Pontifícia Universidade Católica
do Rio de Janeiro

Regina Fonsêca de Almeida

Caracterização metaloproteômica de bílis de elasmobrânquios do Rio de Janeiro e avaliação do seu potencial como biomarcador de contaminação ambiental

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química ao Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio.

Orientador: Profª. Drª. Tatiana Dillenburg Saint Pierre
Co-orientador: Profª. Drª. Rachel Ann Hauser-Davis

Rio de Janeiro
Março de 2024

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO RIO DE JANEIRO

Regina Fonsêca de Almeida

Caracterização metaloproteômica de bílis de elasmobrânquios do Rio de Janeiro e avaliação do seu potencial como biomarcador de contaminação ambiental

Dissertação de Mestrado
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química ao Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio.

Profª. Tatiana Dillenburg Saint Pierre
Orientadora
Departamento de Química – PUC-Rio

Profª. Rachel Ann Hauser-Davis
Co-orientadora
Instituto Oswaldo Cruz – IOC FIOCRUZ

Prof. Carlos German Massone
Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Marco Aurelio Zezzi Arruda
Instituto de Química – UNICAMP

Profª Cibele Maria Stivanin de Almeida
Centro de Ciência e Tecnologia – UENF

Rio de Janeiro, 06 de março de 2024

Todos os direitos reservados. A reprodução, total ou parcial do trabalho, é proibida sem a autorização da universidade, da autora e do orientador.

Regina Fonsêca de Almeida

Graduou-se em Química pela UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) em 2021. Com ênfase em química analítica, tem experiência em análises relacionadas a contaminações ambientais e desenvolvimento de métodos para análises em nível traço.

Ficha Catalográfica

Almeida, Regina Fonsêca de

Caracterização metaloproteômica de bílis de elasmobrânquios do Rio de Janeiro e avaliação do seu potencial como biomarcador de contaminação ambiental / Regina Fonsêca de Almeida ; orientadora: Tatiana Dillenburg Saint Pierre ; co-orientadora: Rachel Ann Hauser-Davis. – 2024.
75 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2024.
Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Elasmobranchii. 3. Biomarcadores. 4. ICP-MS. 5. SEC-HPLC-ICP-MS. I. Saint'Pierre, Tatiana Dillenburg. II. Hauser-Davis, Rachel Ann. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio

CDD: 540

Aos meus pais, Ademir e Tânia Maria.
Por todo apoio prestado ao longo dos anos.

Agradecimentos

Agradeço aos meus avós maternos, Maria Eunice e Manoel, e paternos, Cosme e José, por terem sido exemplos até mesmo através das histórias que ouvi. Por todo esforço que fizeram ao longo de suas vidas e que me trouxe até aqui. E por, de alguma forma, terem sempre se mostrado presentes de formas inexplicáveis.

Aos meus pais, pelo incentivo incondicional aos meus estudos. É graças a vocês que pude chegar ao final de mais essa jornada com a certeza de que nunca estaria desamparada. E é também pelo esforço de vocês ao longo de todos esses anos que continuo. Vocês são o maior exemplo de superação que eu poderia ter. Amo vocês.

A toda a minha família, por terem me apoiado e ajudado de todas as formas possíveis, direta e indiretamente fazendo com que essa etapa da minha vida fosse um pouco mais fácil.

Às minhas orientadoras, Tatiana Saint Pierre e Rachel Hauser-Davis, por terem confiado em mim durante essa pesquisa, por todos os ensinamentos, conselhos e disponibilidade em me guiar durante esses anos.

Aos meus amigos. Obrigada por terem sido compreensíveis em todas as vezes que neguei algum convite e por terem me forçado a sair de casa quando eu precisava. Obrigada por terem sido ouvidos e ombros todas as vezes que precisei. Obrigada por todas as risadas, viagens, filmes com pipoca, comidas, bebidas, conversas e momentos de silêncio. Eu não teria chegado até aqui sem vocês.

Ao Departamento de Química da PUC-Rio, a todos os funcionários (técnicos, administrativos e professores), doutorandos, mestrandos e ICs que me ajudaram de alguma forma nesse trabalho e em especial ao professor Carlos Massone pela ajuda na análise PCA.

Ao FUNBIO. A realização do Projeto Pesquisa Marinha e Pesqueira é uma medida compensatória estabelecida pelo Termo de Ajustamento de Conduta de responsabilidade da empresa PRIO, conduzido pelo Ministério Público Federal – MPF/RJ.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço pela bolsa de fomento concedida, sem a qual esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Resumo

De Almeida, Regina Fonsêca; Saint Pierre, Tatiana Dillenburg; Hauser-Davis, Rachel Ann. **Caracterização metaloproteômica de bílis de elasmobrânquios do Rio de Janeiro e avaliação do seu potencial como biomarcador de contaminação ambiental**. Rio de Janeiro, 2024. 75 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Os metais e metaloides representam um problema global pela possibilidade de bioacumulação e biomagnificação ao longo de teias tróficas aquáticas. Os elasmobrânquios, grupo taxonômico que inclui as raias e tubarões, são vulneráveis à pesca e poluentes químicos. Poucos estudos avaliaram a presença e os efeitos de metais e metaloides nestes animais e estudos com amostragem não-letal são ainda escassos. Este estudo avaliou o potencial da bílis como biomarcador de contaminação recente em três espécies de elasmobrânquios ameaçados capturados artesanalmente na cidade do Rio de Janeiro, *Gymnura altavela*, *Dasyatis hypostigma* e *Pseudobatos horkelii*. As concentrações de metais e metaloides biliares foram determinadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), as metalotioneínas por espectrometria UV-Vis e as associações entre metais intracelulares e metalotioneínas por cromatografia líquida de alta eficiência com separação por exclusão de tamanho acoplada a ICP-MS (SEC-HPLC-ICP-MS). No geral, Fe apresentou as maiores concentrações (máx. 194,8 mg L^{-1}) e Sn as menores (máx. 0,004 mg L^{-1}), quantificado em apenas cinco indivíduos do total estudado (107). Arsênio e cobre apresentaram maiores médias (10,9 e 5,2 mg L^{-1}, respectivamente) nas amostras de bílis de raia viola, a única espécie capturada em Copacabana. Correlações estatísticas entre as concentrações de metalotioneínas, índices biomorfométricos e concentrações elementares nas frações das amostras de bílis indicam contaminação ambiental e potenciais efeitos sub letais no desenvolvimento e reprodução desses animais. Os resultados obtidos por SECHPLC-ICP-MS indicam diferenças metabólicas nas rotas de destoxificação das diferentes espécies. Conclui-se que o uso de bílis de elasmobrânquios é uma alternativa eficaz e que permite a amostragem não-letal para monitorar a contaminação ambiental recente por metais e metaloides.

Palavras-chave

Elasmobranchii; biomarcadores; ICP-MS; SEC-HPLC-ICP-MS.

Abstract

De Almeida, Regina Fonsêca; Saint'Pierre, Tatiana Dillenburg (Advisor); Hauser-Davis, Rachel Ann. **Metalloproteomic characterization of elasmobranch bile from Rio de Janeiro and evaluation of its potential as an environmental contamination biomarker**. Rio de Janeiro, 2024. 75 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Metals and metalloids can represent a significant global issue, due to the potential for high bioaccumulation and biomagnification along aquatic food webs. Elasmobranchs, a taxonomic group that includes rays and sharks, are highly vulnerable to fishing activities and chemical pollutants. Few studies have investigated the presence and impacts of metals and metalloids in these animals, and studies with non-lethal sampling methods are still scarce. This study evaluated the potential of bile as a biomarker of recent contamination in three threatened species of elasmobranchs artisanally captured in the city of Rio de Janeiro, Gymnura altavela, Dasyatis hypostigma, and Pseudobatos horkelii. Biliary metal and metalloid concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), metallothioneins by UV-Vis spectrometry, and associations between intracellular metals and metallothioneins were investigated by Size Exclusion-High-Performance Liquid Chromatography coupled to ICP-MS (SEC-HPLC-ICP-MS). Overall, Fe presented the highest concentrations (0.7 ± 0.1 mg L^{-1}) and Sn the lowest (max. 0.004 mg L^{-1}), quantified in only five individuals of the total studied (107). Arsenic and copper showed higher averages (10.9 and 5.2 mg L^{-1}, respectively) in bile samples from Brazilian guitarfish, the only species caught in Copacabana. Statistical correlations among metallothionein concentrations, biometric indices, and elemental concentrations in bile fractions suggest environmental contamination and potential sublethal effects on the development and reproduction of these animals. Results obtained from SEC-HPLC-ICP-MS indicate metabolic differences in detoxification pathways among the various species. In conclusion, the utilization of elasmobranch bile is an effective alternative that allows non-lethal sampling for monitoring recent environmental contamination by metals and metalloids.

Keywords

Elasmobranchii; biomarkers; ICP-MS; SEC-HPLC-ICP-MS.

Sumário

1. Introdução 13
2. Revisão bibliográfica 15
2.1 Contaminação dos ambientes aquáticos 15
2.2 Bioindicadores e biomarcadores ambientais 16
2.3 Elasmobrânquios 18
2.4 Captura de elasmobrânquios no estado do Rio de Janeiro 18
2.5 Determinação de elementos químicos em amostras ambientais 19
2.6 Estudos proteômicos e metaloproteômicos 21
3. Objetivos 24
3.1 Geral 24
3.2 Específicos 24
4. Metodologia 25
4.1 Áreas de captura 25
4.1.1 Copacabana 26
4.1.2 Barra da Tijuca 26
4.1.3 Recreio dos Bandeirantes 27
4.2 Coleta e dissecção das raias 27
4.3 Determinação de metalotioneínas 29
4.4 Determinação de metais totais 29
4.5 Análise de proteínas totais 31
4.6 Avaliação de metaloproteínas por SEC-HPLC-ICP-MS 31
4.7 Análises estatísticas 33
5. Resultados e discussão 34
5.1 Fatores bióticos 34
5.2 Metais totais 36
5.3 Metalotioneínas e metais na fração termoestável 51
5.4 Análises por SEC-HPLC-ICP-MS 56
6. Conclusão 64
7. Referências 65

Lista de Figuras

Figura 1 – Imagem representativa das áreas de captura dos animais analisados neste estudo, marcadas em vermelho, preparada através do software ArcGIS Online. 25
Figura 2 – Gráficos de média e desvio padrão dos elementos analisados para os indivíduos das espécies a) *Gymnura altavela,* capturados no Recreio, b) *Pseudobatos horkelii,* capturados em Copacabana, c.1) *Dasyatis hypostigma,* capturados na Barra e c.2) *Dasyatis hypostigma,* capturados no Recreio. 39
Figura 3 – Comparação entre as médias das concentrações dos elementos, entre fêmeas e machos de raia borboleta capturadas no Recreio dos Bandeirantes. 41
Figura 4 – Gráfico de pontos da análise PCA de raias borboleta capturadas no Recreio dos Bandeirantes. 42
Figura 5 – Comparação entre as médias das concentrações dos elementos entre fêmeas e machos de raia viola capturados em Copacabana. 43
Figura 6 – Gráfico de pontos da análise PCA de raias violeta capturadas em Copacabana. 45
Figura 7 – Comparação entre as médias das concentrações dos elementos entre indivíduos de raia manteiga capturados na Barra da Tijuca e Recreio dos Bandeirantes. 46
Figura 8 – Comparação entre as médias das concentrações dos elementos, entre fêmeas e machos de raia manteiga capturadas na Barra da Tijuca e no Recreio dos Bandeirantes. 47
Figura 9 – Gráfico de pontos da análise PCA de raias manteiga capturadas na Barra da Tijuca e no Recreio dos Bandeirantes. 48
Figura 10 – Comparação entre as concentrações dos elementos das amostras brutas e termicamente extraídas para as raias a) *G. altavela*, b) *D. hypostigma* e c) *P. horkelii*. 55
Figura 11 – Cromatograma do mix de padrões das proteínas BSA (67 kDa), ovalbumina (45 kDa), ribonuclease (13,7 kDa) e GSH (0,3 kDa). 56
Figura 12 – Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm associadas a elementos essenciais da espécie *G. altavela*. 57
Figura 13 – Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm associadas a elementos tóxicos da espécie *G. altavela*. 58
Figura 14 – Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm, associadas a elementos essenciais da espécie *D. hypostigma*. 59
Figura 15 – Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm, associadas a elementos tóxicos da espécie *D. hypostigma*. 60
Figura 16 – Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm associadas a elementos essenciais da espécie *P. horkelii*. 61
Figura 17 – Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm associadas a elementos tóxicos da espécie *P. horkelii*. 62

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Dados de coleta das três espécies de raias estudadas, indicando sexo, estágio de maturação, estação do ano e local de coleta. 28
Tabela 2 – Parâmetros instrumentais do espectrômetro de ICP-MS. 31
Tabela 3 – Parâmetros operacionais SEC-HPLC. 32
Tabela 4 – Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos índices biomorfométricos e concentração de MT (µmol mL^{-1}) medidos nas raias borboleta, viola e manteiga, separados por local de captura, sexo, maturação e estação de captura. 35
Tabela 5 – Médias e desvios padrão dos limites de quantificação do método (mg L^{-1}) para os elementos determinados em bílis de elasmobrânquios. 36
Tabela 6 – Concentrações certificadas e determinados (médias ± sd), em mg kg^{-1}, e recuperação, em %, dos elementos nos CRMs. 37
Tabela 7 – Médias, desvios padrão, mínimos e máximos e medianas dos elementos analisados (mg L^{-1}) nas raias borboleta, manteiga e viola. 40
Tabela 8 – Correlações de Spearman entre os elementos analisados e os coeficientes de correlação (ρ) de cada correlação para as raias borboleta, manteiga e viola. Valores de ρ estão apresentados entre parênteses. 49
Tabela 9 – Correlações entre os índices biomorfométricos, FC, IHS e IGS, e os elementos analisados e os coeficientes de correlação (ρ) de cada correlação para as raias borboleta, manteiga e viola. 50
Tabela 10 – Limites de quantificação (mg L^{-1}) para os elementos determinados na análise da fração termoestável de bílis. 51
Tabela 11 – Resultados de concentrações para os diferentes elementos analisados, em mg kg^{-1}, e de recuperações, em %, obtidos para os CRMs, durante a análise da fração termoestável de bílis. 52
Tabela 12 – Correlações entre metalotioneína e os elementos analisados e os coeficientes de correlação (ρ) de cada correlação para as raias borboleta e viola. Os valores de ρ de cada correlação estão apresentados entre parênteses. 53
Tabela 13 – Correlações entre os índices biomorfométricos, FC, IHS e IGS, e os elementos intracelulares analisados e os coeficientes de correlação (ρ) de cada correlação para as raias borboleta e viola. Os valores de ρ de cada correlação estão apresentados entre parênteses. 54
Tabela 14 – Tempo de retenção das bandas de cada elemento e as espécies que apresentaram tais picos ligados a proteínas. 63

Lista de Abreviações

BSA – Albumina bovina sérica, do inglês *Bovine serum albumin*

CRM – Material de referência certificados (do inglês *Certified Reference Material*

CT – Comprimento total

FC – Fator de condição

GHS – Glutationa reduzida, do inglês *Reduced glutathione*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

IGS – Índice gonadossomático

IHS – Índice hepatossomático

IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza, do inglês *International Union for Conservation of Nature*

LQ – Limite de quantificação

MT – Metalotioneina

PCA – Análise de componentes principais, do inglês *Principal Component Analysis*

SD – Desvio padrão, do inglês *Standard deviation*

SEC – Cromatrografia por exclusão de tamanho, do inglês *Size Exclusion Chromatography*

TR – Tempo de retenção

1. Introdução

O meio aquático sofre com a poluição proveniente de diversas fontes, como erupções vulcânicas e lixiviação de solos e contaminantes agregados através das chuvas, sendo, porém, a maior parte e a mais preocupante poluição originária de ações antropogênicas (Santos-Echeandía et al., 2021). As altas concentrações de poluentes neste compartimento ambiental se tornaram um problema crônico mundial, tanto para os animais que vivem nesse ambiente, quanto para os humanos consumidores finais dessa cadeia alimentar (Khan et al., 2023; Lozano-Bilbao et al., 2020; Olmedo et al., 2013; Sun et al., 2022).

Entre os contaminantes de maior preocupação estão os metais e metaloides, que podem apresentar alta capacidade de bioacumulação e biomagnificação, compreendendo os processos de aumento da concentração de certos contaminantes ambientais em um determinado nível trófico e o seu aumento de um nível trófico para outro mais alto, respectivamente. Dentre estes contaminantes, os elementos tóxicos são aqueles que apresentam toxicidade em qualquer concentração, enquanto os elementos essenciais, que participam de processos fisiológicos necessários ao bom funcionamento do organismo, se tornam tóxicos acima de certas concentrações (Lozano-Bilbao et al., 2020).

Diversos estudos demonstram que muitos metais e metaloides causam efeitos deletérios significativos para o ambiente aquático, levando a alterações na biota, como deformações físicas, e processos de desenvolvimento alterados em diversos animais, como peixes (Lopes et al., 2019; Payne et al., 2000; Rolim et al., 2020; Rowe et al., 2002). Contudo, o principal foco de estudos realizados sobre metais e metaloides em peixes ainda compreende, em sua grande maioria, avaliar potenciais riscos para o consumo humano (Araújo & Cedeño-Macias, 2016; Maciel et al., 2021; Olmedo et al., 2013; Rodrigues et al., 2015; Santos-Echeandía et al., 2021), sendo ainda escassos estudos acerca da saúde de animais expostos.

Entre os animais marinhos de grande importância estão os elasmobrânquios, grupo taxonômico que inclui as raias e tubarões (Heupel et al., 2014). A União Internacional para Conservação da Natureza (do inglês *International Union for Conservation of Nature* – IUCN) classifica boa parte destes animais como vulneráveis ou ameaçados de extinção (Cruz et al., 2021), com raias e tubarões somando 37 % do total de espécies ameaçadas de extinção no mundo atualmente

(IUCN, 2023). Sofrendo constante declínio populacional devido a suas características, esse grupo tem como principal ameaça à manutenção de suas espécies as atividades pesqueiras não monitoradas e a poluição de seu habitat (Lessa et al., 2005). Classificados como mesopredadores e predadores de topo de cadeia, esses animais estão mais expostos a capturas irregulares de pesca e a diversos tipos de poluentes devido a certas características, como longas expectativas de vida e baixa fecundidade, entre outras (Ferretti et al., 2010; Rolim et al., 2020; Walker, 2011).

Alguns estudos têm focado em entender possíveis efeitos em elasmobrânquios causados pela presença ou por altas concentrações de metais e metaloides nos órgãos desses animais (De Boeck et al., 2001; Grosell et al., 2003; Hauser-Davis et al., 2020a, 2022; Lopes et al., 2019; Martins et al., 2022; Rodrigues et al., 2022; Somerville et al., 2020; Veron et al., 2022; Wosnick et al., 2021). Neste contexto, porém, há muito ainda a se compreender acerca dos processos de destoxificação de metais nesses animais (Hauser-Davis, 2020b), e estudos que levem ao esclarecimento de novas rotas bioquímicas são de extrema importância. Porém, apesar dos esforços realizados até o momento para entender os efeitos deletérios que estes contaminantes causam às raias e tubarões, as amostragens são conduzidas em sua maioria apenas após a morte desses animais, e estudos aplicando amostragens não-letais são ainda escassos e pouco abrangentes (Ballatori & Boyer, 1986; Madejczyk et al., 2009; Suzuki et al., 1995).

Portanto, este trabalho busca, de forma inédita, avaliar processos de destoxificação de metais e metaloides em elasmobrânquios, por meio da análise da bílis de animais capturados por pescadores na cidade do Rio de Janeiro. Para tanto, foram determinadas as concentrações totais de um grupo de metais e metaloides e avaliada sua presença na forma de metaloproteínas. Este estudo visa auxiliar na validação do uso de bílis como biomarcador de contaminação recente de metais e metaloides em elasmobrânquios.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Contaminação dos ambientes aquáticos

Os contaminantes químicos podem alcançar os ambientes aquáticos, tanto através de fontes naturais quanto por processos antrópicos. Os oceanos podem ser naturalmente contaminados por erupções vulcânicas, lixiviação de solos naturalmente ricos em determinados elementos, ressuspensão e dissolução de sedimentos. Já as causas antropogênicas de contaminação incluem o descarte irregular de resíduos domésticos e industriais, de mineração e das indústrias agropecuárias e farmacêuticas, dentre outros (Akbarzadeh-Chomachaei et al., 2023; Borrell et al., 2023; Mookan et al., 2023).

A classe dos metais e metaloides, importantes contaminantes ambientais, pode ser categorizada em elementos essenciais e não-essenciais. Os essenciais são aqueles que possuem funções bioquímicas em organismos vivos, como em processos metabólicos fisiológicos, de desenvolvimento, maturação e reprodução, (Chouvelon et al., 2022). Já os elementos não-essenciais são aqueles que não possuem nenhuma função benéfica. Entre os não-essenciais existem os elementos tóxicos, que podem afetar de diferentes maneiras e de forma negativa as funções fisiológicas, levando a efeitos mais danosos para organismos de nichos tróficos superiores (Feng et al., 2020). Contudo, em altas concentrações até mesmo os elementos essenciais podem causar desregulações em processos bioquímicos, apresentando toxicidade. Além disso, a presença de certos elementos tóxicos no organismo pode, também, levar a desequilíbrios nos elementos essenciais, afetando suas funções fisiológicas (Xie et al., 2023).

Uma das grandes preocupações acerca dos metais e metaloides é a capacidade que alguns elementos possuem de bioacumular e biomagnificar ao longo das teias tróficas. A bioacumulação é definida como a capacidade dos contaminantes de apresentarem maiores concentrações nos órgãos de animais expostos em comparação com o ambiente ao redor (Borgå, 2008), enquanto o processo de biomagnificação é definido como a capacidade de certos contaminantes de apresentarem maiores concentrações, quanto maior o nível trófico do animal analisado (Drouillard, 2008).

Com relação a elementos essenciais em peixes, podem ser citados o cobalto, cobre, ferro, manganês, selênio e zinco como alguns dos mais importantes

micronutrientes (Jakimska et al., 2011; Rodrigues et al., 2013). Esses elementos apresentam diversas funções nos peixes, sendo a maioria ligada a enzimas de metabolismo, e sua deficiência pode provocar diversos problemas, como mal desenvolvimento, anemia e distrofia, entre outros (Rodrigues et al., 2013). Porém, a presença de elementos, tanto não-essenciais quanto essenciais, em excesso, pode representar sérios riscos aos animais marinhos. Diversos estudos, por exemplo, demonstram que altas concentrações de elementos essenciais, como Co e Fe, podem causar alterações hepáticas em peixes (Wosnick et al., 2021). Já foram reportadas, também, correlações que indicam ligações entre altas concentrações de Cu e Ni e doenças nos rins e fígados destes animais (Moiseenko & Kudryavtseva, 2001). Também existem indicativos de efeitos negativos em gônadas de peixes causados por concentrações subletais de Cu, Pb e Zn (Kumar & Pant, 1984). Já a presença de elementos tóxicos, como mercúrio, pode causar disfunções neurofisiológicas e estresse oxidativo neste grupo, mesmo em concentrações baixas (Rodrigues et al., 2022b). Estes estudos deixam clara a importância de avaliar níveis de contaminações por metais em metaloides na biota marinha a fim de preservar a saúde de ambientes aquáticos.

2.2 Bioindicadores e biomarcadores ambientais

Os bioindicadores são definidos como seres vivos que podem ser utilizados para monitorar determinados ambientes, sendo comumente utilizados para avaliar o nível de poluição dos habitats que habitam. Para um organismo ser considerado um bom bioindicador, é necessário que a espécie apresente correlações entre os níveis de poluição e efeitos fisiológicos, e que as alterações sofridas possam ser generalizadas para o ecossistema em que a espécie se encontra (Marin et al., 2023). Associar a presença e a concentração dos poluentes com os efeitos causados aos animais permite compreender a biodisponibilidade dos contaminantes no meio e seus efeitos aos organismos expostos e, consequentemente, ao ambiente (Lam, 2009).

Já os biomarcadores são empregados para determinar os efeitos causados pelos contaminantes, compreendendo medições de mudanças a níveis moleculares ou celulares causadas por estressores como os poluentes em tecidos ou fluidos corporais. Estas alterações podem ser específicas ou não para cada tipo de contaminante e são uma ferramenta eficaz para medir os efeitos e níveis de

exposição à contaminação, assim como a toxicidade dos poluentes aos animais e ambiente analisados (Freire et al., 2023). As respostas de diferentes biomarcadores podem ser usadas para antecipar futuros problemas, permitindo intervenções para tentar evitar danos irreversíveis ao ambiente analisado (Lemos, 2021).

Para realizar tais estudos, tanto para biomarcadores específicos ou não, são utilizados em sua maioria tecidos que dependem do sacrifício animal, sendo o músculo e o fígado os mais utilizados (Bezerra et al., 2019). Visto a tendência de acúmulo de poluentes nestes órgãos de forma geral, suas respostas são consideradas bons biomarcadores na avaliação de bioacumulação e biomagnificação de contaminantes ambientais, como os metais e metaloides (Fuentes et al., 2023).

As análises não-letais e focadas na exposição recente a contaminantes são, portanto, de grande importância, quando se considera a preservação de espécies e o uso de espécies ameaçadas como bioindicadores. Para isso, pesquisadores têm encorajado o uso do princípio dos 3 Rs (Substituir, reduzir e refinar, do inglês *Replace, Reduce, Refine*), a fim de que novas metodologias não-letais sejam aplicadas em pesquisas sobre animais selvagens (Zemanova, 2020). O uso de biomarcadores não-letais em animais aquáticos ainda é, porém, escasso. Os principais tipos de análises não-letais em peixes, focados em sua maioria em exposição crônica a metais e metaloides, envolvem o uso de sangue e amostras de barbatana (Fossi et al., 2002; Kamunde et al., 2008; Santana et al., 2018; Smith & Whitledge, 2010), embora existam também estudos com biópsias de músculo, pele e brânquias (Thorstensen et al., 2022). Neste sentido, estudos focados na exposição recente a contaminantes ambientais vêm utilizando a bílis como biomarcador (Freire et al., 2023; Hauser-Davis et al., 2012, 2014; Land et al., 2018). Alguns estudos utilizando a canulação hepática para obtenção da bílis *in vivo* e a análise de sua composição em peixes existem na literatura (Grosell et al., 2000; Madejczyk et al., 2009).

Neste contexto, embora estudos ecotoxicológicos com peixes sejam conduzidos há décadas, a maioria é realizada com peixes ósseos, sendo os peixes cartilaginosos, como os tubarões e as raias, denominados de elasmobrânquios, ainda pouco estudados com esse propósito.

2.3 Elasmobrânquios

Os elasmobrânquios, grupo taxonômico que inclui as raias e tubarões, são peixes cartilaginosos que ocupam o meio ou o topo da cadeia alimentar. Estes animais são de extrema importância para manter o equilíbrio dos ambientes em que se encontram (Tiktak et al., 2020). Podem ser encontrados, tanto em regiões costeiras de baixa profundidade quanto em águas mais profundas em alto mar, em todos os oceanos e, devido a algumas de suas características fisiológicas, como maturação lenta e baixa fecundidade, possuem dificuldade para manter seus índices populacionais, frente a sua exploração desenfreada, através da pesca e de outros impactos antropogênicos, como a poluição e a modificação e degradação dos seus habitats naturais (Cruz et al., 2021; Dulvy et al., 2021a).

Existem mais de 1200 espécies de elasmobrânquios descritas até o momento, com pelo menos 163 espécies presentes em águas brasileiras (ICMBio, 2016). O Rio de Janeiro, uma cidade banhada pelo mar, obtém através deste parte da fonte de proteína de sua população, sendo a carne de raias e tubarões parte considerável desse comércio (Amorim & Monteiro-Neto, 2016; da Silva Junior et al., 2008).

Devido a algumas de suas características, os elasmobrânquios são considerados bons bioindicadores ambientais. Estes incluem altas concentrações de poluentes, devido a sua posição trófica (mesopredadores e predadores topos de cadeia), longevidade e ampla distribuição pelos oceanos, sendo encontrados em diferentes níveis de profundidade (Alves et al., 2022).

Para os elasmobrânquios, os estudos não-letais se tornam uma alternativa essencial, frente à necessidade de conservação populacional desses animais, devido às características de vida específicas supracitadas (Hammerschlag & Sulikowski, 2011). Estudos neste sentido são, porém, ainda escassos para este grupo taxonômico, como por exemplo, o uso de bílis para avaliações de contaminação por metais e metaloides (Ballatori & Boyer, 1986; Madejczyk et al., 2009; Suzuki et al., 1995).

2.4 Captura de elasmobrânquios no estado do Rio de Janeiro

Entre as diversas espécies de elasmobrânquios capturados na região costeira da cidade do Rio de Janeiro, as seguintes três são altamente capturadas como pesca acessória, ou seja, de forma incidental, e altamente consumidas no estado do Rio de Janeiro:

A espécie *Gymnura altavela*, popularmente conhecida como raia borboleta, possui hábitos bentônicos, sendo mais comumente encontrada próxima às regiões costeiras, visto que não vivem em grandes profundidades (Bauchot, 1987). Presente no Oceano Atlântico, na região da América do Norte e do Sul e de Portugal até Angola, e no mar Mediterrâneo e no mar Negro, esses animais não realizam longas migrações, possuem expectativa de vida em torno de 18 anos e gestam no máximo oito filhotes por período reprodutivo. Classificada na lista vermelha da IUCN como Ameaçada, essa espécie tem como suas principais ameaças a pesca artesanal e industrial e a destruição de seu habitat natural (Dulvy et al., 2021b).

A espécie *Dasyatis hypostigma*, popularmente conhecida como raia manteiga, também habita áreas próximas às regiões costeiras, tendo hábitos bento-pelágicos, sendo mais encontrada em fundos arenosos de pouca profundidade. É distribuída pelo sudoeste do Oceano Atlântico, estando presente entre o sudeste brasileiro até o sul de Buenos Aires (Cousseau et al., 2007). Tem expectativa de vida em torno de 12 anos, com gestação máxima de dois filhotes por período reprodutivo, e é também classificada como Ameaçada pela IUCN (Pollom et al., 2020a).

Nativa da região do sudoeste do Oceano Atlântico, entre o Rio de Janeiro e o norte da Argentina, a espécie *Pseudobatos horkelii*, popularmente conhecida como raia viola, também habita regiões rasas, possuindo hábitos bentônicos (Compagno, 1999). Os animais dessa espécie podem viver até 28 anos, tendo a possibilidade de gerar até 12 filhotes por período reprodutivo, apresentando hábitos migratórios de curta distância, indo de águas mais profundas para águas mais rasas para a reprodução. É classificada como Criticamente Ameaçada pela IUCN e, apesar de existirem planos de ação de conservação da espécie, esta é fortemente ameaçada pela pesca intencional da espécie para comercialização, pesca esportiva e destruição do seu habitat natural (Pollom et al., 2020b).

2.5 Determinação de elementos químicos em amostras ambientais

Os elementos químicos podem ser determinados através de diversas técnicas analíticas. A forma de análise é escolhida por meio de critérios, como a matriz da amostra, os níveis de concentração dos analitos, a compatibilidade entre solventes e os equipamentos disponíveis (Jackson & Punshon, 2015).

Amostras ambientais biológicas normalmente têm matrizes complexas e, portanto, análises diretas de materiais sólidos não são comuns. Nesse caso, é mais comum utilizar a extração dos analitos por meio da decomposição da amostra com uso de ácidos (Pemberthy et al., 2021; Terrazas-López et al., 2016; Willmer et al., 2022; Yee-Duarte et al., 2020). Com isso, são mais utilizados equipamentos compatíveis com amostras líquidas.

Entre as técnicas utilizadas para análises elementares em amostras ambientais, as espectrométricas são a maioria. Em estudos com análises de tecidos ou fluidos de animais marinhos, as técnicas espectrométricas mais aplicadas são a absorção atômica de chama (do inglês *Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, F AAS), absorção atômica com forno de grafite (do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, GF AAS), fluorescência de Raio-X (do inglês *X-Ray Fluorescence Spectrometry*, XRFS), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS) (Alves et al., 2023; Araújo & Cedeño-Macias, 2016; Barrera-García et al., 2012; Hauser-Davis et al., 2022; Olmedo et al., 2013; Sampaio et al., 2018; Turoczy et al., 2000; Zaoui et al., 2023).

De maneira geral, cada uma dessas técnicas apresenta uma faixa de trabalho adequada para diferentes aplicações analíticas e, também, algumas particularidades, que as tornam a melhor opção em determinados casos. Entre as espectrometrias de absorção atômica (AAS), tanto a de chama quanto a de forno de grafite realizam análises monoelementares (Jackson & Punshon, 2015). Portanto, apesar de serem consideradas técnicas sensíveis e seletivas, o caráter monoelementar é uma limitação que leva a um maior tempo de análise, se houver interesse em mais de um analito (Bakirdere et al., 2011). Já a técnica de XRFS, além de multielementar, possui a vantagem de poder ser usada para amostras sólidas, porém apresenta uma sensibilidade mais limitada que as demais técnicas (Bakirdere et al., 2011).

As técnicas com plasma indutivamente acoplado (ICP) têm a vantagem da rapidez, por serem técnicas multielementares, possibilitando a determinação de diversos elementos em questão de minutos. As amostras, quando líquidas, passam por um processo de nebulização e são carreadas, através de um gás auxiliar, para o plasma, onde os analitos serão atomizados ou ionizados (Shi & Chance, 2008).

Na técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), teremos a medição de radiação emitida pela transição do átomo saindo do estado excitado para um estado de menor energia, onde cada comprimento de onda específico corresponde a um átomo, permitindo assim a diferenciação e quantificação dos elementos (Bakirdere et al., 2011). Enquanto na técnica de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), é medida a razão carga/massa dos íons, que são separados através de um campo magnético. Nesta técnica é possível, inclusive, medir diferentes isótopos de uma mesma espécie de átomo, permitindo que a técnica seja utilizada em estudos de especiação(Mounicou et al., 2009).

Uma das principais diferenças entre as técnicas de ICP OES e ICP-MS, está nos limites que podem ser alcançados, com a última podendo alcançar limites de detecção de até sub-nanograma por litro (ng L^{-1}). Isso torna a técnica de ICP-MS mais atrativa para análises ambientais de monitoramento, visto que essa técnica pode ser utilizada para determinação de elementos químicos em uma ampla faixa de concentrações, desde elementos majoritários até o nível de traços. Além disso, a técnica de ICP-MS apresenta a possibilidade de acoplamento com outras técnicas, como as técnicas de separação, aumentando a possibilidade de análises que podem ser realizadas (Bakirdere et al., 2011; Brenner, 2017).

2.6 Estudos proteômicos e metaloproteômicos

A proteômica, de forma geral, visa estudar as proteínas e suas interações, funções, produção, estrutura e estabilidade (Anderson & Anderson, 1998). Já a área de metaloproteômica estuda o papel, transporte, armazenamento e absorção de metais e metaloides associados a proteínas (Shi & Chance, 2008).

Entre as diversas proteínas estudas nessa área, estão as metalotioneínas (MT) (Mounicou et al., 2009). As metalotioneínas são proteínas ricas em cisteína, de baixa massa molecular (entre 6 e 7 kDa), com capacidade para se ligar a metais e metaloides (Stillman, 1995). Responsável por parte dos processos de regulação homeostática de metais essenciais (Kägi, 1991), as MTs também têm o papel de proteção contra espécies reativas de oxigênio e destoxificação de metais e metaloides (Davis & Cousins, 2000). Portanto, as MTs podem ter diferentes funções, a depender de sua isoforma e dos metais e metaloides a que estão ligadas,

podendo apresentar inclusive funções diferentes, a depender do tecido ou órgão em que se encontram (Roesijadi, 1992).

Estudos relativos a MTs e demais metaloproteínas são realizados a partir de alguma etapa de separação e purificação, visto a complexidade das amostras biológicas, apresentando em sua forma *in natura* uma mistura de proteínas. A partir da purificação térmica, é possível obter amostras que apresentam MTs sem modificações e eliminar proteínas indesejadas de alto peso molecular (Tenório-Daussat et al., 2014). Além disso, as proteínas termoestáveis estão presentes no compartimento subcelular dos organismos e os metais e metaloides ligados a elas apresentam maior biodisponibilidade (Wallace & Luoma, 2003). É também devido a esse fator que os elementos presentes nessa fração solúvel apresentam maior capacidade de alterar a bioquímica dos órgãos (Hauser-Davis et al., 2021a, 2022).

Assim, com o avanço dos estudos dessa área, as metaloproteínas, incluindo as MTs, começaram a ser mais profundamente investigadas como biomarcadores (Hauser-Davis et al., 2017). Para avaliar de maneira precisa as diversas isoformas das metaloproteínas e suas ligações com os metais, são utilizadas diferentes técnicas analíticas. O tipo de técnica utilizada depende não só do tipo de análise que será realizada, mas também do preparo prévio, ou não, das amostras.

Podem ser utilizadas técnicas para amostras com proteínas purificadas, como a cristalografia de raio-X, ou para amostras com misturas de proteínas, utilizando técnicas hifenadas para separação de proteínas e determinação dos elementos (Mounicou et al., 2009). Contudo, o processo de purificação e separação de proteínas pode levar a perda de analito e erros de determinação, contaminação de amostras, entre outros problemas.

Uma forma de diminuir as etapas de purificação e separação de proteínas de amostras complexas é através das técnicas hifenadas. Elas são bastante utilizadas, principalmente em estudos de especiação, estando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS) como uma das técnicas mais utilizadas nesse tipo de estudo (Haraguchi, 2004; Shi & Chance, 2008). Há diversos tipos de técnicas cromatográficas que podem ser utilizadas para separar inclusive diferentes isoformas de uma mesma proteína, como as MTs por exemplo. Para tal, é possível

utilizar cromatografias de troca iônica, de fase reversa ou por exclusão de tamanho (do inglês *Size Exclusion Chromatography*, SEC) (Prange & Schaumlöffel, 2002).

Técnicas como a de SEC-HPLC-ICP-MS permitem a análise de amostras complexas, pois através dela é possível realizar a separação de proteínas de diversos tipos de amostras, de forma robusta e reprodutível (Szpunar, 2005). Há diversos estudos que visam entender como os metais e metaloides estão ligados às metaloproteínas e como a presença de cada um desses elementos pode interferir no metabolismo dos demais. Estudos de metaloproteínas de fígado de ratos, utilizando SEC-HPLC-ICP-MS, por exemplo, reportaram metais, como Cu, Zn e Cd, ligados a proteínas de diferentes pesos moleculares, indicando também que altas concentrações de Fe podem interferir no metabolismo de outros elementos (Zhang et al., 2009). Análises de metaloproteínas em mexilhões também mostram que muitas proteínas pertencentes a esta classe apresentam a função de destoxificação de metais e metaloides, ligados a proteínas de alto e baixo peso molecular, incluindo as metalotioneínas (Lavradas et al., 2016). Existem outros diversos estudos que utilizam a técnica de SEC-HPLC-ICP-MS para análise da ligação de metais e metaloides com metaloproteínas, avaliando suas funções na destoxificação e homeostase de elementos tóxicos ou essenciais em excesso e as modificações provocadas pela poluição ambiental nas proteínas e suas ligações (Gonzalez-Fernández et al., 2010; Mason & Storms, 1993; Monteiro et al., 2020). Entretanto, esse tipo de estudo nunca foi realizado em elasmobrânquios, verificando-se, assim, uma lacuna de conhecimento a respeito das rotas de destoxificação de metais e metaloides de tubarões e raias.

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o potencial da bílis como biomarcador de contaminação recente por elementos químicos, através de técnicas espectrométricas elementares, proteômicas e cromatográficas, em três espécies de elasmobrânquios ameaçados, capturados frequentemente pela pesca artesanal na cidade do Rio de Janeiro, a saber, raia borboleta *(Gymnura altavela),* raia manteiga (*Dasyatis hypostigma*) e raia viola *(Pseudobatos horkelii)*.

3.2 Específicos

- Determinar as concentrações de elementos tóxicos e essenciais em bílis das três espécies de elasmobrânquios, na forma bruta e extraída termicamente, avaliando também as diferenças entre as concentrações totais e as concentrações presentes na fração termoestável;
- Determinar as concentrações de metalotioneínas e proteínas termoestáveis presentes nas amostras de bílis das três espécies de elasmobrânquios e avaliar possíveis correlações entre essas proteínas com as quantidades elementares presentes na fração total e na fração termoestável;
- Investigar o comportamento metaloproteômico da bílis das três espécies de elasmobrânquios, através da técnica de HPLC-ICP-MS, para avaliar possíveis ligações entre as proteínas e diferentes elementos tóxicos e essenciais.

4. Metodologia

4.1 Áreas de captura

As regiões de captura dos elasmobrânquios estudados comportam as praias de Copacabana, Barra da Tijuca e Recreio dos Bandeirantes (Figura 1). São áreas localizadas na costa da região metropolitana do Rio de Janeiro, com grande importância para a economia local, sendo a principal fonte de renda para os pescadores artesanais da cidade (Júnior, 2012; Susin, 2019). A pesca artesanal é marcada pelo uso de pequenas embarcações, baixa ou nenhuma tecnologia empregada para detecção e captura de cardumes e áreas de pesca próximas à costa. Normalmente, as associações de pescadores são formadas por familiares e a profissão é passada através das gerações (da Silva Junior et al., 2008).

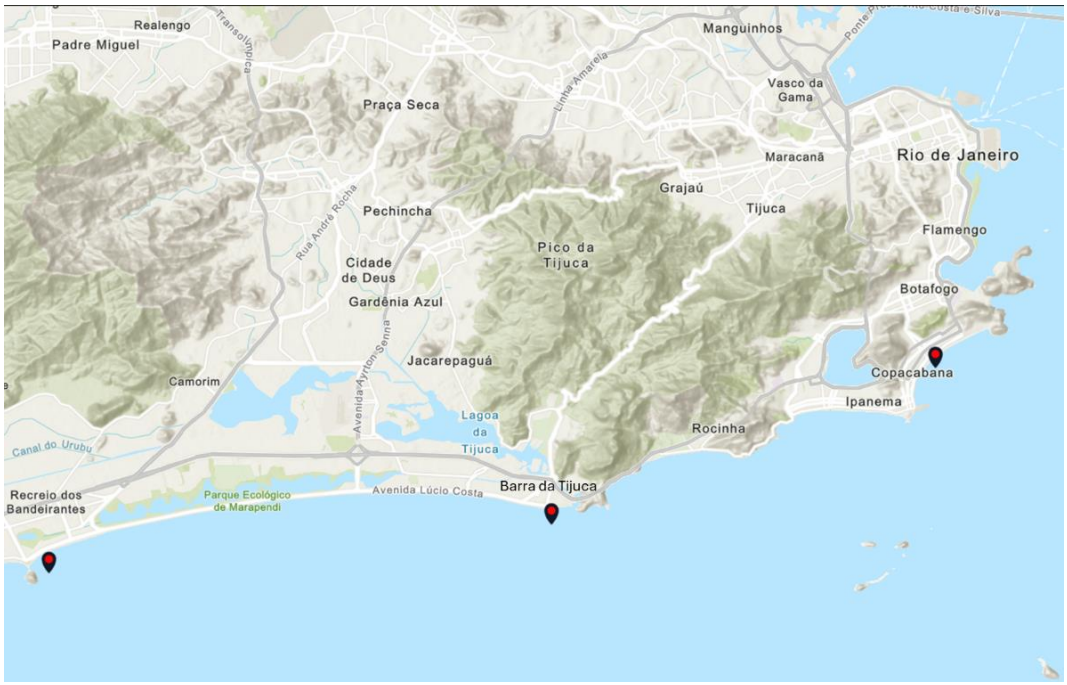

Figura 1. Imagem representativa das áreas de captura dos animais analisados neste estudo, marcadas em vermelho, preparada através do software ArcGIS Online.

Os pontos de coleta estão posicionados próximos aos dois emissários submarinos da cidade, que ficam localizados nos bairros de Ipanema e da Barra da Tijuca. Apesar de serem uma forma de tratamento de esgoto doméstico, os emissários submarinos do Rio de Janeiro foram construídos para uma cidade de menor aporte, recebendo atualmente um volume de rejeito maior do que a

capacidade de tratamento das estações de água (Magalhães, 2020). Além disso, a região costeira do Rio de Janeiro é extremamente populosa, sofrendo com a poluição de veículos, indústrias e descartes irregulares que chegam aos mares.

4.1.1 Copacabana

A praia de Copacabana, localizada na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro, tem aproximadamente 3,5 km de extensão e encontra-se entre as latitudes 22º59’8’’ S e 22º57’58’’ S e longitudes 43º11’17’’ O e 43º10’22’’ O. Próxima à Baía de Guanabara e área de grande biodiversidade (Loto et al., 2018), Copacabana é também uma região populosa, sendo um dos principais pontos turísticos da cidade. No bairro também fica localizada a colônia de pescadores Z-13, ativa desde 1923, organização responsável pelo comércio de peixes local. Dentro da área de pesca da colônia está localizada uma área de proteção ambiental marinha, o Monumento Nacional das Ilhas Cagarras, e, também, o emissário submarino de Ipanema (Amorim & Monteiro-Neto, 2016).

4.1.2 Barra da Tijuca

A praia da Barra da Tijuca está localizada na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro, começando próximo ao elevado do Joá e findando-se próximo à Praia do Recreio dos Bandeirantes. Suas latitudes estão entre 23º0’54’’ S e 23º1’22’’ S e longitudes 43º17’52’’ O e 43º26’49’’ O. Em 2019, foi estimado que a região administrativa da Barra da Tijuca possui mais de 390 mil habitantes (Prefeitura da cidade do Rio de Janeiro, 2019).

Esta região é cercada por shoppings, prédios residenciais e comerciais, vias urbanas e expressas, sendo uma das principais conexões entre os bairros da Zona Oeste com a Zona Sul da cidade. Além de toda a influência recebida por ser um bairro populoso, é também na praia da Barra da Tijuca que está localizado um dos emissários submarinos da cidade, com capacidade máxima de descarte de 5,3 $m^3 s^{-1}$ (Macena et al., 2023). Apesar de tudo, a pesca de pequeno porte é forte na região, contando com a Associação dos Pescadores Livres e Amigos da Barra da Tijuca e Adjacências (Apelabata), colônia de pescadores localizada na Praia dos Amores, próximo ao elevado do Joá.

4.1.3 Recreio dos Bandeirantes

O bairro do Recreio dos Bandeirantes, também localizado na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro, conta com suas praias entre as latitudes 23º1’23’’ S e 23º1’59’ S e longitudes 43º26’50’’ O e 43º28’13’’ O. Possuindo mais de 3 km de extensão, é considerado o bairro com as praias mais limpas da cidade (RioTur, 2023). Tendo como principais fornecedores de pescado do bairro a Associação de Pescadores do Recreio dos Bandeirantes (APREBAN), a área costeira dessa região apresenta uma grande biodiversidade, incluindo diversos elasmobrânquios em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo grande parte da captura marcada por indivíduos neonatos e juvenis (da Silva Junior et al., 2008).

4.2 Coleta e dissecção das raias

Os indivíduos das três espécies de raias analisadas neste estudo, raia borboleta *(Gymnura altavela),* raia manteiga (*Dasyatis hypostigma*) e raia viola *(Pseudobatos horkelii)* foram coletados por pescadores artesanais nas praias da Barra da Tijuca, Copacabana e Recreio dos Bandeirantes. Como a pesca é realizada de maneira não-direcionada, as espécies são identificadas primeiramente pelos próprios pescadores, e a quantidade de indivíduos de cada espécie, sexo, maturação e estação de coleta é irregular. Os animais foram transportados para o Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz) em caixas de isopor contendo gelo, a fim de manter a integridade das amostras. As raias foram coletadas nos anos de 2021 e 2022, durante as estações secas e úmidas.

Para esse estudo foram coletadas 50 raias borboletas, sendo 18 fêmeas e 32 machos, todas no Recreio dos Bandeirantes. Também foram coletadas 23 raias manteiga, 15 na Barra da Tijuca e oito no Recreio dos Bandeirantes. Entre os indivíduos capturados na Barra estão cinco fêmeas e 10 machos, enquanto, no Recreio foram capturados uma fêmea e sete machos. Em relação às raias viola, foram coletados 34 indivíduos, todos em Copacabana, sendo 14 fêmeas e 20 machos. A Tabela 1 apresenta os dados de coleta por espécie, local de coleta, estação do ano, sexo e estágio de maturação.

Tabela 1. Dados de coleta das três espécies de raias estudadas, indicando sexo, estágio de maturação, estação do ano e local de coleta.

Categoria	Borboleta	Manteiga	Viola
Fêmeas	19	6	14
Machos	31	17	20
Juvenil	5	13	2
Adulto	45	10	32
Estação seca	5	6	34
Estação úmida	45	17	-
Barra	-	15	-
Copacabana	-	-	34
Recreio	50	8	-

Na etapa de dissecção, as espécies das raias foram confirmadas através de chaves taxonômicas específicas disponíveis em Gomes et al. (2020), sexadas, pesadas e medidas. Com estas medidas foram calculados o Fator de Condição (FC), um parâmetro morfométrico indicativo do estado de saúde geral dos animais. Quando possível, também foi realizada a pesagem total do fígado e da gônada de cada indivíduo para que fossem realizados os cálculos dos índices hepatossomático (IHS) e gonadossomático (IGS), representando potenciais distúrbios hepáticos e reprodutivos quando alterados. Os cálculos dos índices FC, IHS e IGS foram realizados segundo Vazzoler (1996), a partir das equações 1, 2 e 3, respectivamente:

$$FC = (PT*100)/CT^3 \qquad \text{Eq. 1}$$

$$IHS = (PF/PT)*100 \qquad \text{Eq. 2}$$

$$IGS = (PG/PT)*100 \qquad \text{Eq. 3}$$

Onde, PT – peso total; CT – comprimento total; PF – peso do fígado; PG – peso da gônada.

Após a retirada do fígado, as amostras de bílis foram extraídas da vesícula biliar com o auxílio de uma seringa de plástico de 3 mL e agulha estéreis, armazenadas em microtubos do tipo Eppendorf estéreis e congeladas a -20 ºC até as análises.

4.3 Determinação de metalotioneínas

Para realizar o isolamento das metalotioneínas (MT) foi empregado o método de extração térmica de Erk et al. (2002). Para isso foram pesados 100 µL (aproximadamente 100 mg) de cada amostra de bílis bruta descongelada, em seguida homogeneizando manualmente as mesmas, em proporção de 3:1 (v/v), em solução tampão de Tris-HCl 20 mmol L^{-1} pH 8,6, fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMFS) 0,5 mmol L^{-1} e β-mercaptoetanol 0,01 %. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 20.000 x g, a 4 ºC por 60 min em centrífuga refrigerada Eppendorf 540R. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos do tipo Eppendorf estéreis, devidamente identificados e levados para aquecimento em termobloco Benfer a 70 ºC por 10 min e, após, novamente centrifugados a 20.000 x g, a 4 ºC por 30 min. Os sobrenadantes termoestáveis foram então recolhidos e utilizados para quantificação de MT, determinação de metais, quantificação de proteínas totais e análise por SEC-HPLC-ICP-MS.

Para a quantificação de MT utilizou-se o método de espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis) baseada na reação de Ellman, a partir da metodologia descrita por Viarengo et al. (1997), utilizando uma curva analítica de glutationa reduzida (GSH). Uma alíquota de cada amostra extraída termicamente e de cada um dos pontos da curva foram transferidos para microtubos do tipo Eppendorf devidamente identificados. A seguir, foram adicionados a esses tubos 50 µL de uma solução contendo 1 mol L^{-1} de HCl e 4 mmol L^{-1} de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e 1,40 mL de uma solução contendo 2 mol L^{-1} de NaCl tamponado com fosfato de sódio 0,2 mol L^{-1}, pH 8,0 e 0,43 mmol L^{-1} do reagente de Ellman (ácido ditionitrobenzóico, DTNB). As amostras foram, então, incubadas no escuro por 30 min e posteriormente as absorvâncias foram medidas em 412 nm utilizando o espectrofotômetro de microplacas INNO (LTek, Portugal). As concentrações de MT foram determinadas assumindo a relação de 1 mol MT = 20 mol GSH, como descrita por Kägi (1991).

4.4 Determinação de metais totais

Para a determinação de metais totais nas amostras de bílis e nas frações termoestáveis extraídas de cada amostra, foi empregada a técnica de ICP-MS. Para tal, foram pesados 100 mg de cada amostra de bílis descongelada ou da fração termoestável, em tubos de polipropileno estéreis tipo Falcon de 15 mL, e

adicionados, a cada amostra, 1 mL de ácido nítrico bidestilado (Vetec, Rio de Janeiro), deixando as mesmas em descanso por pelo menos 12 horas. Após esse período, as amostras foram levadas, nos tubos fechados, para uma chapa de aquecimento a aproximadamente 100 ºC por 4 horas. Posteriormente, ao atingirem temperatura ambiente, as amostras foram avolumadas para 10 mL com água ultrapura (resistividade > 18 MΩ cm, obtida de um sistema Milli-Q, Millipore, Darmstaadt, Alemanha). O mesmo procedimento foi realizado para os brancos, sempre em duplicata, e para os materiais de referência certificados (do inglês *Certified Reference Materials*, CRM), utilizando as massas adequadas indicadas em cada certificado.

Foram utilizados como CRM: BCR 668 (tecido de mexilhão – *mussel tissue*; Comissão Européia), DORM – 5 (músculo de peixe-cachorro – *Dogfish muscle*; National Research Council, Canada), ERM BB-422 (músculo de peixe – *fish muscle*; Comissão Européia) e NIST SRM 2976 (tecido de mexilhão – *mussel tissue*; National Institute of Standards & Technology, USA), a fim de se avaliar a exatidão do método em cada análise.

Pelo menos um isótopo de cada analito foi monitorado, escolhido pela máxima abundância e mínimo de interferências. Os seguintes isótopos foram monitorados: ^{27}Al, ^{107}Ag, ^{75}As, ^{114}Cd, ^{59}Co, ^{65}Cu, ^{57}Fe, ^{202}Hg, ^{55}Mn, ^{60}Ni, ^{208}Pb, ^{85}Rb, ^{82}Se, ^{118}Sn, ^{47}Ti, ^{51}V e ^{66}Zn foram determinados a partir da média de cinco medidas das amostras por ICP-MS (NexIon 300X PerkinElmer, USA), empregando-se calibração externa através da diluição de soluções padrões multielementares e individuais PerkinElmer. Utilizou-se, também, uma solução de Rh a 20 µg L^{-1} como padrão interno, em linha, como forma de correção para possíveis efeitos de matriz. As condições de operação do equipamento são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros instrumentais do espectrômetro de ICP-MS.

Parâmetro	Valor
Potência de radiofrequência	1100 W
Amostrador e Skimmer	Ni
Vazão de argônio do plasma	15 L min^{-1}
Vazão de gás auxiliar	1,0 L min^{-1}
Vazão de argônio de nebulização	1,0 L min^{-1}
Modo de leitura	Peak hopping
Varreduras/leituras	1
Leituras/replicatas	1
Número de replicatas	5

4.5 Análise de proteínas totais

A quantidade de proteínas totais presente na fração termoestável das amostras de bílis, utilizada para calcular quanto de amostra deveria ser levada para a análise por SEC-HPLC-ICP-MS, foi determinada a partir do método de Lowry modificado por Peterson (Peterson, 1977). Este método utiliza uma curva analítica de albumina bovina sérica (BSA) como padrão para quantificação.

Foram transferidos para tubos Eppendorf estéreis 20 µL de cada amostra e diluídos com água ultrapura para 1 mL. Os pontos da curva analítica também foram diluídos de forma a se obter as concentrações adequadas em um volume de 1 mL. Posteriormente, a cada tubo, foram adicionados 400 µL da solução de reação "A", que é composta por carbonato de sódio 10 %, tartarato de sódio e potássio 0,2 %, sulfato de cobre 0,1 %, NaOH 0,8 mol L^{-1} e dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 %. Os tubos foram agitados e deixados descansando por 10 minutos, depois adicionou-se 200 µL da solução de reação "B", composta pelo reagente Follin Ciocalteau diluído 5x com água ultrapura. Os tubos foram novamente agitados e deixados descansando por 30 min no escuro. A análise das amostras foi feita em espectrofotômetro de UV-Vis (UV-M51, Bel Engineering) em 750 nm.

4.6 Avaliação de metaloproteínas por SEC-HPLC-ICP-MS

A avaliação do perfil de interação entre as metaloproteínas e os elementos de interesse foi realizada de forma qualitativa através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, empregando uma coluna de exclusão de tamanho Superdex 75 (GE Healthcare®), acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (SEC-HPLC-ICP-MS).

A fim de manter uma homogeneidade na intensidade dos sinais, foram injetados sempre o total de 40 µg de proteínas por amostra, realizando a diluição com tampão Tris-HCl 0,02 mol L^{-1}, pH 7,4, até o volume de 20 µL (tamanho do *loop* de injeção), quando necessário.

Para determinar quais os tamanhos aproximados das proteínas eluidas, foi utilizado um mix de padrões, contendo albumina bovina sérica (BSA – 67 kDa), ovalbumina (45 kDa), ribonuclease (13,7 kDa) e glutationa reduzida (GSH – 0,3 kDa), nas concentrações de 0,1 mg mL^{-1} para todos os padrões, exceto a GSH que estava na concentração de 0,2 mg mL^{-1}, devido a seu tamanho reduzido em relação aos demais. Como fase móvel, foi utilizada solução-tampão Tris-HCl 0,02 mol L^{-1}, pH 7,4, com vazão de 0,7 mL min^{-1}, e medidas por 60 min. As proteínas foram detectadas através de detector UV nos comprimentos de onda de 254 nm (medida da ligação peptídica entre proteínas) e 280 nm (medida dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano) (Anthis & Clore, 2013), enquanto os elementos foram detectados através de ICP-MS. Os parâmetros de operação do SEC-HPLC são apresentados na Tabela 3, enquanto os parâmetros do ICP-MS foram mantidos nas condições iguais às apresentadas na Tabela 2.

Tabela 3. Parâmetros operacionais SEC-HPLC.

Parâmetro	Valor
Coluna	Superdex™ 75 (GE Healthcare®)
Detector	UV/Vis
Comprimentos de onda	254 e 280 nm
Eluente	Tris-HCl 0,02 mol L^{-1} (pH 7,4)
Vazão	0,7 mL min^{-1}
Volume de injeção (*loop*)	20 µL
Massa de proteína injetada	40 µg

Os gráficos dos resultados foram construídos utilizando o *software* Origin Pro 8.5, sobrepondo os dados de proteínas extraídos do HPLC com os dados elementares extraídos do ICP-MS. O parâmetro utilizado para correta sobreposição dos resultados foi o tempo de corrida das análises.

4.7 Análises estatísticas

Para análise estatística dos resultados, foi primeiro realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk em todos os dados quantitativos apresentados. Observando a não-normalidade dos dados, foram empregados testes não-paramétricos para comparar as medianas intra e interespécies.

Para análise de diferenças significativas de parâmetros entre dois grupos (interespécies), como sexo, estágio de maturação e local de captura, foi empregado o teste t não pareado, para avaliar possíveis diferenças na concentração dos elementos, verificando anteriormente a igualdade ou não da variância dos dados, através do *software* Excel. Também foi realizado o teste de correlação de Spearman para obter a correlação entre os índices biomorfométricos e as concentrações dos elementos estudados em cada espécie, utilizando o *software* GraphPad Prism 8.

Os índices biomorfométricos são correlacionados ao desenvolvimento, através do FC e IHS, e à reprodução, através do IGS. As correlações foram classificadas conforme Bryman & Cramer (2012), variando entre positivas e negativas, classificadas como muito fracas para $r < 0,19$; fracas para $0,20 < r < 0,39$; moderadas para $0,40 < r < 0,69$; fortes para $0,70 < r < 0,89$; e muito fortes para $r > 0,90$, com valor máximo absoluto de 1, sendo consideradas apenas as correlações que apresentaram $p < 0,05$.

Foi empregada, também, uma análise de componentes principais (do inglês *Principal Component Analysis*, PCA), através do *software* R, com o fim de se obter as relações entre os elementos analisados, a quantidade de metalotioneína e os índices biomorfométricos para cada espécie estudada (interespécie). Para tal, os dados em brancos foram substituídos a partir do pacote missMDA, de forma que não interfira na análise (Josse & Husson, 2016) e os dados foram normalizados por Z *score*. Essas correlações foram obtidas através de gráficos de pontos a partir do pacote ggplot.

5. Resultados e discussão

5.1 Fatores bióticos

Para cada espécie de raia estudada foram realizados os cálculos dos índices biomorfométricos (FC, IHS e IGS) e determinada a concentração de metalotioneínas presente na bílis de cada indivíduo. Os índices biomorfométricos têm relação direta entre o peso e o tamanho dos indivíduos (FC), peso do fígado e peso total dos indivíduos (IHS) e peso da gônada e peso total dos indivíduos (IGS) (Vazzoler, 1996). Portanto, é possível realizar associações entre esses índices e a saúde dos animais, permitindo também, relacionar as correlações entre esses fatores com poluentes, indicando possíveis efeitos deletérios desses para a saúde dos animais.

Os dados apresentados na Tabela 4 foram utilizados para estimar as correlações entre esses fatores bióticos com os demais fatores abióticos, a fim de se entender as influências entre os fatores.

Tabela 4. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos índices biomorfométricos e concentração de MT (µmol mL^{-1}) medidos nas raias borboleta, viola e manteiga, separados por local de captura, sexo, maturação e estação de captura.

	FC	**IHS**	**IGS**	**MT**
Borboleta				
Recreio	2,69 ± 0,43 (0,59 - 3,34)	2,26 ± 0,65 (1,06 - 4,72)	0,22 ± 0,09 (0,06 - 0,41)	0,045 ± 0,023 (0,019 - 0,104)
Fêmea	2,74 ± 0,62 (0,59 - 3,34)	2,31 ± 0,47 (1,84 - 3,47)	0,21 ± 0,09 (0,06 - 0,41)	0,032 ± 0,006 (0,026 - 0,040)
Macho	2,67 ± 0,28 (2,05 - 3,24)	2,24 ± 0,73 (1,06 - 4,72)	0,22 ± 0,08 (0,11 - 0,37)	0,049 ± 0,025 (0,019 - 0,104)
Juvenil	2,73 ± 0,30 (2,05 - 3,34)	2,22 ± 0,65 (1,06 - 4,72)	0,21 ± 0,08 (0,06 - 0,37)	0,044 ± 0,021 (0,019 - 0,104)
Adulto	2,16 ± 1,38 (0,59 - 3,14)	2,78 ± 0,38 (2,47 - 3,21)	0,34 ± 0,10 (0,27 - 0,41)	0,049 ± 0,042 (0,025 - 0,098)
Seca	2,85 ± 0,41 (2,41 - 3,24)	2,70 ± 0,97 (1,30 – 3,45)	-	0,048 ± 0,038 (0,025 – 0,104)
Úmida	2,68 ± 0,43 (0,59 – 3,34)	2,22 ± 0,61 (1,06 – 4,72)	0,22 ± 0,09 (0,06 – 0,41)	0,044 ± 0,021 (0,019 – 0,098)
Viola				
	FC	**IHS**	**IGS**	**MT**
Copacabana	0,32 ± 0,05 (0,21 – 0,43)	2,15 ± 0,56 (1,50 – 3,96)	1,03 ± 1,42 (0,13 – 5,93)	0,095 ± 0,060 (0,028 – 0,197)
Fêmea	0,35 ± 0,05 (0,25 – 0,43)	2,27 ± 0,68 (1,69 – 3,96)	1,96 ± 1,92 (0,18 – 5,93)	0,088 ± 0,061 (0,028 – 0,197)
Macho	0,29 ± 0,03 (0,21 – 0,33)	2,07 ± 0,47 (1,50 – 3,24)	0,41 ± 0,21 (0,13 – 0,92)	0,114 ± 0,075 (0,061 – 0,167)
Juvenil	0,32 ± 0,02 (0,31 – 0,34)	1,97 ± 0,27 (1,78 – 2,15)	0,52 ± 0,12 (0,43 – 0,61)	-
Adulto	0,32 ± 0,05 (0,21 – 0,43)	2,16 ± 0,58 (1,50 – 3,96)	1,06 ± 1,70 (0,13 - 5,93)	-
Manteiga				
	FC	**IHS**	**IGS**	**MT**
Barra	0,65 ± 0,21 (0,41 - 0,94)	3,91 ± 1,31 (2,52 - 6,93)	-	0,041 ± 0,020 (0,019 - 0,086)
Recreio	0,67 ± 0,24 (0,36 - 1,02)	3,21 ± 1,30 (0,46 - 4,15)	-	0,060 ± 0,028 (0,030 - 0,114)
Fêmea	0,70 ± 0,24 (0,43 - 0,94)	4,14 ± 1,23 (2,75 - 5,99)	-	0,035 ± 0,010 (0,019 - 0,049)
Macho	0,64 ± 0,21 (0,36 - 1,02)	3,51 ± 1,35 (0,46 - 6,93)	-	0,054 ± 0,026 (0,020 - 0,114)
Juvenil	0,59 ± 0,22 (0,36 - 0,94)	3,99 ± 1,32 (2,52 - 6,93)	-	0,046 ± 0,017 (0,024 - 0,077)
Adulto	0,73 ± 0,19 (0,45 - 1,02)	3,19 ± 1,24 (0,46 - 4,28)	-	0,051 ± 0,031 (0,019 - 0,114)
Seca	0,60 ± 0,18 (0,47 - 0,93)	2,96 ± 1,31 (0,46 - 4,15)	-	0,065 ± 0,032 (0,030 - 0,114)
Úmida	0,67 ± 0,23 (0,36 - 1,02)	3,97 ± 1,25 (2,52 - 6,93)	-	0,042 ± 0,018 (0,019 - 0,086)

5.2 Metais totais

Inicialmente, a fim de avaliar a sensibilidade do método, foram determinados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais para cada elemento, calculados conforme orientação do INMETRO (2020), ou seja, 3x ou 10x (LD ou LQ, respectivamente) o desvio-padrão de 10 medidas de concentração na solução do branco. Os limites de quantificação do método, considerando o fator de diluição da amostra, em mg L^{-1} de amostra, estão apresentados na Tabela 5. Devido aos diferentes dias de análise, o limite de quantificação não foi o mesmo para todas as amostras, portanto são apresentados a média e o desvio padrão (do inglês *Standard Deviation*, sd), dos limites atingidos para cada analito.

Tabela 5. Médias e desvios padrão dos limites de quantificação do método (mg L^{-1}) para os elementos determinados em bílis de elasmobrânquios.

	Al	**Ag**	**As**	**Cd**	**Co**	**Cu**	**Fe**	**Hg**
média	0,02	0,0019	0,01	0,0016	0,0012	0,02	0,7	0,009
sd	0,02	0,0009	0,01	0,0006	0,0008	0,010	0,1	0,003
Mn	**Ni**	**Pb**	**Rb**	**Se**	**Sn**	**Ti**	**V**	**Zn**
0,005	0,01	0,003	0,0014	0,08	0,0029	0,04	0,003	0,07
0,003	0,004	0,001	0,0008	0,03	0,0004	0,01	0,004	0,05

Os níveis de recuperação foram calculados através da análise dos materiais de referência certificados BCR 668, DORM-5 e ERM BB-422 e estão apresentados na Tabela 6, como porcentagem de recuperação das concentrações certificadas. Recuperações consideradas inadequadas (<70 % e >130 %) podem indicar que o elemento estava sofrendo algum tipo de interferência, mesmo através da correção com padrão interno. Elementos com concentrações muito baixas, próximas do LQ, também podem ter valores inadequados devido ao alto desvio padrão. Porém, visto que alguns dos elementos apresentavam apenas valor informado em seu certificado, mais estudos precisariam ser realizados para entender as diferenças de recuperação entre os diferentes materiais.

Tabela 6. Concentrações certificadas e determinados (médias ± sd), em mg kg^{-1}, e recuperação, em %, dos elementos nos CRMs.

	BB-422		
	Valor certificado	Valor encontrado	Recuperação (%)
As	12,7 ± 0,7	12,7 ± 0,5 (11,9 - 13,2)	94 - 104
Cd	0,0075 ± 0,0018	0,006 ± 0,001 (0,0047 - 0,0068)	62 - 90
Cu	1,67 ± 0,16	1,4 ± 0,1 (1,3 - 1,7)	80 - 102
Fe	9,4 ± 1,4	10 ± 1 (8,9 - 12)	95 - 130
Hg	0,601 ± 0,030	0,56 ± 0,03 (0,52 - 0,60)	87 - 100
Mn	0,368 ± 0,028	0,34 ± 0,02 (0,32 - 0,37)	88 - 99
Se	1,33 ± 0,13	1,31 ± 0,09 (1,24 - 1,46)	93 - 110
Zn	16,0 ± 1,1	12,2 ± 0,5 (11,7 - 12,9)	73 - 80
	BCR 668		
	Valor certificado	Valor encontrado	Recuperação (%)
As	7,1 ± 0,5 *	11 ± 10 (5,8 - 8,9)	81 - 125
Cd	0,275 ± 0,011	0,26 ± 0,04 (0,22 - 0,30)	79 - 111
Co	0,31 - 0,36 *	0,33 ± 0,05 (0,27 - 0,45)	81 - 135
Fe	84,7 - 93,5	90 ± 20 (75 - 119)	84 - 134
Zn	70,7 ± 0,4 *	63 ± 19 (49 - 73)	69 - 103
	DORM-5		
	Valor certificado	Valor encontrado	Recuperação (%)
Ag	0,135 ± 0,014	0,127 ± 0,005 (0,123 - 0,133)	91 - 98
As	13,3 ± 0,7	16 ± 2 (14 - 18)	103 - 137
Cd	0,148 ± 0,007	0,15 ± 0,01 (0,13 - 0,17)	87 - 112
Co	0,063 ± 0,004	0,053 ± 0,002 (0,052 - 0,054)	82 - 86
Cu	3,30 ± 0,07	3,2 ± 0,2 (2,8 - 3,4)	86 - 102
Fe	113 ± 8	77 ± 11 (60 - 90)	53 - 80
Hg	0,316 ± 0,017	0,36 ± 0,06 (0,32 - 0,43)	101 - 135
Mn	1,06 ± 0,04	0,8 ± 0,1 (0,7 - 0,9)	61 - 88
Ni	0,44 ± 0,03	0,32 ± 0,06 (0,25 - 0,39)	57 - 89

Pb	0,058 ± 0,006	0,052 ± 0,003 (0,048 - 0,055)	83 - 95
Rb	2,76 ± 0,19	2,4 ± 0,1 (2,2 - 2,5)	80 - 91
Se	2,40 ± 0,11	3,0 ± 0,5 (2,4 - 3,5)	101 - 146
Sn	0,077 ± 0,008	0,06 ± 0,01 (0,06 - 0,07)	76 - 88
V	0,347 ± 0,029	0,41 ± 0,09 (0,30 - 0,49)	86 - 141
Zn	28,7 ± 1,0	28 ± 3 (24 - 31)	82 - 106

*valor informado.

Ao analisar a média da concentração de cada elemento entre as diferentes espécies e seus locais de captura, podemos observar que, embora alguns elementos tenham comportamentos parecidos, outros variam conforme espécie e local. Na Figura 2, é possível ver a amplitude de concentração dos elementos, baseadas em suas médias e desvio padrão.

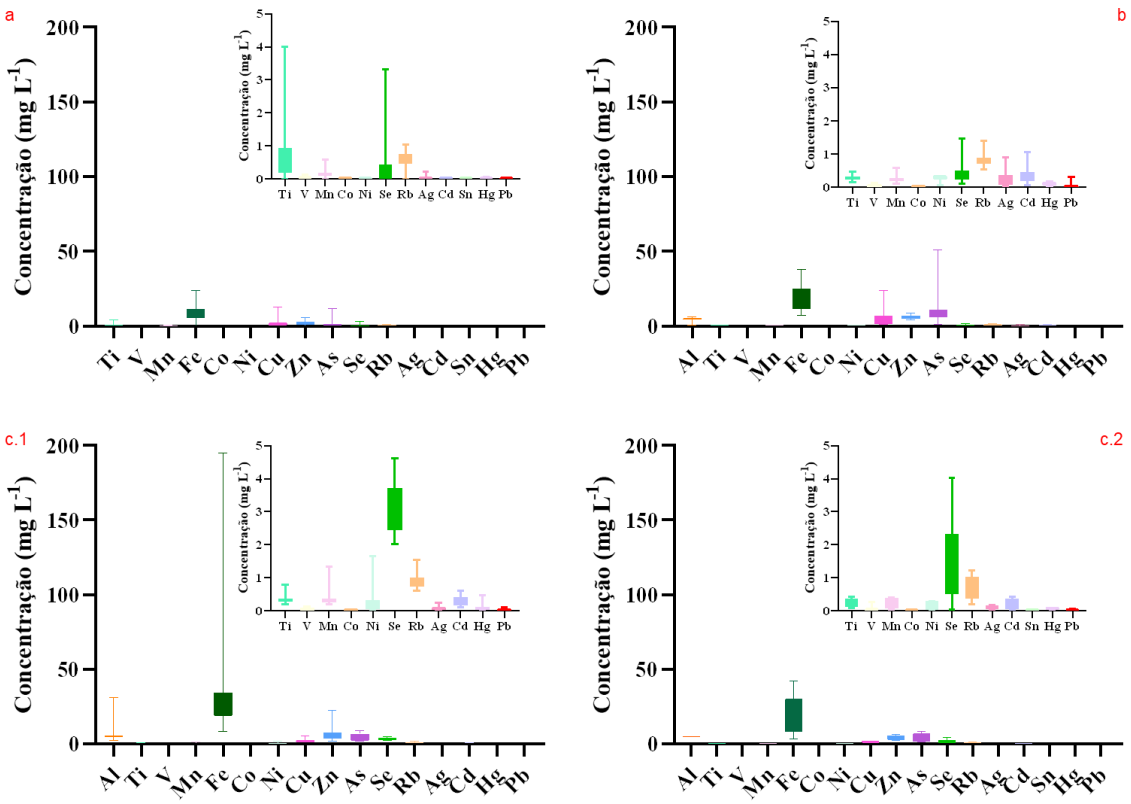

Figura 2. Gráficos de média e desvio padrão dos elementos analisados para os indivíduos das espécies a) *Gymnura altavela*, capturados no Recreio, b) *Pseudobatos horkelii*, capturados em Copacabana, c.1) *Dasyatis hypostigma*, capturados na Barra e c.2) *Dasyatis hypostigma*, capturados no Recreio.

Entre os elementos determinados para as três espécies estudadas, o Fe foi o elemento que apresentou maior concentração média nas amostras de bílis, apresentado também maiores desvios padrão, como apresentado na Tabela 7. Visto que o fígado, órgão ligado diretamente à vesícula biliar, é responsável por processos de destoxificação (Roy & Bhattacharya, 2006), e quando presente em altas concentrações no fígado, o Fe passa por um processo de destoxificação, a fim de manter a homeostase (Hauser-Davis et al., 2019), é esperado que esse elemento apresente também altas concentrações na excreção biliar. Por outro lado, entre os elementos estudados, o Sn foi o de menor concentração, quantificado em apenas cinco indivíduos do total geral estudado, apresentando valores máximos de aproximadamente 0,004 mg L^{-1}. O Sn orgânico é amplamente utilizado em processos de estabilização de PVC, como fungicida e anti-incrustante em tintas de navio (Bennett, 1996). Contudo, esse elemento não se mostrou biodisponível nos locais de coleta. É possível observar também na Tabela 7, que As e Cu apresentaram

maiores médias (10,9 e 5,2 mg L^{-1}, respectivamente) de concentração nas amostras de bílis de raias viola, a única espécie capturada em Copacabana. Já o Al foi detectado na excreção biliar em todas as espécies, exceto nas raias borboleta. Estes dados indicam diferenças de excreção biliar entre as espécies, muito provavelmente devido a diferentes hábitos alimentares, sexo e estágio de maturação, e consequentemente, exposição ambiental aos elementos investigados.

Tabela 7. Médias, desvios padrão, mínimos e máximos e medianas dos elementos analisados (mg L^{-1}) nas raias borboleta, manteiga e viola.

Borboleta								
	Al	**Ag**	**As**	**Cd**	**Co**	**Cu**	**Fe**	**Hg**
média	-	0,04	1,3	0,007	0,005	2,2	9,3	0,03
sd		0,04	2	0,01	0,002	3	5	0,01
mínimo	-	0,004	0,1	0,002	0,001	0,2	3,1	0,009
máximo	-	0,2	11,9	0,03	0,01	13,0	23,6	0,05
mediana	-	0,03	0,6	0,005	0,005	1,4	8,8	0,04
Mn	**Ni**	**Pb**	**Rb**	**Se**	**Sn**	**Ti**	**V**	**Zn**
0,16	0,03	0,01	0,6	0,6	0,004	0,8	0,04	2,2
0,09	0,01	0,01	0,2	0,8	0,001	1	0,03	1
0,03	0,01	0,003	0,006	0,09	0,003	0,1	0,005	0,5
0,6	0,05	0,04	1,0	3,3	0,004	4,0	0,1	5,5
0,1	0,04	0,01	0,7	0,3	0,004	0,3	0,02	2,2
Manteiga								
	Al	**Ag**	**As**	**Cd**	**Co**	**Cu**	**Fe**	**Hg**
média	6,5	0,08	4,5	0,3	0,005	1,8	30,7	0,09
Sd	7	0,05	2	0,2	0,003	1	38	0,1
mínimo	2,0	0,02	1,1	0,009	0,001	0,7	3,4	0,01
máximo	30,7	0,2	8,8	0,6	0,02	5,5	194,8	0,5
mediana	4,8	0,06	4,2	0,2	0,004	1,6	23,0	0,09
Mn	**Ni**	**Pb**	**Rb**	**Se**	**Sn**	**Ti**	**V**	**Zn**
0,3	0,3	0,02	0,9	2,6	0,00389	0,3	0,05	5,9
0,2	0,4	0,03	0,3	1	0,00004	0,1	0,06	5
0,05	0,01	0,004	0,2	0,05	0,004	0,09	0,01	2,0
1,3	1,7	0,1	1,5	4,6	0,004	0,8	0,3	22,5
0,3	0,3	0,01	0,9	2,5	0,004	0,3	0,02	4,6
Viola								
	Al	**Ag**	**As**	**Cd**	**Co**	**Cu**	**Fe**	**Hg**
média	4,7	0,3	10,9	0,4	0,012	5,2	18,2	0,10
sd	0,9	0,2	11	0,2	0,0007	5	8	0,02
mínimo	0,5	0,03	1,2	0,06	0,004	1,2	7,0	0,04
máximo	6,1	0,9	50,9	1,1	0,04	23,5	38,1	0,2
mediana	4,8	0,2	7,7	0,3	0,01	3,1	16,8	0,1
Mn	**Ni**	**Pb**	**Rb**	**Se**	**Sn**	**Ti**	**V**	**Zn**
0,23	0,28	0,04	0,8	0,4	0,0034	0,28	0,04	5,9
0,09	0,06	0,08	0,2	0,3	0	0,07	0,02	1
0,1	0,05	0,005	0,5	0,1	0,003	0,2	0,02	4,1
0,6	0,3	0,3	1,4	1,5	0,003	0,5	0,1	8,5
0,2	0,3	0,01	0,8	0,3	0,003	0,3	0,04	5,7

Entre os metais e metaloides estudados, diversos são essenciais para os peixes, auxiliando em seu desenvolvimento e maturação, dentre outros fatores. Porém, mesmo esses elementos podem se tornar prejudiciais, se presentes em concentrações acima de determinadas concentrações e/ou do equilíbrio natural do ambiente aquático. Metais, como Co, Cu, Fe e Zn, assim como os tóxicos, podem também ser provenientes de poluição, como descartes industriais, atividades portuárias, resíduos eletrônicos, mineração, entre outros fatores (Alorda-Kleinglass et al., 2019; Beyer et al., 2020; Pemberthy et al., 2021).

As concentrações de todos os elementos determinados em fêmeas e machos de raias borboleta foram similares, não apresentando diferenças estatísticas entre cada elemento para os dois sexos (Figura 3). Isto, por sua vez, indica que não há diferenças significativas na excreção desses elementos entre machos e fêmeas dessa espécie.

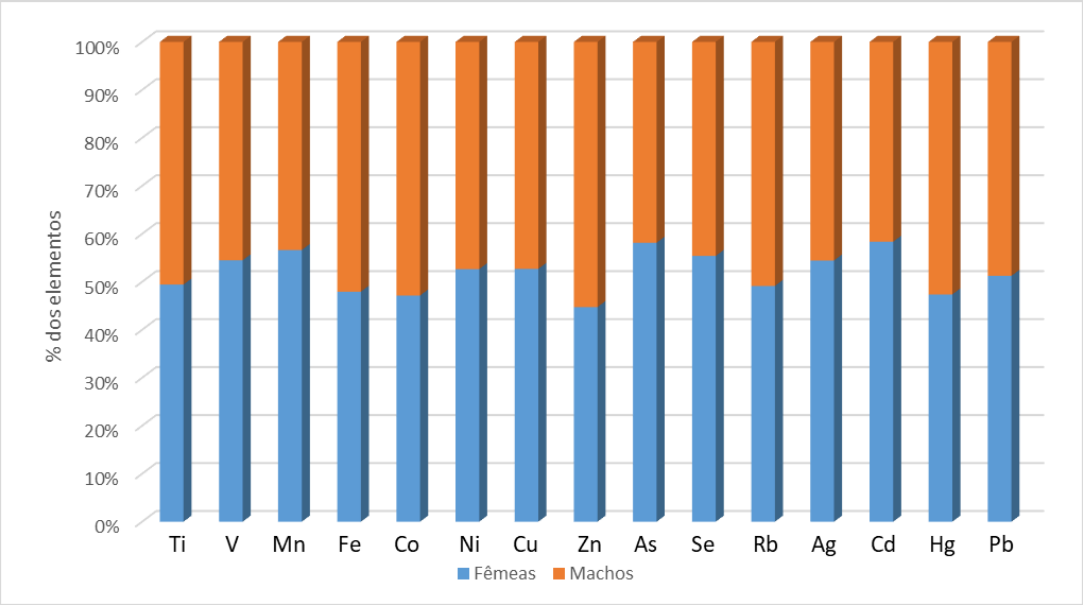

Figura 3. Comparação entre as médias das concentrações dos elementos, entre fêmeas e machos de raia borboleta capturadas no Recreio dos Bandeirantes.

Para analisar a similaridade entre os elementos determinados na bílis das raias borboletas e qual a relação entre os índices biomorfométricos, a quantidade de metalotioneína e as concentrações desses elementos, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA). Através do gráfico de pontos (Figura 4), verifica-

se uma forte similaridade entre grande parte dos elementos analisados, com um grupamento contendo Co, Cu, Fe, Rb, V e Zn, podendo indicar uma mesma fonte de contaminação. Além disso, esse grupamento está, também, em oposição ao comprimento total (CT) e ao IHS, podendo ser uma indicação de que altas concentrações desses elementos afetam o desenvolvimento desses animais e potencialmente levam a distúrbios hepáticos, assim como apresentado nos estudos de Hauser-Davis et al. (2021b) e Wosnick et al. (2021). Também não foi verificada nenhuma diferença significativa de grupamento entre machos e fêmeas dessa espécie para essa colônia de pesca, corroborando os resultados apresentados anteriormente.

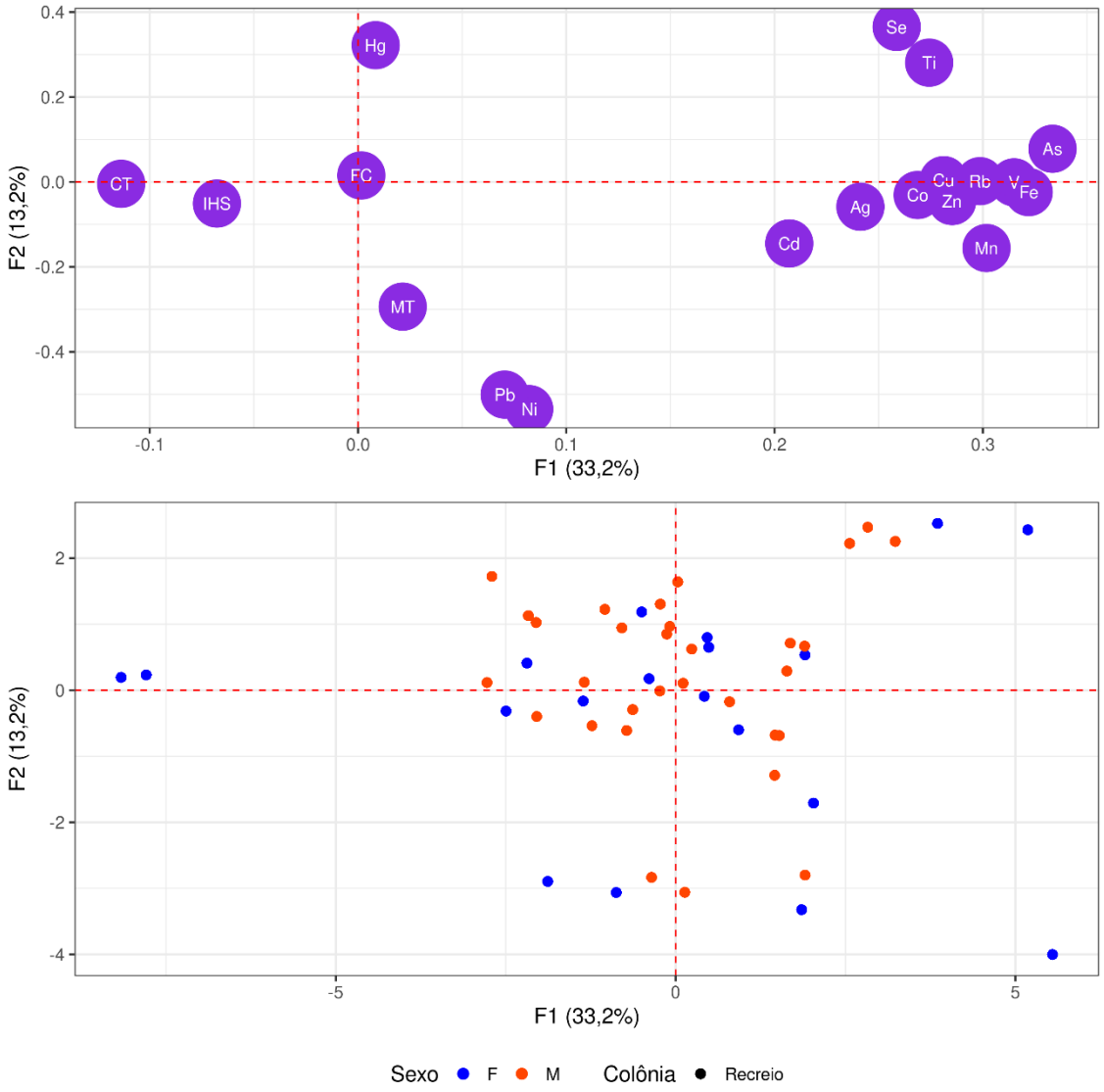

Figura 4. Gráfico de pontos da análise PCA de raias borboleta capturadas no Recreio dos Bandeirantes.

Já entre machos e fêmeas de raias viola foi possível observar diferenças estatísticas nas médias de Cu, As, Se e Ag. Destes elementos, todos apresentaram maiores concentrações em machos (Figura 5), indicando potenciais diferenças metabólicas na excreção desses elementos através da bílis entre fêmeas e machos. São necessários, porém, realizar mais estudos bioquímicos para entender o porquê dessa diferença, porém, visto que a maioria dos indivíduos dessa espécie era composta por adultos durante a estação seca, é possível que ocorram associações com o período reprodutivo. Além disso, estes animais se aproximam da costa para reprodução, estando mais expostos à contaminação costeira, bem como à captura (Pollom et al., 2020).

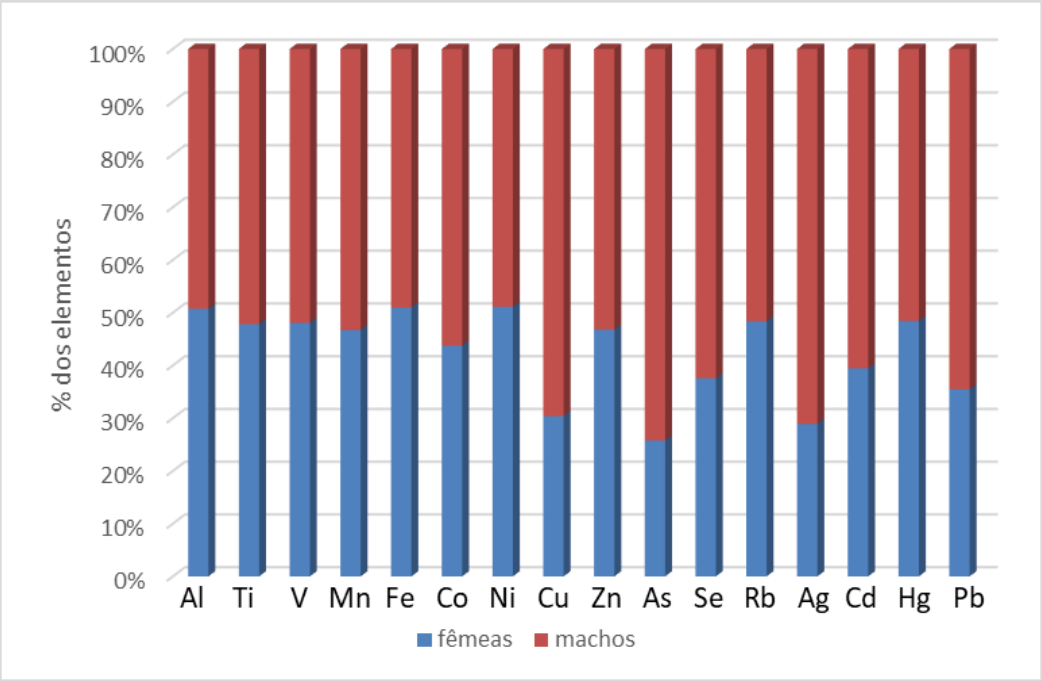

Figura 5. Comparação entre as médias das concentrações dos elementos entre fêmeas e machos de raia viola capturados em Copacabana.

Já na análise PCA foi possível observar fortes similaridades entre As e Pb, Cu e Se, Al e Ni, indicando provavelmente que estes elementos são provenientes de mesmas fontes de contaminação (Figura 6). Verificou-se também que, apesar da maioria dos elementos estudados estarem em oposição aos índices biomorfométricos, Al, Hg e Ni encontram-se mais próximos ao índice IHS, indicando efeitos neste parâmetro biomorfométrico, corroborando com os trabalhos

de Ramos-Osuna et al. (2020) e Wosnick et al. (2021). Além disso, também se observa que há uma certa tendência de grupamento, separando machos e fêmeas, com as fêmeas estando em sua maioria na mesma direção dos índices biomorfométricos, enquanto os machos estão tendendo para a direção dos elementos estudados. Ao observarmos os dados brutos dessa espécie, notamos que as fêmeas apresentam, em média, maiores valores para os índices biomorfométricos, enquanto os machos apresentam maiores concentrações dos elementos. Isso pode indicar uma melhor capacidade das fêmeas em realizar a destoxificação dos elementos tóxicos ou em excesso, possivelmente através de gravidez e ovoposição (Lopes et al., 2019; Lyons & Lowe, 2013), ou a diluição da concentração desses elementos, devido ao fato das fêmeas apresentarem maiores CT que os machos (Kamunde & Wood, 2003).

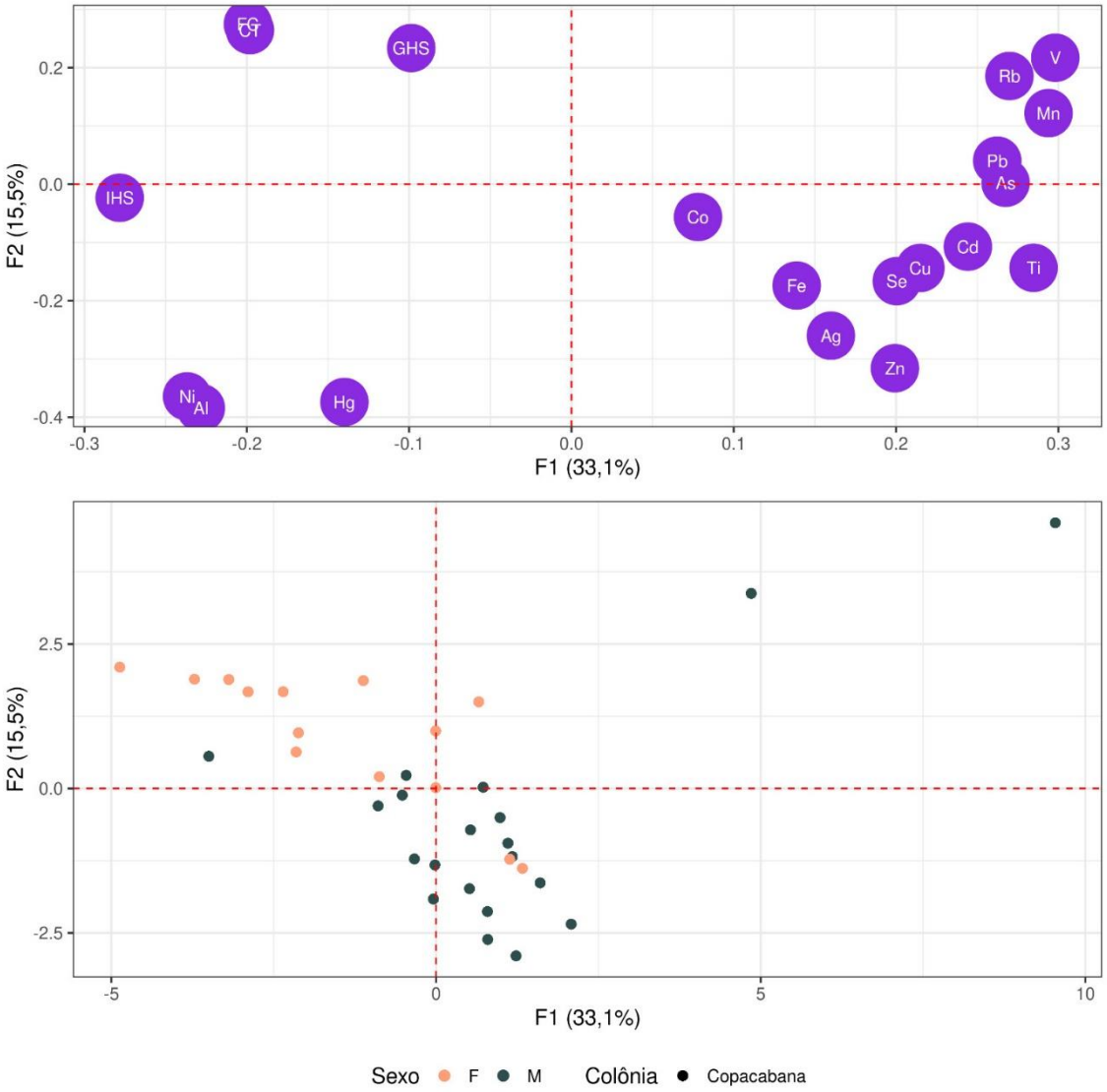

Figura 6. Gráfico de pontos da análise PCA de raias violeta capturadas em Copacabana.

Em relação às raias manteiga, quando comparadas as médias entre os locais de captura, foi possível observar uma diferença significativa na média de Se entre os indivíduos capturados na Barra da Tijuca e no Recreio dos Bandeirantes, com a concentração se mostrando maior nas amostras da Barra (Figura 7). Isso pode ser um indicativo de maior concentração desse elemento na região da Barra da Tijuca, que pode ser proveniente de efluentes ricos em Se (Tan et al., 2016), ou um indicativo de que as raias capturadas nessa região tiveram maior dificuldade para realizar a destoxificação do Se presente em seu organismo. Esta última hipótese pode ser potencialmente relacionada à contaminação por Hg. Em alguns animais, como mamíferos marinhos, o Se pode preferencialmente se ligar ao Hg para

destoxificação através de imobilização em grânulos encontrados, principalmente no fígado, levando a altas concentrações de Se neste órgão e, potencialmente, na bílis (Lailson-Brito et al., 2012; Nigro & Leonzio, 1996). Isto, porém, nunca foi verificado em elasmobrânquios, necessitando de mais estudos para confirmar ou refutar esta hipótese.

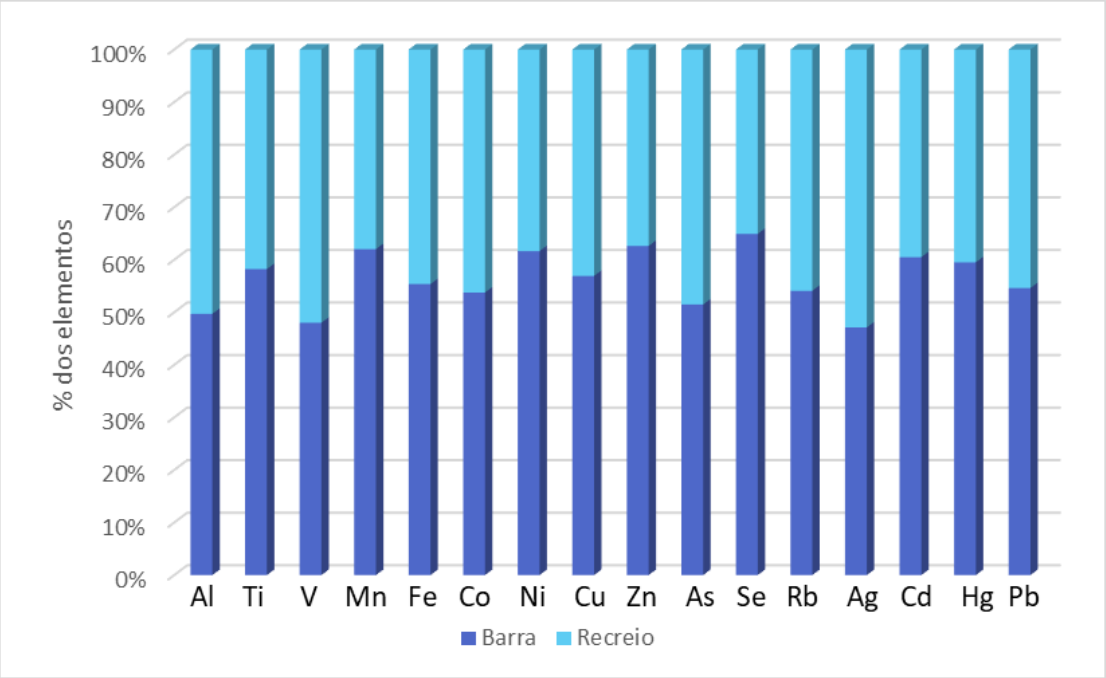

Figura 7. Comparação entre as médias das concentrações dos elementos entre indivíduos de raia manteiga capturados na Barra da Tijuca e Recreio dos Bandeirantes.

Já com relação às diferenças entre machos e fêmeas dessa espécie, apenas As apresentou diferença significativa, com maiores concentrações medidas nas bílis de fêmeas (Figura 8), diferente do que foi observado para as raias viola. Devido ao número de indivíduos capturados, não foi possível realizar essa análise separando machos e fêmeas de raia manteiga, por local. Porém, visto que aparentemente existem diferenças na forma de excreção de um mesmo elemento entre diferentes espécies de diferentes locais, talvez seja possível observar outras diferenças ao se analisar machos e fêmeas de uma mesma espécie, porém capturados em locais diferentes, sendo este um estudo interessante a ser realizado no futuro.

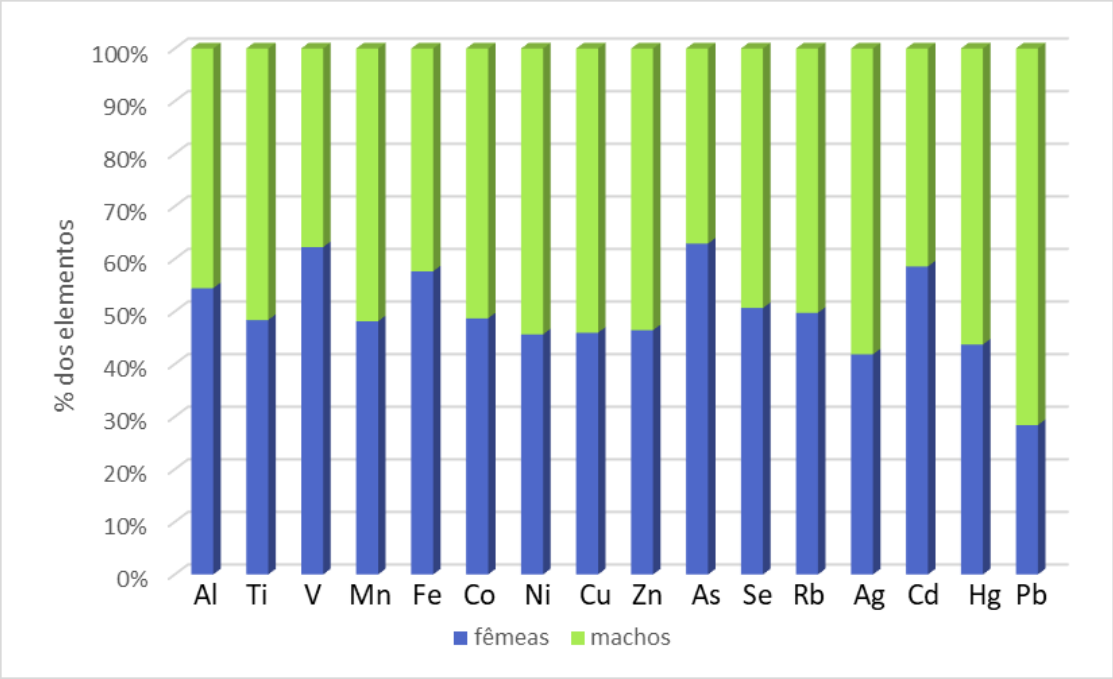

Figura 8. Comparação entre as médias das concentrações dos elementos, entre fêmeas e machos de raia manteiga capturadas na Barra da Tijuca e no Recreio dos Bandeirantes.

Analisando o gráfico de pontos através da PCA para as raias manteiga, verifica-se uma certa dissimilaridade entre machos e fêmeas dessa espécie e entre os locais de captura (Figura 9), e similaridade entre elementos, como Al e Hg, Rb e Co, Mn e Ti, além de entre Cd e IHS. Ao avaliar-se os dados brutos dessa espécie, verifica-se que os indivíduos que apresentam maiores valores de IHS, apresentam também maiores concentrações de Cd, indicando uma relação direta entre este metal e distúrbios hepáticos (Abdelzaher et al., 2022). Além disso, é possível observar novamente que as variáveis dos elementos se encontram em oposição a, pelo menos, um dos índices biomorfométricos e à MT.

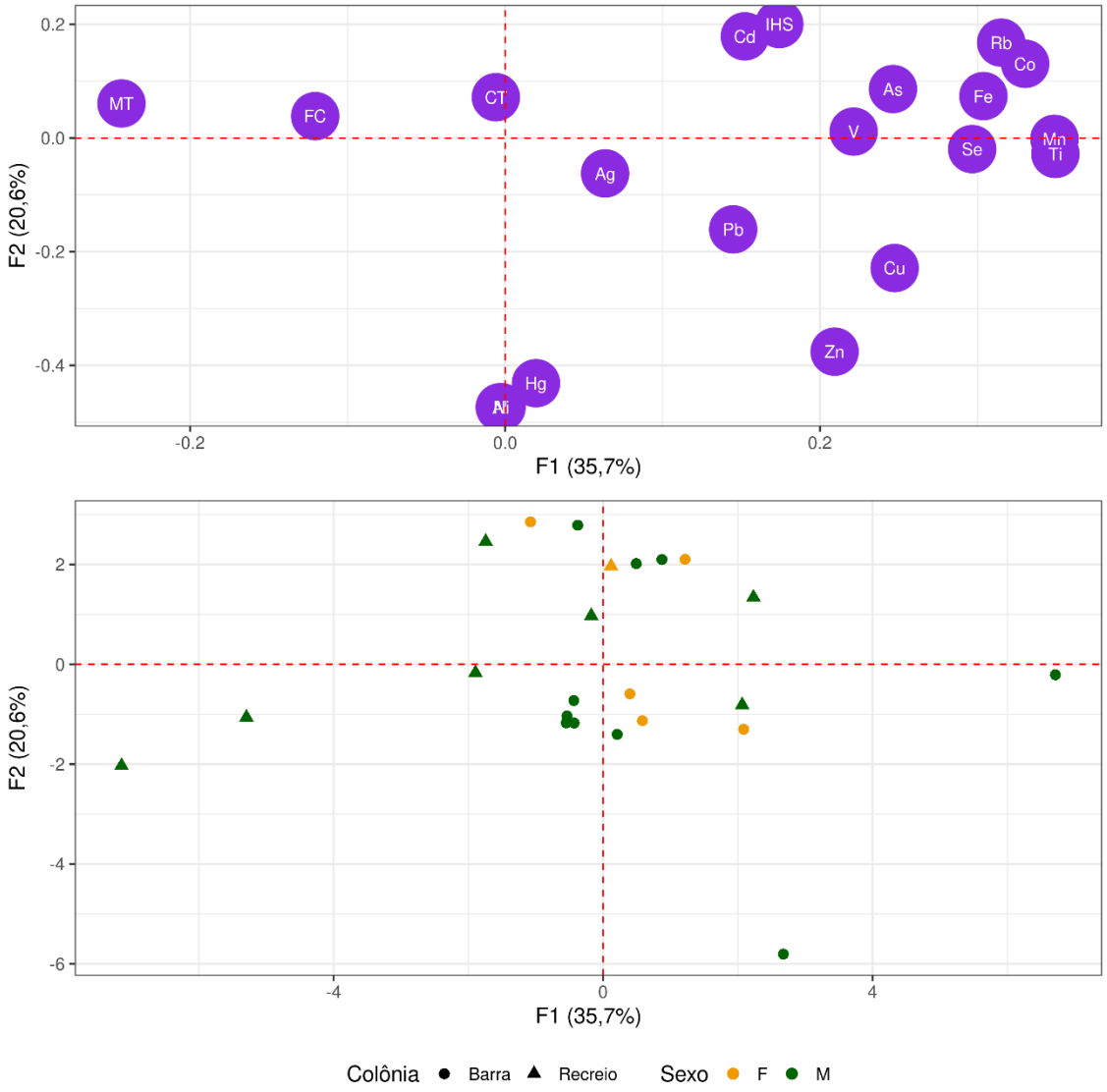

Figura 9. Gráfico de pontos da análise PCA de raias manteiga capturadas na Barra da Tijuca e no Recreio dos Bandeirantes.

Entre os metais e metaloides, podemos observar que a maioria das correlações classificadas entre moderadas a muito fortes são positivas, sendo a maior parte delas de nível moderado. Entre as diferentes espécies e locais de captura é possível verificar algumas correlações se repetindo, principalmente de nível moderado.

Apenas as raias manteiga capturadas no Recreio dos Bandeirantes e as raias viola apresentaram correlações muito fortes, porém nenhuma comum às duas espécies. Já as correlações fortes foram presentes em todas as espécies e locais, sendo também todas positivas (Tabela 8). Essas correlações entre esses elementos podem indicar diversas possibilidades, desde fontes de poluição comuns entre os pares, quanto rotas metabólicas em comum (Jerez et al., 2013; Ribeiro et al., 2009).

Tabela 8. Correlações de Spearman entre os elementos analisados e os coeficientes de correlação (ρ) de cada correlação para as raias borboleta, manteiga e viola. Valores de ρ estão apresentados entre parênteses.

			Essencial X Essencial	**Tóxico X Tóxico**	**Tóxico X Essencial**
Borboleta	Recreio	**Forte** (0,7 < r < 0,89)	Fe x Zn (0,719)	Ni x Pb (0,737)	As x Se (0,788)
Manteiga	Barra	**Forte** (0,7 < r < 0,89)		Al x Ni (0,879) Ni x Hg (0,881)	Ti x Mn (0,711) V x Fe (0,707) Ni x Zn (0,709)
	Recreio	**Muito forte** (r > 0,9)	Cu x Mn (0,952)	Ti x Rb (0,905) Rb x Cd (0,905)	Ti x Mn (0,905) Ti x Fe (0,976) Cu x V (0,934) Rb x Fe (0,929) Co x As (0,929)
		Forte (0,7 < r < 0,89)	Mn x Fe (0,881) Mn x Co (0,821) Fe x Cu (0,786) Fe x Se (0,738) Cu x Co (0,857)	Ti x As (0,738) Ti x Cd (0,810) V x As (0,731) As x Rb (0,786)	Ti x Cu (0,810) V x Mn (0,838) V x Co (0,829) Mn x As (0,833) Mn x Rb (0,810) Fe x Cd (0,833) Cu x As (0,833) Cu x Rb (0,810) Se x As (0,786) Se x Rb (0,857)
Viola	Copacabana	**Muito forte** (r > 0,9)			Cu x Ag (0,914)
		Forte (0,7 < r < 0,89)			Al x Ni (0,805) Cu x Pb (0,739)

Ao correlacionarmos os metais com os índices biomorfométricos de cada espécie e local, passamos a observar um número maior de correlações significativas negativas. Há, também, um grande número de correlações com elementos potencialmente tóxicos, indicando que o contato dessas espécies com tais elementos pode prejudicar sua maturação e/ou reprodução. Porém, não é possível observar muitas correlações comuns entre espécies ou entre diferentes locais (Tabela 9).

Tabela 9. Correlações entre os índices biomorfométricos, FC, IHS e IGS, e os elementos analisados e os coeficientes de correlação (ρ) de cada correlação para as raias borboleta, manteiga e viola.

			Índices x essencial	**Índices x tóxico**
Borboleta	Recreio	**Moderada** (0,4 < r < 0,69)	IHS x Cu (-0,542) IHS x Se (-0,410)	IGS x Rb (0,475)
Manteiga	Barra	**Moderada** (0,4 < r < 0,69)	IHS x Zn (-0,582)	
	Recreio	**Forte** (0,7 < r < 0,89)	FC x Mn (-0,738) IHS x Zn (0,857)	FC x V (-0,790)
Viola	Copacabana	**Moderada** (0,4 < r < 0,69)	FC x Cu (-0,515) FC x Se (-0,428) IHS x Zn (-0,400)	FC x Ti (-0,416) FC x As (-0,484) FC x Ag (-0,427) FC x Cd (-0,469) IHS x Al (-0,441) IHS x V (-0,412) IHS x Ni (-0,433) IHS x Cd (-0,470) IHS x Pb (-0,479)

Estudos anteriores já observaram correlações entre elementos químicos e os índices biomorfométricos. Em estudos que realizaram análises em músculo e brânquias de tubarões (Wosnick et al., 2021), é possível observar correlações, tanto positivas quanto negativas, entre elementos tóxicos e essenciais e o tamanho dos

órgãos analisados, além de correlações negativas entre o fator de condição e os elementos analisados. Outro estudo, utilizando ampolas de Lorenzini de tubarões (Willmer et al., 2022), também apresenta correlações entre metais e metaloides e o comprimento total e fator de condição desses animais, tanto semelhantes quanto diferentes ao estudo anterior. A partir dessas correlações, verifica-se que cada espécie é afetada de forma diferente pela presença de cada elemento, assim como pelo órgão ou tecido em que esses elementos são encontrados. Além disso, até mesmo raias de mesma espécie, capturadas em locais diferentes, podem apresentar diferenças entre a forma que cada elemento afeta seu desenvolvimento, potencialmente devido a diferentes fontes de contaminação locais, por exemplo.

5.3 Metalotioneínas e metais na fração termoestável

Foram avaliadas as concentrações dos metais na fração termoestável proveniente de extração das MT. Assim como para a fração bruta, também foram calculados os limites de quantificação (Tabela 10) e a recuperação dos CRMs (Tabela 11). Como as amostras para essa fração foram analisadas em apenas um dia, apenas um limite e um valor de recuperação são apresentados para cada elemento analisado.

Tabela 10. Limites de quantificação (mg L^{-1}) para os elementos determinados na análise da fração termoestável de bílis.

Al	**Ti**	**V**	**Mn**	**Fe**	**Co**	**Ni**	**Cu**	**Zn**
0,0071	0,063	0,00060	0,0051	0,34	0,0010	0,0032	0,016	0,057
As	**Se**	**Rb**	**Ag**	**Cd**	**Sn**	**Hg**	**Pb**	
0,0096	0,15	0,00068	0,00075	0,00096	0,15	0,0063	0,0055	

Tabela 11. Resultados de concentrações para os diferentes elementos analisados, em mg kg^{-1}, e de recuperações, em %, obtidos para os CRMs, durante a análise da fração termoestável de bílis.

	Valor certificado	Valor encontrado	Recuperação (%)
BCR 668			
As	7,1 ± 0,5 *	9,2 ± 0,3	130
Cd	0,275 ± 0,011 *	0,29 ± 0,01	107
Co	0,31 - 0,36 *	0,35 ± 0,02	106
Fe	84,7 - 93,5 *	89 ± 3	100
Zn	70,7 ± 0,4 *	73 ± 4	103
DORM-5			
	Valor certificado	Valor encontrado	Recuperação (%)
Ag	0,135 ± 0,014	0,124 ± 0,005	92
As	13,3 ± 0,7	19,9 ± 0,6	150
Cd	0,148 ± 0,007	0,10 ± 0,03	67
Co	0,063 ± 0,004	0,049 ± 0,003	78
Cu	3,30 ± 0,07	3,4 ± 0,1	102
Fe	113 ± 8	109 ± 3	96
Hg	0,316 ± 0,017	0,45 ± 0,09	141
Mn	1,06 ± 0,04	1,08 ± 0,02	102
Ni	0,44 ± 0,03	0,47 ± 0,03	106
Pb	0,058 ± 0,006	0,053 ± 0,009	91
Rb	2,76 ± 0,19	3,0 ± 0,1	107
Se	2,40 ± 0,11	3,9 ± 0,4	164
Sn	0,077 ± 0,008	0,080 ± 0,007	104
V	0,347 ± 0,029	0,36 ± 0,01	103
Zn	28,7 ± 1,0	30 ± 1	104
SRM2976			
	Valor certificado	Valor encontrado	Recuperação (%)
Ag	0,011 ± 0,005	0,009 ± 0,002	82
As	13,3 ± 1,8	19,4 ± 0,8	146
Cd	0,82 ± 0,16	0,87 ± 0,03	106
Cu	4,02 ± 0,33	4,0 ± 0,2	100
Fe	171,0 ± 4,9	172 ± 6	101
Ni	0,93 ± 0,12	0,93 ± 0,07	100
Pb	1,19 ± 0,18	1,21 ± 0,06	102
Se	1,80 ± 0,15	1,1 ± 0,5	59
Zn	137 ± 13	159 ± 8	116

*valor informado.

Nas correlações entre a concentração das MT e a concentração dos metais totais, é possível observar algumas correlações entre moderadas a fortes, tanto positivas quanto negativas (Tabela 12). Além disso, entre as correlações apresentadas consideradas significativas, com $p < 0,05$, não há nenhuma comum intraespécies. O nível de MT em determinados organismos pode ser induzido devido a diversas razões, sendo a principal a presença de metais e metaloides (Stillman, 1995). As correlações entre as MT e os elementos químicos indicam o

tipo de influência bioquímica causada pela presença desses, como por exemplo, o aumento da síntese de MT nos organismos devido à presença de elementos tóxicos (Lavradas et al., 2016). Outros estudos indicam, também, que correlações entre as MT e os elementos são indicativos do processo de destoxificação, tanto de elementos tóxicos quanto de elementos essenciais em excesso (Lavradas et al., 2014). Portanto, a partir dos resultados apresentados (Tabela 12), é possível concluir que existem indicativos de que há uma rota de destoxificação de As, Pb e Se, através de ligações com as MT, sendo excretados pela bílis de raias borboleta e viola. As raias manteigas, entretanto, não apresentaram correlações significativas entre as concentrações dos elementos analisados e as MTs.

Tabela 12. Correlações entre metalotioneína e os elementos analisados e os coeficientes de correlação (ρ) de cada correlação para as raias borboleta e viola. Os valores de ρ de cada correlação estão apresentados entre parênteses.

Borboleta	Viola
MT x As (0,432)	MT x Pb (0,786)
MT x Se (0,588)	

Já ao analisar as correlações entre as MT, os índices biomorfométricos e os metais e metaloides da fração termoestável das bílis, correlações diferentes do que na análise anterior foram visualizadas. Portanto, as concentrações de metais presentes na fração termoestável, ou seja, potencialmente ligados a metaloproteínas, são diferencialmente expressas devido a mecanismos de destoxificação diferencial. Os metais ligados a proteínas termoestáveis possuem maior facilidade para adentrar as células, causando alterações nos processos bioquímicos dos órgãos e tecidos, sendo diretamente dependentes de estados fisiológicos, espécie, tipo de contaminação e características de vida. (Davis & Cousins, 2000).

Entre essas correlações, as significativas ($p < 0,05$) estão apresentadas na Tabela 13. Os elementos presentes na fração termoestável das amostras de bílis apresentaram correlação principalmente com o IHS, sendo a raia viola a única espécie a apresentar uma correlação positiva entre um elemento essencial (Mn) e esse índice, potencialmente sendo este necessário para mobilização de reservas energéticas no fígado para possível reprodução. Já para as raias borboleta, as correlações se mostraram negativas, havendo correlações do IHS, tanto com

elementos essenciais quanto tóxicos, o que pode indicar redução dos valores de IHS com o aumento das concentrações dos metais, visto que a alta exposição a elementos tóxicos pode levar à redução do tamanho do fígado e, consequentemente, do IHS (Omar et al., 2016; Ramos-Osuna et al., 2020).

Tabela 13. Correlações entre os índices biomorfométricos, FC, IHS e IGS, e os elementos intracelulares analisados e os coeficientes de correlação (ρ) de cada correlação para as raias borboleta e viola. Os valores de ρ de cada correlação estão apresentados entre parênteses.

			Índices x essencial	**Índices x tóxico**
Borboleta	Recreio	**Forte** (0,7 < r < 0,89)	IHS x Cu (-0,797)	IHS x As (-0,714) IHS x Ag (-0,706)
		Moderada (0,4 < r < 0,69)	IHS x Fe (-0,462) IHS x Zn (-0,487) IHS x Se (-0,622)	
Viola	Copacabana	**Forte** (0,7 < r < 0,89)	IHS x Mn (0,857)	

A fim de entender se os metais presentes na fração termoestável de extração das MT teriam o mesmo comportamento de concentração que nas amostras de bílis *in natura*, também foi realizado o teste t para avaliar se as médias das concentrações são iguais ou não entre machos e fêmeas de raias borboleta capturadas no Recreio e raias manteiga capturadas na Barra e no Recreio. Esta análise não foi realizada para raias viola devido ao baixo número de amostras analisadas nessa fração.

Para as raias borboleta, assim como na fração bruta de bílis, não houve diferença entre as médias apresentadas entre machos e fêmeas. Já para as raias manteiga, apenas uma diferença estatística entre as médias de machos e fêmeas foi apresentada para Ag, que teve maior concentração nos machos. Esse resultado é diferente do que foi apresentado para a análise da fração bruta, indicando que pode haver diferenças na ligação de MT de machos e fêmeas dessa espécie com os metais e metaloides analisados.

Avaliando a diferença de concentração entre os elementos na fração bruta das amostras de bílis e na fração extraída termicamente, vemos que, entre as três

espécies, Pb e Ti se mostraram com as maiores médias na fração extraída (Figura 10), indicando que, independentemente da espécie, esses elementos tendem a apresentar altas concentrações na fração termoestável, onde há maior tendência de estarem ligados a proteínas, estando, portanto, biodisponíveis para participarem de processos bioquímicos intracelulares.

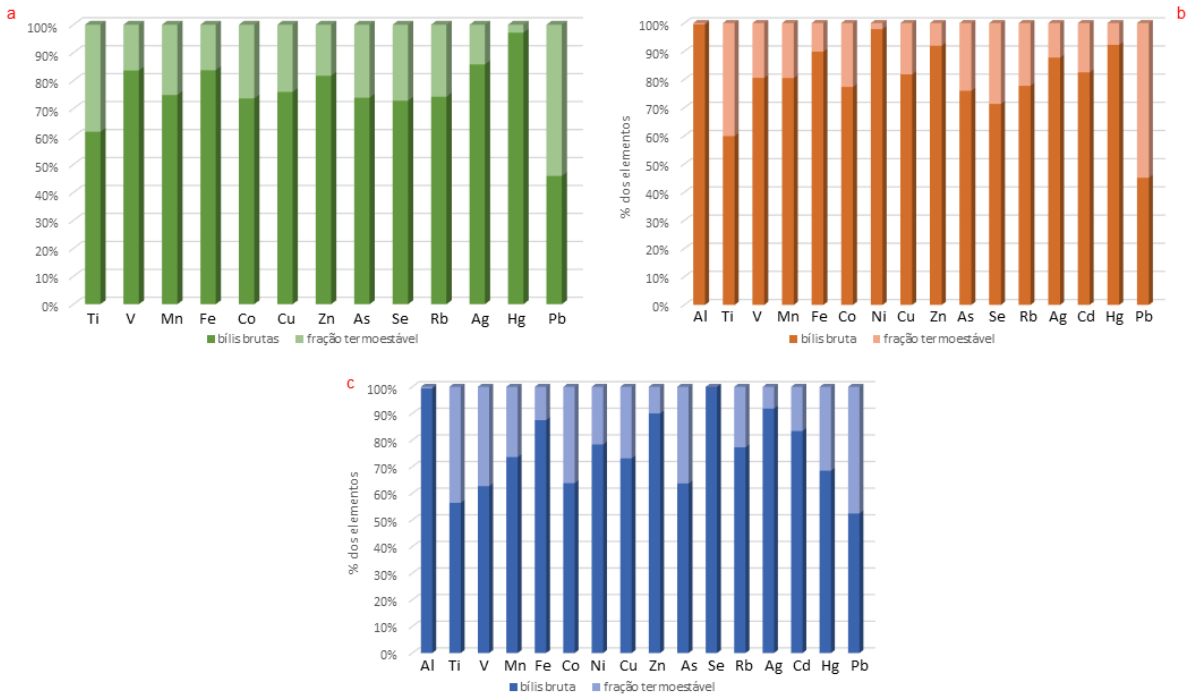

Figura 10. Comparação entre as concentrações dos elementos das amostras brutas e termicamente extraídas para as raias a) *G. altavela*, b) *D. hypostigma* e c) *P. horkelii*.

5.4 Análises por SEC-HPLC-ICP-MS

Os tempos de retenção (TR) das proteínas de diferentes tamanhos utilizadas como padrões nesta análise para avaliar qual o tamanho aproximado das proteínas às quais os metais apresentam ligações, a saber, BSA (67 kDa), ovalbumina (45 kDa), ribonuclease (13,7 kDa) e GSH (0,3 kDa), estão apresentadas na Figura 11.

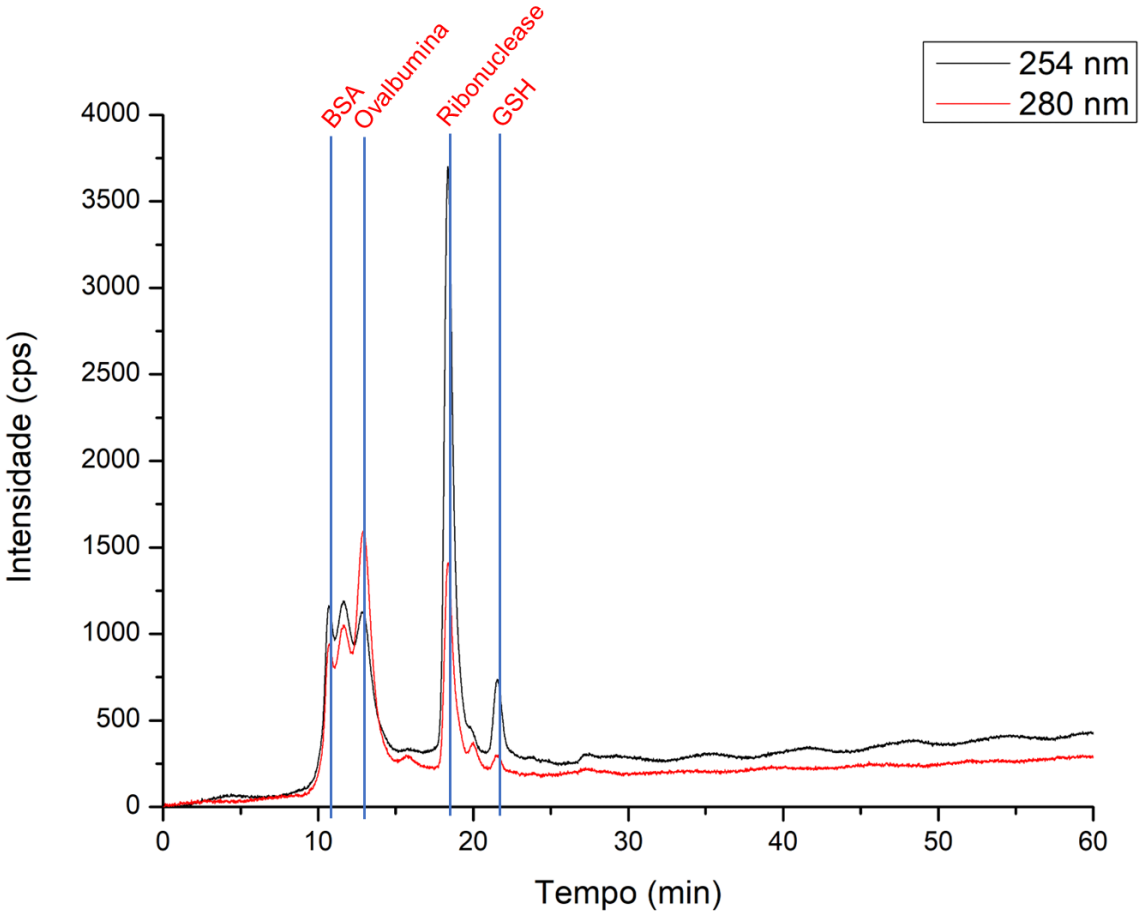

Figura 11. Cromatograma do mix de padrões das proteínas BSA (67 kDa), ovalbumina (45 kDa), ribonuclease (13,7 kDa) e GSH (0,3 kDa).

As raias borboleta não apresentaram diferenças entre fêmeas e machos em relação aos elementos que apresentaram picos ligados a proteínas. A única diferença notável foi a intensidade dos picos, que variava conforme cada indivíduo, mostrando que há diferenças na quantidade de proteínas ligadas a metais, mas não sendo possível correlacionar essas variações com nenhuma característica específica de algum grupo dessa espécie. Entre os elementos essenciais que apresentaram picos com TR igual ao das metalotioneínas, estão o Cu e Zn, com picos entre 20 e

23 min (Figura 12). Há também a presença de picos de Cu, Fe e Zn entre 11 e 15 min, tempo em que eluem as proteínas entre 67 até 45 kDa.

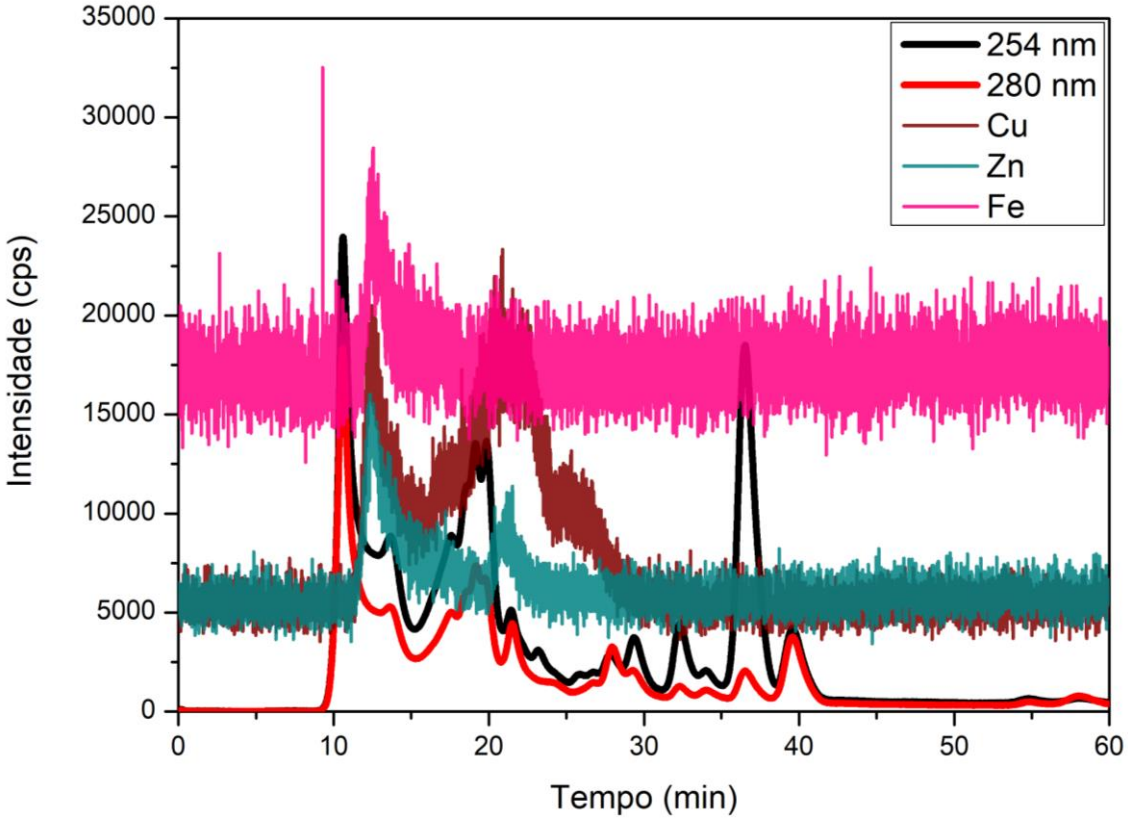

Figura 12. Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm associadas a elementos essenciais da espécie *G. altavela*.

As raias borboletas também apresentaram picos de Ni e Ti entre 20 e 23 min e um pico de As entre 24 e 26 min, elementos que são considerados tóxicos para os peixes. Como o pico de As está entre os TR de proteínas com peso das metalotioneínas (6 a 7 kDa) e de proteínas de baixa massa (0,3 kDa), não é possível inferir sobre a qual tipo de proteína esse elemento está ligado. Para os elementos considerados tóxicos também é possível notar um pico de Ni e Pb entre 11 e 15 min, que estariam ligados a proteínas entre 67 e 45 kDa, um pico de Ni entre 25 e 30 min, ligado a proteínas de até 0,3 kDa e um pico de Rb entre 39 e 43 min, TR muito superior ao das proteínas de 0,3 kDa (Figura 13).

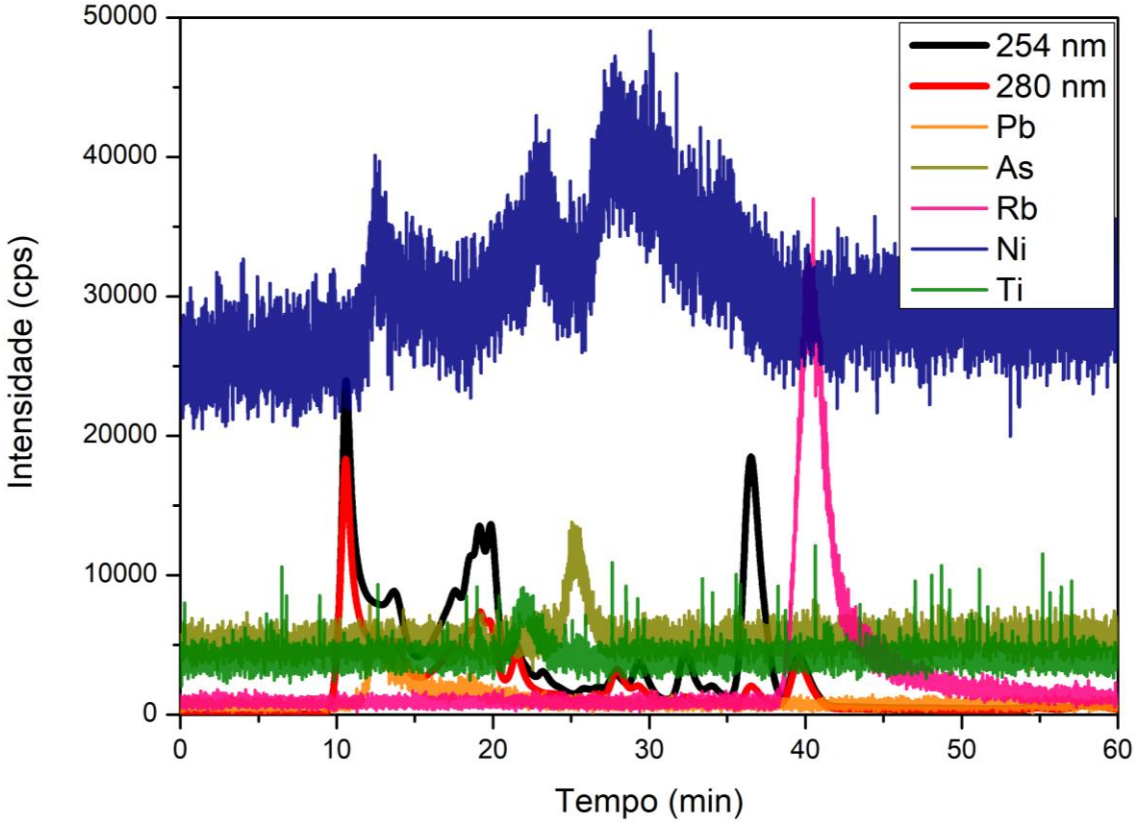

Figura 13. Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm associadas a elementos tóxicos da espécie *G. altavela*.

Nas raias manteiga, não foram verificadas diferenças entre machos e fêmeas na excreção de metais e metaloides e nem no tempo de retenção dos elementos analisados. Isso indica que não há diferenças na forma de ligação entre os metais e as metaloproteínas presentes na bílis, ao observarmos machos e fêmeas dessa espécie. Também não é possível observar diferenças entre os locais de coleta dos indivíduos. Nos gráficos apresentados na Figura 14, observamos que, para essa espécie, os elementos essenciais Cu e Zn apresentaram picos com tempo de retenção concomitantes com o tempo de retenção das metalotioneínas, entre 20 e 23 min, e Se um pico com TR entre 20 e 25 min. Os elementos Cu, Fe e Zn também apresentaram um pico entre 11 e 15 min, intervalo onde aparecem as bandas de proteínas entre 67 e 45 kDa.

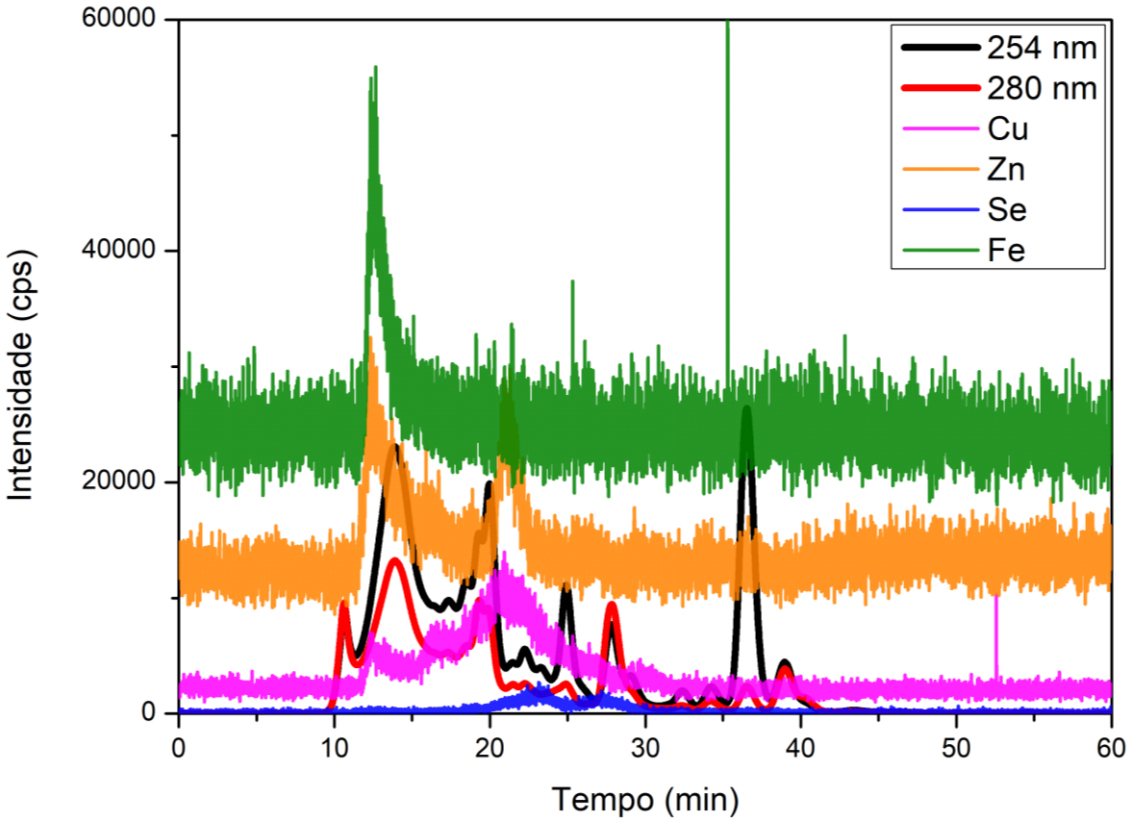

Figura 14. Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm, associadas a elementos essenciais da espécie *D. hypostigma*.

Entre os elementos tóxicos, foram verificadas bandas com tempo de retenção em concomitância com as MT para As, Cd, Ni e Ti (Figura 15). Há também um pico de Pb entre 11 e 15 min, mesmo tempo das proteínas próximas entre 67 e 45 kDa, um pico de Ni entre 25 e 30 min, concomitante com proteínas de 0,3 kDa e um pico de Rb entre 39 e 43 min, tempo superior ao TR de proteínas de 0,3 kDa, indicando que esse elemento está ligado a proteínas de massa muito baixa.

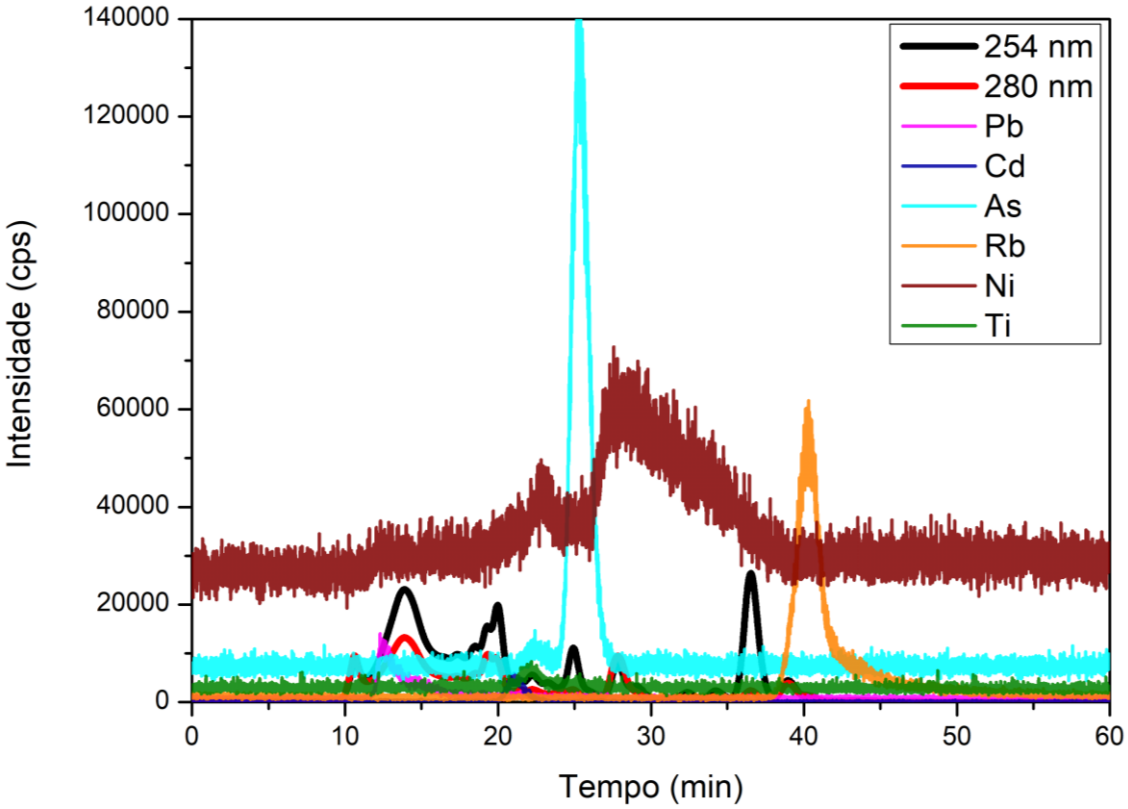

Figura 15. Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm, associadas a elementos tóxicos da espécie *D. hypostigma*.

Na análise das raias viola, assim como nas outras duas espécies, não é possível notar diferenças entre grupos, havendo diferenças unicamente de intensidade de picos entre os indivíduos. Entre os elementos essenciais, temos um pico de Zn entre 20 e 23 min, concomitante com o TR das metalotioneínas e um pico de Cu entre 15 e 25 min, o que dificulta identificar se esse metal está ligado a proteínas de massas maiores ou iguais às MT. Para essa espécie, há também picos de Co e Cu, entre 25 e 30 min, indicando uma ligação entre esses elementos e proteínas com peso igual ou menor que 0,3 kDa (Figura 16).

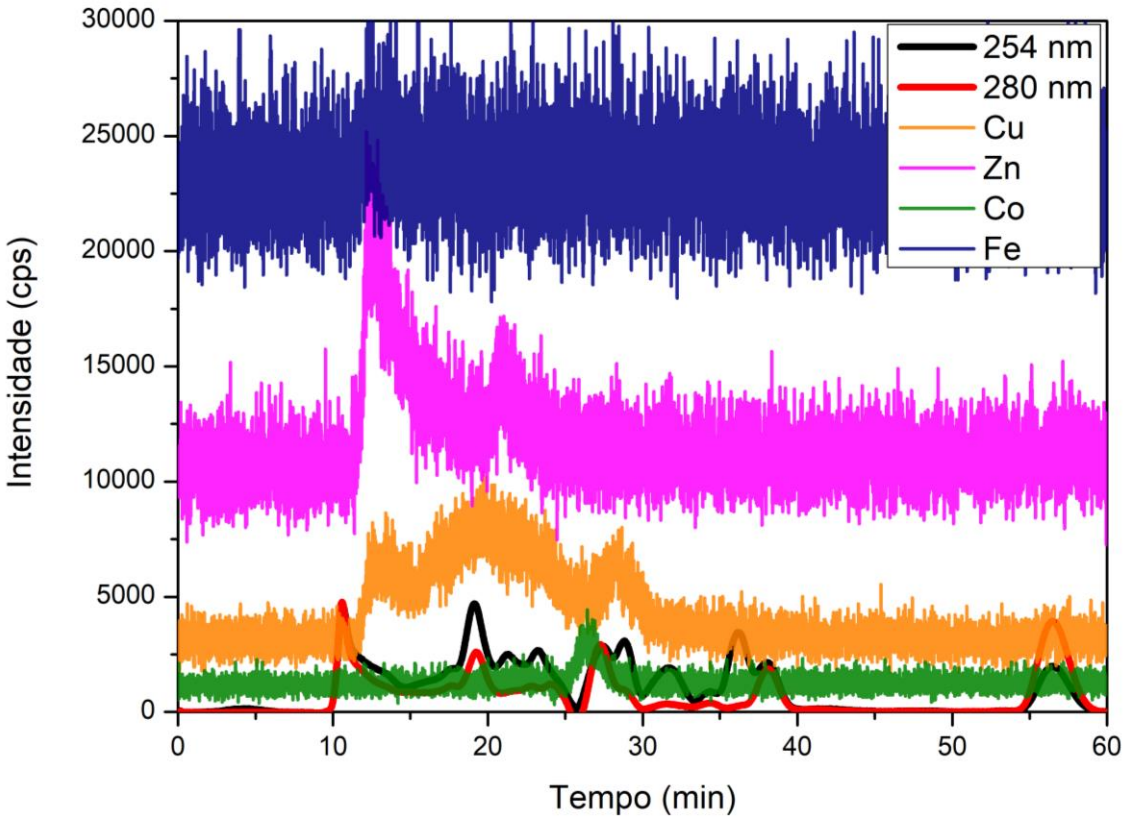

Figura 16. Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm associadas a elementos essenciais da espécie *P. horkelii*.

Para os elementos tóxicos, o gráfico dessa espécie mostra picos de Cd e Ni entre 20 e 23 min, indicando uma ligação entre esses elementos e proteínas de mesmo tamanho das MT, havendo também um pico de As entre 24 e 26 min, dificultando a identificação do tamanho de proteína ligada a esse metaloide (Figura 17). Há também picos de Pb entre 11 e 15 min, indicando ligação desse metal a proteínas entre 67 e 45 kDa, um pico de Ni entre 25 e 30 min, mesmo TR de proteínas de 0,3 kDa, e um pico de Rb entre 39 e 43 min, indicando uma ligação com proteínas de peso menor que 0,3 kDa.

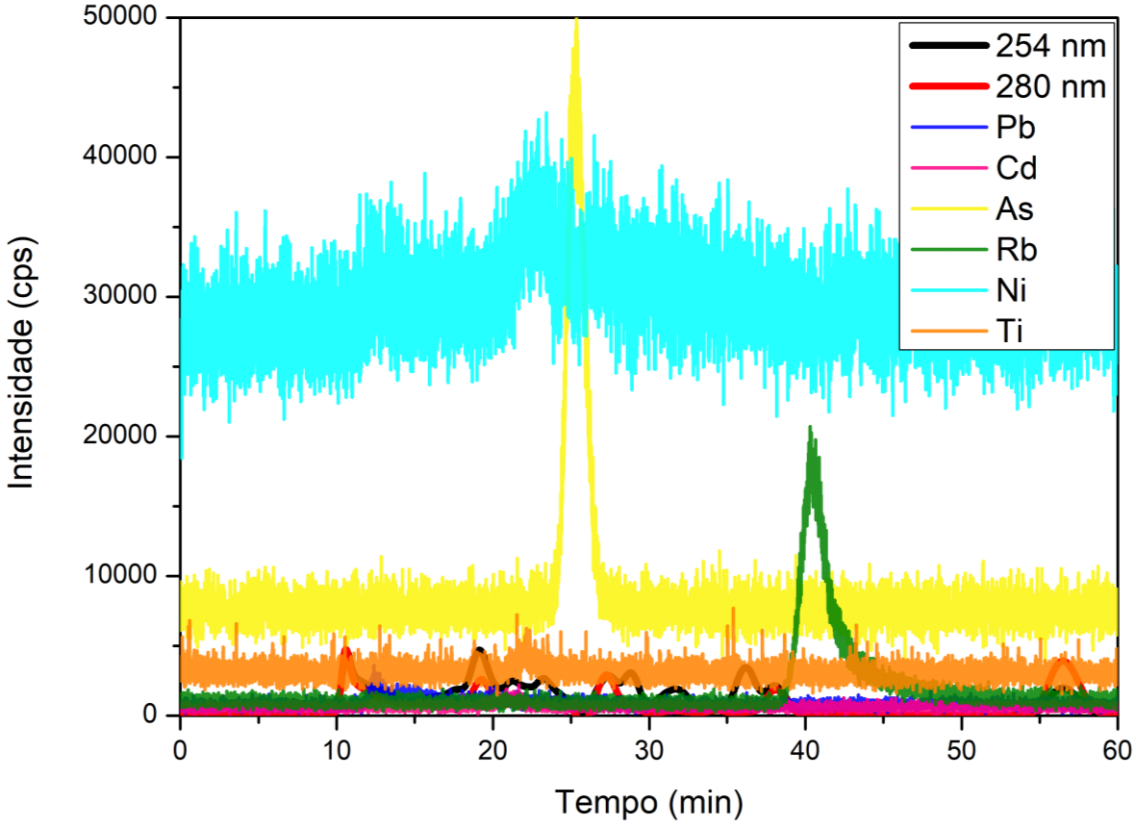

Figura 17. Gráfico representativo de bandas de proteínas em 254 e 280 nm associadas a elementos tóxicos da espécie *P. horkelii*.

Na Tabela 14, separados por espécies, estão apresentados os TR dos elementos que apresentaram picos ligados a proteínas. Comparando os picos apresentados entre as espécies, nota-se que alguns elementos se apresentaram iguais, tanto entre os essenciais quanto entre os tóxicos, enquanto outros apresentaram picos apenas em uma ou duas espécies. Além disso, não foi possível observar diferenças entre as raias manteiga capturadas em diferentes locais.

Tabela 14. Tempo de retenção das bandas de cada elemento e as espécies que apresentaram tais picos ligados a proteínas.

Elementos	TR (min)	Espécies
As	20 - 23	Manteiga
	24 -26	Borboleta, Manteiga, Viola
Cd	20 - 23	Manteiga, Viola
Co	25 - 30	Viola
Cu	11 - 15	Borboleta, Manteiga, Viola
	20 - 23	Borboleta, Manteiga
	15 -25	Viola
	25 - 30	Viola
Fe	11 - 15	Borboleta, Manteiga
Ni	11 - 15	Borboleta
	20 - 23	Borboleta, Manteiga, Viola
	25 - 30	Borboleta, Manteiga, Viola
Pb	11 - 15	Borboleta, Manteiga, Viola
Rb	39 - 43	Borboleta, Manteiga, Viola
Se	20 - 25	Manteiga
Ti	20 - 23	Borboleta, Manteiga, Viola
Zn	11 - 15	Borboleta, Manteiga, Viola
	20 - 23	Borboleta, Manteiga, Viola

Isso indica novamente a presença de diferenças metabólicas nas rotas de destoxificação entre essas três espécies, mostrando que alguns elementos aparentemente não apresentaram ligação com MT e outras proteínas termoestáveis excretadas na bílis de determinadas espécies. Contudo, visto o maior número de picos e bandas presentes com mesmo tempo de retenção nas três espécies, é possível afirmar que utilizar a bílis para monitorar contaminação recente desses elementos em qualquer uma dessas espécies é um método eficiente.

6. Conclusão

Foi possível estabelecer correlações entre os metais e metaloides estudados com os índices biomorfométricos das três espécies de elasmobrânquios analisadas, mostrando uma provável interferência de diversos elementos no desenvolvimento dessas espécies. Alguns elementos apresentaram inclusive diferenças entre as espécies e entre grupos dentro das espécies, como entre machos e fêmeas, demonstrando diferenças nas rotas bioquímicas metabólicas de metais e metaloides mesmo dentro de uma mesma espécie.

As correlações entre a concentração das metalotioneínas e a concentração dos metais indicam que os metais avaliados influenciam na quantidade de metalotioneínas produzidas e excretadas através das bílis desses animais, indicando uma tendência preferencial de excreção biliar de certos elementos. Além disso, também foram notadas fortes correlações, tanto positivas como negativas, entre os metais e metaloides presentes na fração termoestável das bílis e os índices biomorfométricos, o que mostra que a presença desses elementos e sua destoxificação via metaloproteínas, também podem afetar diretamente a saúde e o desenvolvimento dessas raias. Os metais ligados às metaloproteínas, portanto, podem se tornar importantes contaminantes intracelulares, afetando a fisiologia dos organismos expostos.

Pela técnica de SEC-HPLC-ICP-MS foi possível determinar quais dos elementos estudados estavam ligados a proteínas termoestáveis, dentre essas as metalotioneínas. Foi constatado que a maioria dos metais e metaloides apresentaram tempos de retenção iguais para as três espécies, indicando semelhança na forma de excreção. Foi também observado um maior número de ligações das metaloproteínas a elementos tóxicos do que a elementos essenciais, demonstrando que essa é uma matriz de amostra ideal para análise de contaminantes químicos.

Os resultados demonstram que é possível utilizar a bílis como um biomarcador ambiental para realizar monitoramento de contaminação recente de metais e metaloides para as espécies analisadas, podendo assim ser evitado o sacrifício desses animais devido à possibilidade de canulação hepática. Contudo mais estudos devem ser realizados a fim de entender se o perfil de ligação entre esses elementos e as metaloproteínas se estende para bílis de outras espécies de elasmobrânquios.

7. Referências

ABDELZAHER, M. F. *et al*. Effects of Lead and Cadmium Accumulation on Survival and Growth of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries**, Cairo, v. 26, ed. 6, p. 155-171, 27 nov. 2022.

AKBARZADEH-CHOMACHAEI, G. *et al*. Comparison of heavy metals pollution in coastal sediments of Bandar Abbas, Qeshm Island and Hormuz-Lark, Persian Gulf. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [*s. l.*], v. 20, p. 10861-10876, 29 jul. 2023.

ALORDA-KLEINGLASS, A. *et al*. Remobilization of dissolved metals from a coastal mine tailing deposit driven by groundwater discharge and porewater exchange. **Science of The Total Environment**, [*s. l.*], v. 688, p. 1359-1372, 20 jun. 2019.

ALVES, L. M. F. *et al*. Elasmobranchs as bioindicators of pollution in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 176, n. 113418, 09 fev. 2022.

ALVES, L. M. F. *et al*. Evidence of contamination-associated damage in blue sharks (*Prionace glauca*) from the Northeast Atlantic. **Science of The Total Environment**, [*s. l.*], v. *872*, n. 162095, 13 fev. 2023.

AMORIM, R. B.; MONTEIRO-NETO, C. Marine protected area and the spatial distribution of the gill net fishery in Copacabana, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, [*s. l.*], v. 76, ed. 1, p. 1-9, 29 fev. 2016.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, ed. 11, p. 1853-1861, 1998.

ANTHIS, N. J.; CLORE, G. M. Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. **Protein Science**, [*s. l.*], v. 22, p. 851-858, 23 mar. 2013.

ARAÚJO, C. V. M.; CEDEÑO-MACIAS, L. A. Heavy metals in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) landed on the Ecuadorian coast. **Science of The Total Environment**, [*s. l.*], v. 541, p. 149-154, 2016.

BAKIRDERE, S. *et al*. From mg/kg to pg/kg Levels: A Story of Trace Element Determination: A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, [*s. l.*], v. 46, ed. 1, p. 38-66, 4 jan. 2011.

BALLATORI, N.; BOYER, J. L. Slow biliary elimination of methyl mercury in the marine elasmobranchs, *Raja erinacea* and *Squalus acanthias*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [*s. l.*], v. 85, ed. 3, p 407-415, 30 set. 1986.

BARRERA-GARCÍA, A. *et al*. Oxidative stress indicators and trace elements in the blue shark (*Prionace glauca*) off the east coast of the Mexican Pacific

Ocean. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**: Toxicology & Pharmacology, [*s. l.*], v. 156, ed. 2, p. 59-66, ago. 2012.

BAUCHOT, M. L. Raies et autres batoides. *In*: FISCHER, W.; BAUCHOT, M. L.; SCHNEIDER, M. (ed.). **Fiches FAO d'identification pour les besoins de la pêche. (rev. 1). Mèditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37**. 1. ed. rev. Rome: Commission des Communautés Européennes and FAO, 1987. v. 2, p. 845-886.

BENNETT, R. F. Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. *In*: DE MORA, S. J. (ed.). **Tributyltin**: Case Study of an Environmental Contaminant. [*S. l.*]: Cambridge University Press, 1996. cap. 2, p. 21-61.

BEYER, J. *et al*. Environmental effects of offshore produced water discharges: A review focused on the Norwegian continental shelf. **Marine Environmental Research**, [*s. l.*], v. 162, n. 105155, 2020.

BEZERRA, M. F.; LACERDA, L. D.; LAI, C. T. Trace metals and persistent organic pollutants contamination in batoids (Chondrichthyes: Batoidea): A systematic review. **Environmental Pollution**, [*s. l.*], v. 248, p. 684-695, 2019.

BORGÅ, K. Bioaccumulation. *In*: JØRGENSEN, S. E.; FATH, B. D. (ed.). **Encyclopedia of Ecology**. [*S. l.*]: Elsevier, 2008. v. 1, cap. Ecotoxicology, p. 346-348. ISBN 978-0-08-045405-4.

BORRELL, A. *et al*. High aluminum content in bone of marine mammals and its relation with source levels and origin. **Environmental Pollution**, [*s. l.*], v. 331, n. 121936, 2023.

BRENNER, I. J. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Applications. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**, [*s. l.*], ed. 3, p. 229-235, 2019.

BRYMAN, A.; CRAMER, D. Quantitative Data Analysis with IBM SPSS 17, 18 & 19: A Guide for Social Scientists. 1. ed. Londres: **Routledge**, 2011. 408 p. ISBN 9780203180990.

CHOUVELON, T. *et al*. Nutritional grouping of marine forage species reveals contrasted exposure of high trophic levels to essential micro-nutrients. **Oikos**, [*s. l.*], v. 2022, ed. 7, n. e08844, 2022.

COMPAGNO, L. J. V. Checklist of living elasmobranchs. *In*: HAMLETT, W. C. (ed.). **Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes**, Maryland: Johns Hopkins University Press, 1999. p. 471-498. ISBN 0-8018-6048-2.

COUSSEAU, M. B. *et al*. O. Rayas, chuchos y otros batoideos del atlántico sudoccidental: 34°S-55°S. Mar del Plata: **INIDEP**, 2007. 102 p.

CRUZ, V. P. *et al*. A shot in the dark for conservation: Evidence of illegal commerce in endemic and threatened species of elasmobranch at a public fish market in southern Brazil. **Aquatic Conservation**: Marine and Freshwater Ecosystems, [*s. l.*], v. 31, ed. 7, p. 1650-1659, 2021.

DA SILVA JUNIOR, L. C.; DE ANDRADE, A. C.; VIANNA, M. Characterization of a small-scale fishery in an area of ecological relevance for elasmobranchs, at Recreio dos Bandeirantes, Rio de Janeiro State. **Arq. Ciên. Mar**, Fortaleza, v. 41, ed. 2, p. 47-57, 2008.

DAVIS, S. R.; COUSINS, R. J. Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function. **The Journal of Nutrition**, [*s. l.*], v. 130, ed. 5, p. 1085-1088, 2000.

DE BOECK, G.; GROSELL, M.; WOOD, C. Sensitivity of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) to waterborne silver exposure. **Aquatic Toxicology**, [*s. l.*], v. 54, ed. 3–4, p. 261-275, 2001.

DROUILLARD, K. G. Biomagnification. *In*: JØRGENSEN, S. E.; FATH, B. D. (ed.). **Encyclopedia of Ecology**. [*S. l.*]: Elsevier, 2008. v. 1, cap. Ecotoxicology, p. 441-448. ISBN 978-0-08-045405-4.

DULVY, N. K. *et al*. *Gymnura altavela*: Spiny Butterfly Ray. *In*: **The IUCN Red List of Threatened Species**. [*S. l.*], 2021b. Disponível em: https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T63153A3123409.en. Acesso em: 1 ago. 2023.

DULVY, N. K. *et al*. Overfishing drives over one-third of all sharks and rays toward a global extinction crisis. **Current Biology**, [*s. l.*], v. 31, ed. 21, p. 4773-4787, 2021a.

ERK, M. *et al*. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. **Talanta**, [*s. l.*], v. 57, ed. 6, p. 1211-1218, 2002.

FENG, W. *et al*. Trace metal concentrations in commercial fish, crabs, and bivalves from three lagoons in the South China Sea and implications for human health. **Environmental Science and Pollution Research**, [*s. l.*], v. 27, p. 16393-16403, 2020.

FERRETTI, F. *et al*. Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. **Ecology Letters**, [*s. l.*], v. 13, ed. 8, p. 1055-1071, 2010.

FOSSI, M. C. *et al*. Biomarkers of exposure and effects for assessing toxicological risk of endocrine disrupters in top predators of the Mediterranean sea. **Marine Ecology**, Berlim, v. 23, ed. s1, p. 184-189, 2002.

FREIRE, M. M. *et al*. Multibiomarker approach in fish to assess a heavily polluted Brazilian estuary, Guanabara Bay. **Environmental Monitoring and Assessment**, [*s. l.*], v. 195, n. 187, p. 1-13, 2023.

FUENTES, S. N. *et al*. Impacts of water pollutants on chondrichthyans species from South America: A review. **Chemosphere**, [*s. l.*], v. 324, n. 138262, 2023.

GOMES, U. L. *et al*. Guia para identificação dos tubarões, raias e quimeras do Rio de Janeiro (Chondrichthyes: Elasmobranchii e Holocephali). **Revista Nordestina de Biologia**, [*s. l.*], v. 27, n. 1, p. 171-368, 2019.

GONZALEZ-FERNÁNDEZ, M. *et al*. Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, [*s. l.*], v. 26, ed. 1, p. 141-149, 2011.

GROSELL, M.; O'DONNELL, M. J.; WOOD, C. M. Hepatic versus gallbladder bile composition: in vivo transport physiology of the gallbladder in rainbow trout. **American Journal of Physiology**: Regulatory Integrative and Comparative Physiology, [*s. l.*], v. 278, ed. 6, p. 1674-1684, 1 jun. 2000.

GROSELL, M.; WOOD, C. M.; WALSH, P. J. Copper homeostasis and toxicity in the elasmobranch *Raja erinacea* and the teleost *Myoxocephalus octodecemspinosus* during exposure to elevated water-borne copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**: Toxicology & Pharmacology, [*s. l.*], v. 135, ed. 2, p. 179-190, 4 jul. 2003.

HAMMERSCHLAG, N.; SULIKOWSKI, J. Killing for conservation: the need for alternatives to lethal sampling of apex predatory sharks. **ENDANGERED SPECIES RESEARCH**, [*s. l.*], v. 14, p. 135-140, 2011.

HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, [*s. l.*], v. 19, ed. 1, p. 5-14, 2004.

HAUSER-DAVIS, R. A. The current knowledge gap on metallothionein mediated metal-detoxification in Elasmobranchs. **PeerJ**, [*s. l.*], v. 8, n. e10293, 2 nov. 2020b.

HAUSER-DAVIS, R. A. *et al*. Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [*s. l.*], v. 28, ed. 1, p. 70-74, 2014.

HAUSER-DAVIS, R. A. *et al*. Fish bile as a biomarker for metal exposure. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 64, ed. 8, p. 1589-1595, 2012.

HAUSER-DAVIS, R. A. *et al*. Biochemical metal accumulation effects and metalloprotein metal detoxification in environmentally exposed tropical *Perna perna* mussels. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [*s. l.*], v. 208, n. 111589, 15 jan. 2021a.

HAUSER-DAVIS, R. A. *et al*. The evolution of environmental metalloproteomics over the last 15 years through bibliometric techniques. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [*s. l.*], v. 140, p. 279-287, 2017.

HAUSER-DAVIS, R. A. *et al*. Subcellular metal partitioning as a novel tool in ecotoxicological elasmobranch assessments: The case of lesser numbfish (*Narcine brasiliensis*) affected by the Mariana dam disaster in Southeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 177, n. 113569, 2022.

HAUSER-DAVIS, R. A. *et al*. Mercury contamination in the recently described Brazilian white-tail dogfish *Squalus albicaudus* (Squalidae, Chondrichthyes). **Chemosphere**, [*s. l.*], v. 250, n. 126228, 2020a.

HAUSER-DAVIS, R. A. *et al*. Hepatic Metal and Metallothionein Levels in a Potential Sentinel Teleost, *Dulesauriga*, from a Southeastern Brazilian Estuary. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [*s. l.*], v. 103, p. 538-543, 18 jun. 2019.

HAUSER-DAVIS, R. A. *et al*. Cytosolic and Metallothionein-Bound Hepatic Metals and Detoxification in a Sentinel Teleost, *Dules auriga*, from Southern Rio de Janeiro, Brazil. **Biological Trace Element Research**, [*s. l.*], v. 199, p. 744-752, 2021b.

HEUPEL, M. R. *et al*. Sizing up the ecological role of sharks as predators. **MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES**, [*s. l.*], v. 495, p. 291-298, 2014.

ICMBIO. Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a conservação dos Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de Extinção. *In*: ICMBIO (org.). **AVA ICMBio-MMA**. Brasília, 2016. Disponível em: https://ava.icmbio.gov.br/mod/data/view.php?d=17&rid=2562. Acesso em: 28 set. 2023.

INMETRO. *DOQ Cgcre 008 Revisão 08 - ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS*. 2020.

IUCN. *IUCN Red List*. Disponível em: https://www.iucnredlist.org/. Acesso em: 03 set. 2023.

JACKSON, B. P.; PUNSHON, T. Recent Advances in the Measurement of Arsenic, Cadmium, and Mercury in Rice and Other Foods. **Current environmental health reports**, [*s. l.*], v. 2, p. 15-24, 2015.

JAKIMSKA, A. *et al*. Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: the Role and Impact of Heavy Metals on Organisms. **Pol. J. Environ. Stud**, [*s. l.*], v. 20, ed. 5, p. 1117-1125, 2011.

JEREZ, S. *et al*. Monitoring trace elements in Antarctic penguin chicks from South Shetland Islands, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 69, ed. 1-2, p. 67-75, 2013.

JOSSE, J.; HUSSON, F. missMDA: A Package for Handling Missing Values in Multivariate Data Analysis. **Journal of Statistical Software**, [*s.l.*], v. 70, ed. 1, p. 1-31, 2016.

JÚNIOR, G. Pesca artesanal na Barra e região está em risco. **O Globo**, Rio de Janeiro, 4 out. 2012. Bairros. Disponível em: https://oglobo.globo.com/rio/bairros/pesca-artesanal-na-barra-regiao-esta-em-risco-6267433. Acesso em: 10 ago. 2023.

KÄGI, J. H. R. [69] Overview of metallothionein. **Methods in Enzymology**, [*s. l.*], v. 205, p. 613-626, 1991.

KAMUNDE, C. *et al*. Evaluation of Antioxidant Circulatory Lipid-Soluble Vitamins and Sodium as Non-invasive Indicators of Chronic Copper Exposure and

Toxicity in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Bull Environ Contam Toxicol**, [*s. l.*], v. 80, p. 502-506, 2008.

KAMUNDE, C.; WOOD, C. M. The influence of ration size on copper homeostasis during sublethal dietary copper exposure in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic Toxicology**, [*s. l.*], v. 62, ed. 3, p. 235-254, 12 fev. 2003.

KHAN, M. L. *et al*. Effects of microplastics in freshwater fishes health and the implications for human health. **Brazilian Journal of Biology**, [*s. l.*], v. 84, n. e272524, 2024.

KUMAR, S.; PANT, S. C. Comparative effects of the sublethal poisoning of zinc, copper and lead on the gonads of the teleost *Puntius conchonius* ham. **Toxicology Letters**, [*s. l.*], v. 23, ed. 2, p. 189-194, 1984.

LAILSON-BRITO, J. *et al*. Mercury-Selenium Relationships in Liver of Guiana Dolphin: The Possible Role of Kupffer Cells in the Detoxification Process by Tiemannite Formation. **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 7, ed. 7, p. e42162, 2012.

LAM, P. K. S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, [*s. l.*], v. 52, ed. 7, p. 348-354, 2009.

LAND, S. N. *et al*. Biliary and hepatic metallothionein, metals and trace elements in environmentally exposed neotropical cichlids *Geophagus brasiliensis*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [*s. l.*], v. 50, p. 347-355, 2018.

LAVRADAS, R. T. *et al*. Metal, metallothionein and glutathione levels in blue crab (*Callinectes sp.*) specimens from southeastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [*s. l.*], v. 107, p. 55-60, 4 jun. 2014.

LAVRADAS, R. T. *et al*. Investigation of thermostable metalloproteins in *Perna perna* mussels from differentially contaminated areas in Southeastern Brazil by bioanalytical techniques. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [*s. l.*], v. 34, p. 70-78, 2016.

LEMOS, M. F. L. Biomarker Studies in Stress Biology: From the Gene to Population, from the Organism to the Application. **Biology**, [*s. l.*], v. 10, ed. 12, n. 1340, 16 dez. 2021.

LESSA, R. *et al*. Plano nacional de ação para a conservação e o manejo dos estoques de peixes elasmobrânquios no Brasil. *In*: **SBEEL**. Recife: COMISSÃO DE ELABORAÇÃO DO PLANO DE AÇÃO, 2005. Disponível em: https://www.sbeel.org.br/wp-content/uploads/2017/02/Plano-de-Ação-Nacional_2005.pdf. Acesso em: 20 ago. 2023.

LOPES, C. A. *et al*. Toxic and essential metals in *Narcine brasiliensis* (Elasmobranchii: Narcinidae): A baseline ecotoxicological study in the Southeast Atlantic and preliminary maternal transfer implications. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 149, n. 110606, 2019.

LOTO, L. *et al*. Temporal changes of a coastal small-scale fishery system within a tropical metropolitan city. **Ocean & Coastal Management**, [*s. l.*], v. 153, p. 203-214, 1 mar. 2018.

LOZANO-BILBAO, E. *et al*. Development stage and season influence in the metal content of small pelagic fish in the North-West Africa. **Chemosphere**, [*s. l.*], v. 261, n. 127692, 2020.

LYONS, K.; LOWE, C. G. Mechanisms of maternal transfer of organochlorine contaminants and mercury in the common thresher shark (*Alopias vulpinus*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, [*s. l.*], v. 70, n. 12, p. 1667–1672, 2013.

MACENA, L. G. P. *et al*. Environmental assessment of sewage contamination in the surroundings of a marine outfall combining human mastadenovirus and fecal indicator bacteria. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 193, n. 115110, 2023.

MACIEL, O. L. de C. *et al*. Arsenic contamination in widely consumed Caribbean sharpnose sharks in southeastern Brazil: Baseline data and concerns regarding fisheries resources. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 172, n. 112905, 2021.

MADEJCZYK, M. S.; BOYER , J. L.; BALLATORI, N. Hepatic uptake and biliary excretion of manganese in the little skate, *Leucoraja erinacea*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**: Toxicology & Pharmacology, [*s. l.*], v. 149, p. 566-571, 2009.

MAGALHÃES, L. E. Quase 40% dos dejetos coletados pela Cedae vão para o alto-mar pelos emissários da Barra e de Ipanema. *In*: **O Globo**. Rio de Janeiro, 9 fev. 2020. Disponível em: https://oglobo.globo.com/rio/quase-40-dos-dejetos-coletados-pela-cedae-vao-para-alto-mar-pelos-emissarios-da-barra-de-ipanema-24238583. Acesso em: 10 ago. 2023.

MARIN, V. *et al*. Fish size spectrum as a complementary biomonitoring approach of freshwater ecosystems. **Ecological Indicators**, [*s. l.*], v. 146, n. 109833, 2023.

MARTINS, M. F.; COSTA, P. G.; BIANCHINI, A. Assessing multigenerational exposure to metals in elasmobranchs: Maternal transfer of contaminants in a yolk-sac viviparous species. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 175, n. 113364, 2022.

MASON, A. Z.; STORMS, S. D. Applications of Directly Coupled SE-HPLC/ICP-MS in Environmental Toxicology Studies: A Study of Metal-Ligand Interactions in Cytoplasmic Samples. **Marine Environmental Research**, [*s. l.*], v. 35, ed. 1-2, p. 19-23, 1993.

MOISEENKO, T. I.; KUDRYAVTSEVA, L. P. Trace metal accumulation and fish pathologies in areas affected by mining and metallurgical enterprises in the Kola Region, Russia. **Environmental Pollution**, [*s. l.*], v. 114, ed. 2, p. 285-297, 2001.

MONTEIRO, F. *et al*. Total and subcellular Ti distribution and detoxification processes in *Pontoporia blainvillei* and *Steno bredanensis* dolphins from Southeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 153, n. 110975, 2020.

MOOKAN, V. P. *et al*. Assessment of metal contaminants along the Bay of Bengal: Multivariate pollution indices. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 192, n. 115008, 2023.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. **Chemical Society Reviews**, [*s. l.*], v. 38, p. 1119–1138, 7 jan. 2009.

NIGRO, M.; LEONZIO, C. Intracellular storage of mercury and selenium in different marine vertebrates. **MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES**, [*s. l.*], v. 135, p. 137-143, 1996.

OLMEDO, P. Determination of essential elements (copper, manganese, selenium and zinc) in fish and shellfish samples. Risk and nutritional assessment and mercury–selenium balance. **Food and Chemical Toxicology**, [*s. l.*], v. 62, p. 299-307, 2013.

OMAR, W. A.; SALEH, Y. S.; MARIE, MA S. The use of biotic and abiotic components of Red Sea coastal areas as indicators of ecosystem health. **Ecotoxicology**, [*s. l.*], v. 25, p. 253-266, 2016.

PAYNE, J. F. *et al*. Are metal mining effluent regulations adequate: identification of a novel bleached fish syndrome in association with iron-ore mining effluents in Labrador, Newfoundland. **Marine Environmental Research**, [*s. l.*], v. 50, ed. 1-5, p. 103-106, 2000.

PEMBERTHY, D.; PADILLA, Y.; PEÑUELA, G. A. Assessment of chromium, lead and mercury in seawater and some fish species from the Gulf of Urabá, Colombian Caribbean: a baseline study. **Environmental Science and Pollution Research**, [*s. l.*], v. 68, p. 16804–16815, 2021.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, [*s. l.*], v. 83, ed. 2, p. 346-356, 1977.

POLLOM, R. *et al*. Dasyatis hypostigma. *In*: IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species 2020**: e.T60154A3090027. [*S. l.*], 2020a. Disponível em: https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T60154A3090027.en. Acesso em: 1 ago. 2023.

POLLOM, R. *et al*. Pseudobatos horkelii. *In*: IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species 2020**: e.T41064A2951089. [*S. l.*], 2020b. Disponível em: https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T41064A2951089.en. Acesso em: 1 ago. 2023.

PRANGE, A.; SCHAUMLÖFFEL, D. Hyphenated techniques for the characterization and quantification of metallothionein isoforms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [*s. l.*], v. 373, p. 441-453, 2002.

PREFEITURA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO. População Residente e Estimada: Brasil, Estado do Rio de Janeiro e Município do Rio de Janeiro e Regiões Administrativas (RA) - 2000/2010/2013-2016/2020. *In*: **Data.Rio**. [*S. l.*], 2019.

Disponível em: data.rio/documents/ba877d53302346eca990a47c99e15f74/about. Acesso em: 10 ago. 2023.

RAMOS-OSUNA, R. *et al*. Bioaccumulation of mercury in *Haemulopsis elongatus* and *Pomadasys macracanthus* from the SE Gulf of California: condition indexes and health risk assessment. **Environ Monit Assess**, [*s. l.*], v. 192, n. 704, 2020.

RIBEIRO, A. R. *et al*. Toxic Element Concentrations in the Razorbill *Alca torda* (Charadriiformes, Alcidae) in Portugal. **Arch Environ Contam Toxicol**, [*s. l.*], v. 56, p. 588-595, 2009.

RIOTUR. Recreio dos Bandeirantes. *In*: **RioTur**. [*S. l.*], 2023. Disponível em: https://riotur.rio/que_fazer/recreio-dos-bandeirantes/. Acesso em: 12 ago. 2023.

RODRIGUES, A. C. M. *et al*. Ecophysiological effects of mercury bioaccumulation and biochemical stress in the deep-water mesopredator *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii; Etmopteridae). **Journal of Hazardous Materials**, [*s. l.*], v. 423, n. 127245, 2022.

RODRIGUES, A. P. O.; BERGAMIN, G. T.; DOS SANTOS, V. R. V. Nutrição e alimentação de peixes. *In*: RODRIGUES, A. P. O. *et al*, (org.). **Piscicultura de água doce**: multiplicando conhecimentos. [*S. l.*]: EMBRAPA, 2013. cap. 6, p. 171-213.

RODRIGUES, M. *et al*. Mercury: biogeochemical and toxicological aspects and levels found in marine fish along the Southern and Southeastern coasts of Brazil. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**, Campo dos Goytacazes, v. 9, n. 1, p. 99-118, 5 jun. 2015.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, [*s. l.*], v. 22, ed. 2, p. 81-113, 1992.

ROLIM, F. A. *et al*. Records of morphological abnormalities in the Brazilian electric ray *Narcine brasiliensis* (Olfers, 1831) (Chondrichthyes: Narcinidae) in the southwestern Atlantic. **Marine Biodiversity**, [*s. l.*], v. 50, n. 44, 2020.

ROWE, C. L.; HOPKINS, W. A.; CONGDON, J. D. Ecotoxicological Implications of Aquatic Disposal of Coal Combustion Residues In the United States. **Environmental Monitoring and Assessment**, [*s. l.*], v. 80, p. 207-276, 2002.

ROY, S.; BHATTACHARYA, S. Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of *Channa punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [*s. l.*], v. 65, ed. 2, p. 218-229, 2006.

SAMPAIO, E. *et al*. Ocean acidification dampens physiological stress response to warming and contamination in a commercially-important fish (*Argyrosomus regius*). **Science of the Total Environment**, [*s. l.*], v. 618, p. 388-398, 15 mar. 2018.

SANTANA, M. S. *et al*. Diffuse sources of contamination in freshwater fish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker

approaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [*s. l.*], v. 149, p. 173-181, 2018.

SANTOS-ECHEANDÍA, J. *et al*. The influence of natural vs anthropogenic factors on trace metal(loid) levels in the Mussel Watch programme: Two decades of monitoring in the Spanish Mediterranean sea. **Marine Environmental Research**, [*s. l.*], v. 169, n. 105382, 2021.

SHI, W.; CHANCE, M. R. Metallomics and metalloproteomics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [*s. l.*], v. 65, p. 3040-3048, 14 jun. 2008.

SMITH, K. T.; WHITLEDGE, G. W. Fin Ray Chemistry as a Potential Natural Tag for Smallmouth Bass in Northern Illinois Rivers. **Journal of Freshwater Ecology**, [*s. l.*], v. 25, ed. 4, p. 627-635, 2010.

SOMERVILLE, R. *et al*. Analysis of Trace Element Concentrations and Antioxidant Enzyme Activity in Muscle Tissue of the Atlantic Sharpnose Shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [*s. l.*], v. 79, p. 371-390, 2020.

STILLMAN, M. J. Metallothioneins. **Coordination Chemistry Reviews**, [*s. l.*], v. 144, p. 461-511, 1995.

SUN, P. *et al*. Effects of Silver Nanoparticles on Denitrification and Associated N_2O Release in Estuarine and Marine Sediments. **Journal of Ocean University of China**, [*s. l.*], v. 21, ed. 1, p. 131-140, 18 jan. 2022.

SUSIN, M. Os últimos pescadores de Copacabana. **National Geographic Brasil**, [*S. l.*], 5 nov. 2019. Disponível em: nationalgeographicbrasil.com/fotografia/2019/11/os-ultimos-pescadores-de-copacabana-colonia-pescadores-z-13. Acesso em: 10 ago. 2023.

SUZUKI, N. *et al*. Effects of Ultimobranchialectomy on the Mineral Balances of the Plasma and Bile in the Stingray (Elasmobranchii). **Zoological Science**, [*s. l.*], v. 12, ed. 2, p. 239-242, 1 abr. 1995.

SZPUNAR, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. **Analyst**, [*s. l.*], v. 130, ed. 4, p. 442-465, 4 mar. 2005.

TAN, L.C. *et al*. Selenium: environmental significance, pollution, and biological treatment technologies. **Biotechnology Advances**, [*s. l.*], v. 34, ed. 5, p. 886–907, 2016.

TENÓRIO-DAUSSAT, C.L. *et al*. Evaluation and standardization of different purification procedures for fish bile and liver metallothionein quantification by spectrophotometry and SDS-PAGE analyses. **Talanta**, [*s. l.*], v. 120, p. 491–497, 2014.

TERRAZAS-LÓPEZ, R. *et al*. Cadmium concentration in liver and muscle of silky shark (*Carcharhinus falciformis*) in the tip of Baja California south, México. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 107, ed. 1, p. 389–392, 15 jun. 2016.

THORSTENSEN, M.J. *et al*. Non-Lethal Sampling Supports Integrative Movement Research in Freshwater Fish. **Frontiers in Genetics**, [*s. l.*], v. 13, n. 795355, 25 abr. 2022.

TIKTAK, G.P. *et al*. Are concentrations of pollutants in sharks, rays and skates (Elasmobranchii) a cause for concern? A systematic review. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 160, n. 111701, 2020.

TUROCZY, N.J. *et al*. Observations on metal concentrations in three species of shark (*Deania calcea*, *Centroscymnus crepidater*, and *Centroscymnus owstoni*) from Southeastern Australian waters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 48, ed. 9, p. 4357–4364, 16 ago. 2000.

VAZZOLER, A. E. A. M. **BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE PEIXES TELEÓSTEOS: TEORIA E PRÁTICA**. Maringá-PR: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1996. 169 p. ISBN 85-85545-16-X.

VERON, A. *et al*. Pollutant Pb burden in Mediterranean *Centroscymnus coelolepis* deep-sea sharks. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 174, n. 113245, 2022.

VIARENGO, A. *et al*. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, [*s. l.*], v. 44, ed. 1, p. 69–84, 1997.

WALKER, C. J. **Assessing the Effects of Pollutant Exposure on Sharks:** A Biomarker Approach. 2011. Tese (Mestrado) - University of North Florida, Florida, 2011.

WALLACE, W.G.; LUOMA, S.N. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). **Marine Ecology Progress Series**, [*s. l.*], v. 257, p. 125–137, 2003.

WILLMER, I. *et al.* First report on metal and metalloid contamination of Ampullae of Lorenzini in sharks: A case study employing the Brazilian sharpnose shark *Rhizoprionodon lalandii* from Southeastern Brazil as an ecotoxicological model. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 179, n. 113671, 2022.

WOSNICK, N. *et al*. Negative metal bioaccumulation impacts on systemic shark health and homeostatic balance. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 168, n. 112398, 2021.

XIE, J. *et al*. Essential and non-essential elements in tuna and billfish around the world: Distribution patterns and influencing factors. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 196, n. 115587, 2023.

YEE-DUARTE, J. A. *et al*. Contrasting reproductive health of female clams *Megapitaria squalida* from two nearby metal-polluted sites in the Gulf of California: Potential effects of copper, lead, and cobalt. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 160, n. 111583, 2020.

ZAOUI, N. *et al*. Assessment of effects of metal contamination and abiotic factors on fatty acid composition and biochemical biomarkers activity in the liver of

Chelon ramada collected from two ecosystems on the Mahdia coast, Tunisia. **Biochemical Systematics and Ecology**, [*s. l.*], v. 107, n. 104608, 2023.

ZEMANOVA, M.A. Towards more compassionate wildlife research through the 3Rs principles: moving from invasive to non-invasive methods. **Wildlife Biology**, [*s. l.*], v. 1, 17 mar. 2020

ZHANG, Y. *et al*. Hepatic distribution of iron, copper, zinc and cadmium-containing proteins in normal and iron overload mice. **BioMetals**, [*s. l.*], v. 22, p. 251 - 259, 2009.