças no meio ambiente, integrada com os métodos tradicionais (*p.ex.*, físico-químicos e dados ecológicos) é essencial no monitoramento, principalmente em ambientes vulneráveis como é o caso GSRA.

Assim como nos métodos tradicionais de monitoramento, as metodologias com biomarcadores utilizam os organismos aquáticos como biomonitores (NUNES et al., 2020). Desta forma, moluscos, crustáceos e peixes estão entre os organismos mais utilizados como biomonitores nos estudos de avaliação dos impactos ambientais (CARVALHO-NETA; ABREU-SILVA, 2010; DEPLEDGE et al., 1995; KAWAKAMI et al., 2023; MONSERRAT et al., 2007; VAN DER OOST et al., 2003). Neste contexto, os peixes caracterizam o grupo de organismos mais utilizados, principalmente devido sua ampla distribuição nos mais diferentes ambientes aquáticos (VAN DER OOST et al., 2003). Além disso, os peixes respondem com facilidade ao estresse ambiental (CARVALHO-NETA; ABREU-SILVA, 2010; HALLETT et al., 2019; MONSERRAT et al., 2007; NUNES et al., 2020; VAN DER OOST et al., 2003).

Partindo do exposto, verifica-se que inexistente um protocolo a ser aplicado a peixes comerciais da pesca praticada na costa norte que analisem os parâmetros de biomarcadores bioquímicos. Assim, o desenvolvimento do protocolo de análise bioquímica em *Lutjanus purpureus* permitirá a utilização desta espécie como biomonitora, objetivando a conservação do GSRA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo é desenvolver um protocolo para determinação dos biomarcadores bioquímicos em *Lutjanus purpureus* capturados no Grande Sistema de Recifes da Amazônia (GSRA), como forma de utilizar a espécie como biomonitora, possibilitando o monitoramento do ambiente estudado.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever o processo de amostragem de *Lutjanus purpureus* para coleta de tecidos (cérebro, fígado, brânquias e músculos);
- Desenvolver o protocolo para determinação dos biomarcadores bioquímicos em *Lutjanus purpureus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A costa Norte do Brasil compreende a região entre a foz do rio Oiapoque, que delimita a fronteira do Brasil com a Guiana Francesa, e a foz do rio Parnaíba, que delimita a fronteira dos estados do Maranhão e do Piauí (EKAU; KNOPPERS, 1999). Estendendo-se por mais de 2.500 km, apresenta a linha da costa bastante heterogênea e altamente instável em termos geomorfológicos em decorrência da erosão e da significativa deposição de sedimentos, que formam planícies alagadas e muitas ilhas (FLORIANI et al., 2004).

Reentrâncias e recortes da linha costeira favorecem a existência de ecossistemas estuarinos, dominados pela vegetação de manguezal, sendo que os estados do Amapá, Pará e Maranhão abrigam a maior área de manguezal contínuo do planeta, responsável pela grande quantidade de nutrientes encontrados em águas marinhas adjacentes, incluindo o Grande Sistema de Recifes da Amazônia (DITTMAR, 1999; FRANCINI-FILHO et al., 2018).

Somente o rio Amazonas descarrega no oceano entre 80.000 e 250.000m³ de água doce por segundo e até 1,4 milhão de toneladas anuais de sedimentos (CURTIN, 1986). A descarga de um volume tão elevado de água doce e sedimentos no ambiente marinho resulta em um sistema altamente energético, que influencia uma série de processos oceanográficos, mas principalmente determina a composição e a distribuição dos recursos naturais da região (COSTA; FIGUEIREDO JR., 1998).

A dinâmica hidrológica da costa Norte é sujeita a grande variação sazonal, influenciada pela descarga do rio Amazonas, pela Corrente Norte do Brasil e por ventos alísios. A Corrente Norte do Brasil, ou Corrente das Guianas, transporta águas da plataforma externa e do talude na direção noroeste, enquanto o ciclo de marés e a pluviosidade fornecem nutrientes para manutenção da fauna demersal (RICHARDSON et al., 1994). A região também sofre influência da bacia do rio Orinoco, sendo que a descarga combinada de água doce dos rios Amazonas e Orinoco forma a “Pluma do Amazonas-Orinoco”, conferindo à região características oceanográficas únicas (GRODSKY et al., 2014).

No cenário descrito, o Grande Sistema Recife da Amazônia (GSRA) é um ambiente de fundo consolidado complexo, formado por organismos vivos, primeiramente

evidenciado por Collette e Rützler (1977). Recentemente, o conhecimento sobre o GSRA foi ampliado por trabalho de exploração realizado por sondas de dragagem (MOURA et al., 2016) e imagens submersas captadas pelo submarino Deep Worker, entre 70 a 250 metros, com estimativas que o Grande Sistema Recife da Amazônia tenha 9.500 km² a de cerca de 56.000 km², sendo composto por recifes mesofóticos típicos, encontrados entre 70 a 220 m de profundidade, construídos principalmente por algas calcárias, esponjas e corais escleractínios (FRANCINI-FILHO et al., 2018; MOURA et al., 2016).

Na plataforma continental média, a grande diversidade de habitats, incluindo algas, rodólitos, esponjas, coral mole e coral negro, tem os limites determinados pela descarga de sedimentos e material em suspensão do rio Amazonas, assim como pelas fortes correntes marinhas (RICHARDSON et al., 1994), sendo a penetração da luz diretamente associada à influência da pluma do rio Amazonas e das águas claras da Corrente Norte do Brasil (FRANCINI-FILHO et al., 2018) (Figura 1).

A amostragem de *Lutjanus purpureus* foi realizada em embarques mensais de observadores científicos nas frotas que operam na pesca do pargo.

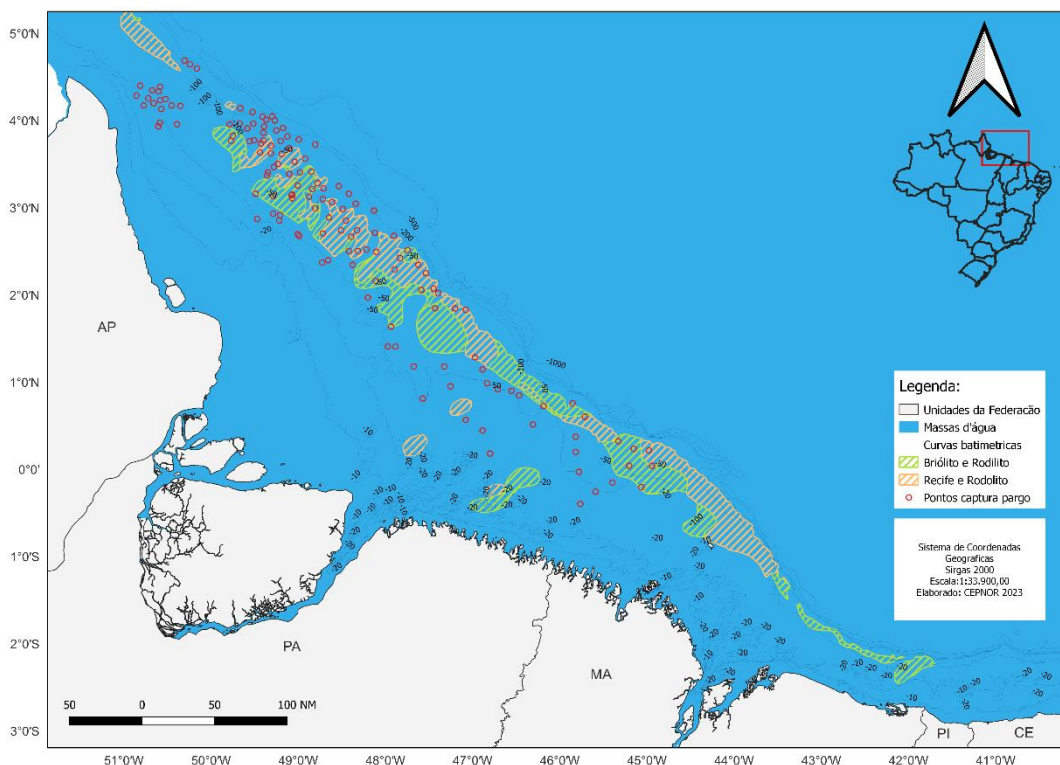


Figura 1. Mapa de localização dos Grande Sistema Recife da Amazônia (GSRA).

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento do protocolo de amostragem

Em cada embarque, após a retirada das armadilhas (Figura 2), os peixes amostrados foram crioanestesiados – anestesia pela imersão no gelo –. Após a morte do peixe, determinou-se o comprimento total e o peso de cada indivíduo (Figura 3), codificando-as e extraíndo quatro tipos de tecidos (cérebro, fígado, brânquias e músculos) de *Lutjanus purpureus* (Figura 4). Após a extração dos tecidos, as amostras são armazenadas em nitrogênio líquido, até o desembarque. Após o desembarque, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Pará – LABECOTOX/UFPA. Em laboratório, as amostras são conservadas em ultrafreezer a -80°C.



Figura 2. Retirada do apetrecho de pesca (Manzuá) da pesca do pargo praticada na costa norte do Brasil.



Figura 3. Determinação biométrica de um indivíduo do pargo sob papel centimetrado conhecido popularmente por “fura-fura”.

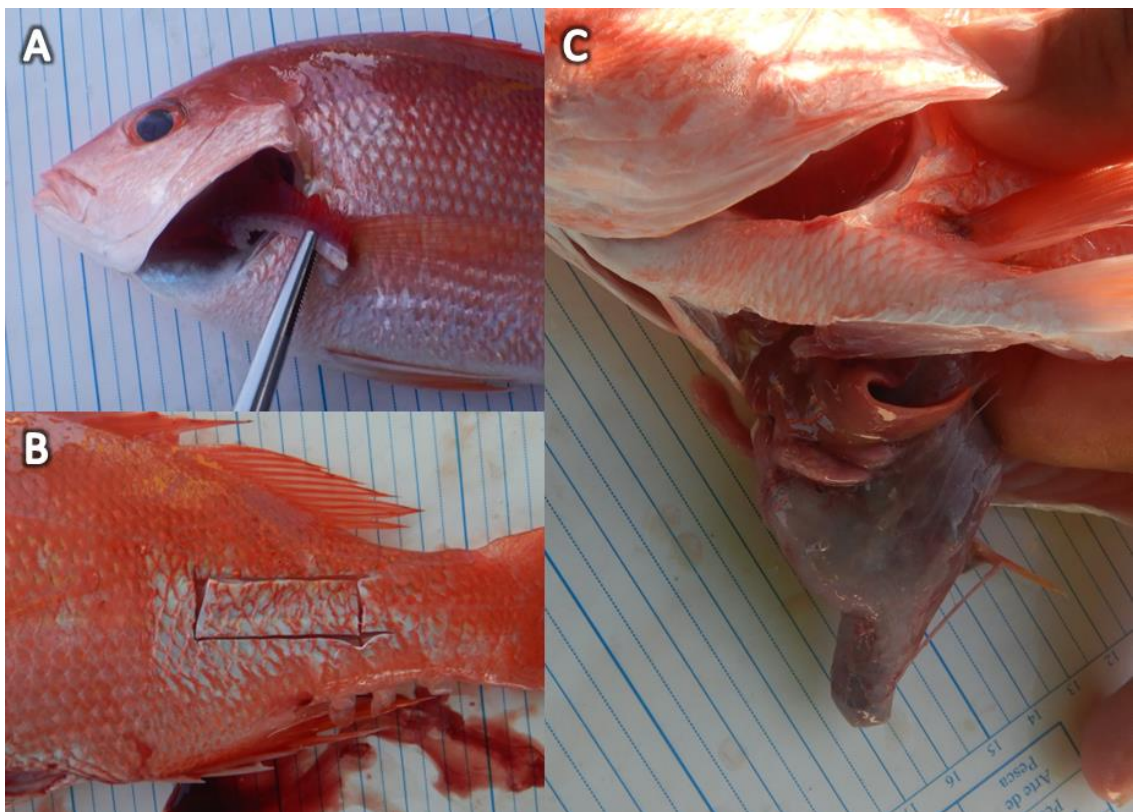


Figura 4. Extração de brânquia (A), músculo localizado próximo ao pedúnculo caudal (B) e fígado (C) de pargos.

4.2 Protocolo de preparação das amostras para análise bioquímica

Preparação de Amostras

Em laboratório, as amostras dos tecidos de *Lutjanus purpureus* foram pesadas em balança analítica imediatamente antes do preparo das amostras para dosagens bioquímicas (Figura 5). As amostras de peixes foram homogeneizada na proporção 1/4 (peso/volume) com tampão de homogeneização para vertebrados e depois centrifugados a 20.000x por 20 min a 4 °C, segundo metodologia de Bainy et al. (1996) (Figura 6). Posteriormente, o sobrenadante será retirado (Figura 7), aliquotado e congelado a -80°C até o momento das dosagens (Figura 8).



Figura 5. Procedimento de pesagem das amostras de tecido de pargos em balança analítica.



Figura 6. Homogeneização das amostras de pargos.

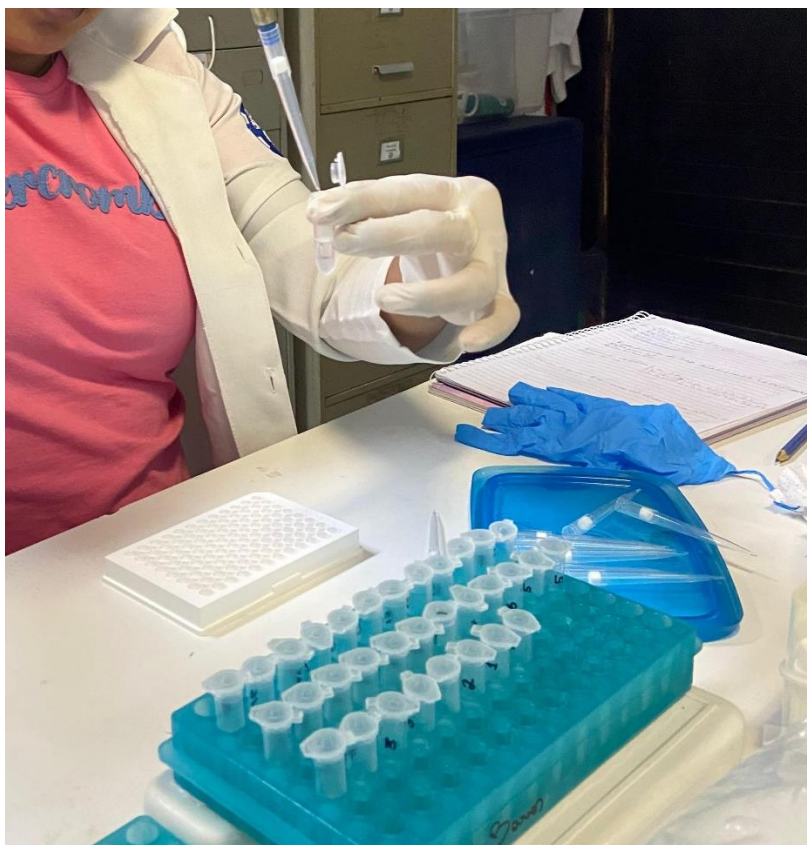


Figura 7. Retirada do sobrenadante das amostras de tecido após centrifugação.



Figura 8. Preparação de uma placa branca para leitura em espectrofotômetro.

Como a pescaria do pargo abrange toda a área do GSRA, é recomendado que as pesquisas realizem amostragens em vários pontos da área, efetuando levantamento das características locais (substrato, temperatura, profundidade, etc.) e seja registradas informações de pesca (período do dia, data, dentre outros).

5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES

O presente estudo tinha como objetivo principal a modulação dos biomarcadores bioquímicos do pargo. Todavia, após as amostragens e procedimentos iniciais realizados, no mês de março do atual ciclo do PIBIC/ICMBIO, o leitor de microplacas multimodal (Victor X3, Perkin Elmer) que seria utilizado na determinação dos biomarcadores bioquímicos danificou-se e desde então encontra-se em manutenção. A análise bioquímica estava sendo realizada em parceria com o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Universidade Federal do Pará. Por conta disso, a solução encontrada para sanar essa problemática foi alterar o objetivo principal do presente estudo. Deste modo, descreveu-se o protocolo de amostragem e procedimentos iniciais para a determinação de biomarcadores bioquímicos do pargo.

Após a aplicação do protocolo descrito no presente estudo, para a estimativa dos biomarcadores bioquímicos em amostras de tecido em pargos é necessária a quantificação das proteínas totais. A análise de proteínas totais é efetuada com kit comercial (Doles Ltda, Brazil) baseado no teste Biureto (citratotrisódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M e sulfato de cobre 0,01M) para proteínas, com leituras realizadas em leitor de microplacas multimodal (Victor X3, Perkin Elmer) a 550 nm. Destaca-se que os resultados são expressos em miligramas de proteínas/ml. Após a determinação das proteínas totais, determinadas os biomarcadores com base no objetivo do estudo.

Abaixo são exemplificados o protocolo de três biomarcadores bioquímicos: Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP), Atividade da Glutathiona-S-transferase (GST) e Peroxidação lipídica (LPO).

A capacidade antioxidante total (ACAP) frente aos radicais peroxil é analisada de acordo com método utilizado por Amado et al. (2009). As leituras são realizadas em leitor de microplacas de fluorescência (485 e 530 para excitação e emissão respectivamente) durante uma hora (Victor 2, Perkin Elmer). Os resultados são expressos como o inverso da área relativa.

A dosagem de Glutathiona-S-transferase (GST) é baseada nos trabalhos de Habig e Jakoby (1981), com leituras expressas em UGST/mg de proteína que representa a quantidade necessária da enzima para conjugar 1 μ Mol de CDNB/min/mg de proteína, a 25°C e pH 7,0. O protocolo utilizado para atividade de Glutamato cisteína ligase e concentração reduzida de glutathiona (GSH) segue o trabalho de White et al. (2003). As leituras são realizadas em espectrofluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer) com leitor de

placas (472 para excitação e 528 para emissão) e resultados expressos em nmol de GSH e atividade de GCL (nmol/min/mg de proteína).

Os níveis de lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (LPO) são determinados pelo método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), seguindo o trabalho de Oakes e van Der Kraak (2003), no qual o malondialdeído (MDA) é quantificado. As leituras são realizadas em leitor de microplacas de fluorescência (515 para excitação e 553 nm para emissão) (Victor ×3, Perkin 108 Elmer), com resultados expressos em nM MDA/g de tecido úmido.

6 AGRADECIMENTOS

Quero expressar agradecer ao ICMBio / CEPNOR por todo suporte e ensinamentos, possibilitando a realização deste estudo. Agradeço também aos pescadores e às empresas que consentiram e colaboraram durante as operações de embarque, contribuindo significativamente para o progresso desta pesquisa. As suas colaborações desempenharam um papel crucial na obtenção de dados e no avanço das análises. Reconheço a importância de suas experiências e conhecimentos, fundamentais para o êxito deste projeto de pesquisa. Agradeço também a minha família e amigos por todo o apoio para que eu pudesse terminar o ciclo 2023/2024.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE-MARTÍNEZ, G.V.; DEL VALLS, T.A.; MARTÍN-DÍAZ, M.L. Early responses measured in the brachyuran crab *Carcinus maenas* exposed to carbamazepine and novobiocin: Application of a 2-tier approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 97, n. p. 47-58, 2013.
- AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, J.L.R.; YUNES, J.S.; MONSERRAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 2115-2123, 2009.
- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. p. 2003.
- AYLAGAS, E.; BORJA, A.; MUXIKA, I.; RODRIGUEZ-EZPELETA, N. Adapting metabarcoding-based benthic biomonitoring into routine marine ecological status assessment networks. **Ecological Indicators**, v. 95, n. p. 194-202, 2018.
- BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 151-162, 1996.
- BIGATTI, G.; PRIMOST, M.A.; CLEDON, M.; AVERBUJ, A.; THEOBALD, N.; GERWINSKI, W.; ARNTZ, W.; MORRICONI, E.; PENCHASZADEH, P.E. Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: from 38S to 54S). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 695-701, 2009.
- BORJA, A. The biotic indices and the Water Framework Directive: the required consensus in the new benthic monitoring tools. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 3-4, p. 405-408, 2004.
- CARVALHO-NETA, R.N.F.; ABREU-SILVA, A.L. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: an in situ study of an estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. p. 2010.
- COOKE, S.J.; SACK, L.; FRANKLIN, C.E.; FARRELL, A.P.; BEARDALL, J.; WIKELSKI, M.; CHOWN, S.L. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science†. **Conservation Physiology**, v. 1, n. 1, p. 2013.
- COSTA, E.A.; FIGUEIREDO JR., A.G. Echo-character and sedimentary processes on the Amazon continental shelf. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 70, n. 2, p. 187-200, 1998.
- CURTIN, T.B. Physical observations in the plume region of the Amazon River during peak discharge—II. Water masses. **Continental Shelf Research**, v. 6, n. 1, p. 53-71, 1986.
- DEPLEDGE, M.H.; AAGAARD, A.; GYÖRKÖS, P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1, p. 19-27, 1995.

EKAU, W.; KNOPPERS, B. An introduction to the pelagic system of the North-East and East Brazilian shelf. **Archive of Fishery and Marine Research**, v. 47, n. 2/3, p. 113-132, 1999.

FLORIANI, D.C.; FUKUDA, J.C.; PINTO, E.F. Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses: o maior campo de dunas costeiras da América do Sul. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 1, n. p. 62,64, 2004.

FRANCINI-FILHO, R.B.; ASP, N.E.; SIEGLE, E.; HOCEVAR, J.; LOWYCK, K.; D'AVILA, N.; VASCONCELOS, A.A.; BAITILO, R.; REZENDE, C.E.; OMACHI, C.Y.; THOMPSON, C.C.; THOMPSON, F.L. Perspectives on the Great Amazon Reef: Extension, Biodiversity, and Threats. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, n. p. 2018.

GRODSKY, S.A.; REVERDIN, G.; CARTON, J.A.; COLES, V.J. Year-to-year salinity changes in the Amazon plume: Contrasting 2011 and 2012 Aquarius/SACD and SMOS satellite data. **Remote Sensing of Environment**, v. 140, n. p. 14-22, 2014.

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In: **Methods in Enzymology**. v. 77. Academic Press, 1981. pp. 398-405

HALLETT, C.S.; TRAYLER, K.M.; VALESINI, F.J. The Fish Community Index: A Practical Management Tool for Monitoring and Reporting Estuarine Ecological Condition. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 15, n. 5, p. 726-738, 2019.

KAWAKAMI, S.K.; MELLO, L.; DERGAN, A.L.; EVANGELISTA, C.; AQUINO, R.F.; MENDES, R.A.; CARMO, A.M.C.; AMADO, L.L. Sedimentary PAH and oxidative stress biomarkers responses on *Namalycastis abiuma* (Polychaeta: Nereididae) from an urbanized Amazon estuary. **Regional Studies in Marine Science**, v. 57, n. p. 102757, 2023.

MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; LUND AMADO, L.; MARTINEZ GASPARGAS MARTINS, C.; LOPES LEÃES PINHO, G.; SOARES CHAVES, I.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1, p. 221-234, 2007.

MOURA, R.L.; AMADO-FILHO, G.M.; MORAES, F.C.; BRASILEIRO, P.S.; SALOMON, P.S.; MAHIQUES, M.M.; BASTOS, A.C.; ALMEIDA, M.G.; SILVA, J.M.; ARAUJO, B.F.; BRITO, F.P.; RANGEL, T.P.; OLIVEIRA, B.C.V.; BAHIA, R.G.; PARANHOS, R.P.; DIAS, R.J.S.; SIEGLE, E.; FIGUEIREDO, A.G.; PEREIRA, R.C.; LEAL, C.V.; HAJDU, E.; ASP, N.E.; GREGORACCI, G.B.; NEUMANN-LEITÃO, S.; YAGER, P.L.; FRANCINI-FILHO, R.B.; FRÓES, A.; CAMPEÃO, M.; SILVA, B.S.; MOREIRA, A.P.B.; OLIVEIRA, L.; SOARES, A.C.; ARAUJO, L.; OLIVEIRA, N.L.; TEIXEIRA, J.B.; VALLE, R.A.B.; THOMPSON, C.C.; REZENDE, C.E.; THOMPSON, F.L. An extensive reef system at the Amazon River mouth. **Science Advances**, v. 2, n. 4, p. e1501252, 2016.

NAMA, S.; SHANMUGHAN, A.; NAYAK, B.B.; BHUSHAN, S.; RAMTEKE, K. Impacts of marine debris on coral reef ecosystem: A review for conservation and ecological monitoring of the coral reef ecosystem. **Marine Pollution Bulletin**, v. 189, n. p. 114755, 2023.

- NUNES, B.; PAIXÃO, L.; NUNES, Z.; AMADO, L.; FERREIRA, M.A.; ROCHA, R. Use of biochemical markers to quantify the toxicological effects of metals on the fish *Sciades herzbergii*: potential use to assess the environmental status of Amazon estuaries. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 24, p. 30789-30799, 2020.
- OAKES, K.D.; VAN DER KRAAK, G.J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 447-463, 2003.
- RICHARDSON, P.L.; HUFFORD, G.E.; LIMEBURNER, R.; BROWN, W.S. North Brazil Current retroflection eddies. **Journal of Geophysical Research**, v. 99, n. C3, p. 5081, 1994.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.
- VEETIL, B.K.; HONG QUAN, N.; HAUSER, L.T.; DOAN VAN, D.; QUANG, N.X. Coastal and marine plastic litter monitoring using remote sensing: A review. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 279, n. p. 108160, 2022.
- WANG, D.; SINGHASEMANON, N.; GOH, K.S. A statistical assessment of pesticide pollution in surface waters using environmental monitoring data: Chlorpyrifos in Central Valley, California. **Science of The Total Environment**, v. 571, n. p. 332-341, 2016.
- WHITE, C.C.; VIERNES, H.; KREJSA, C.M.; BOTTA, D.; KAVANAGH, T.J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 318, n. 2, p. 175-180, 2003.
- YANG, Z.; YU, X.; DEDMAN, S.; ROSSO, M.; ZHU, J.; YANG, J.; XIA, Y.; TIAN, Y.; ZHANG, G.; WANG, J. UAV remote sensing applications in marine monitoring: Knowledge visualization and review. **Science of The Total Environment**, v. 838, n. p. 155939, 2022.
- ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. v. New Jersey: Prentice Hall, 2010. 960 p.