



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V - CCBSA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ADAMASTOR COUTINHO PINTO

**BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS DE PEIXES DE RIACHOS DE MATA
ATLÂNTICA DENTRO DE UMA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO E EM SEU
ENTORNO**

**JOÃO PESSOA
2024**

ADAMASTOR COUTINHO PINTO

**BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS DE PEIXES DE RIACHOS DE MATA
ATLÂNTICA DENTRO DE UMA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO E EM SEU
ENTORNO**

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo)
apresentado à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Enelise Marcelle Amado.

**JOÃO PESSOA
2024**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

P659b Pinto, Adamastor Coutinho.

Biomarcadores fisiológicos de peixes de riachos de mata atlântica dentro de uma Unidade de Conservação e em seu entorno [manuscrito] / Adamastor Coutinho Pinto. - 2024.

20 p. : il. colorido.

Digitado. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2024.
"Orientação : Profa. Dra. Enelise Marcelle Amado,
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA. "

1. Biomarcadores fisiológicos. 2. Estresse fisiológico. 3. Unidade de Conservação. I. Título

21. ed. CDD 577

ADAMASTOR COUTINHO PINTO

**BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS DE PEIXES DE RIACHOS DE MATA
ATLÂNTICA DENTRO DE UMA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO E EM SEU
ENTORNO**

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo)
apresentado à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovada em: 25/06/2024.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Enelise Marcelle Amado (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

**Cleber Ibraim
Salimon**

Assinado de forma digital por
Cleber Ibraim Salimon
Dados: 2024.11.05 11:05:02
-03'00'

Prof. Dr. Cleber Ibraim Salimon
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Tacyana Pereira Ribeiro de Oliveira
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Dedicado à minha família, meus professores e a quem ainda se interessa em salvar o mundo.

O que está embaixo é como o que está no alto, o que está no alto é como o que está embaixo, e por essas coisas fazem-se os milagres de uma coisa só. E como todas essas coisas são e provêm de um, pela mediação do um, assim todas essas coisas são nascidas desta única coisa por adaptação.

Hermes Trismegisto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	METODOLOGIA	10
2.1	COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	10
2.2	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	11
2.3	TEOR HÍDRICO	11
2.4	ATIVIDADE DO FENÓTIPO MXR	12
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	12
3.1	DADOS ABIÓTICOS	12
3.2	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	13
3.3	TEOR HÍDRICO	14
3.4	ATIVIDADE DO FENÓTIPO MXR	15
4	CONCLUSÃO	16
	REFERÊNCIAS	18

BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS DE PEIXES DE RIACHOS DE MATA ATLÂNTICA DENTRO DE UMA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO E EM SEU ENTORNO

Adamastor Coutinho Pinto
Enelise Marcelle Amado

RESUMO

A Mata Atlântica é uma das províncias biogeográficas mais degradadas do Brasil, e a criação de Unidades de Conservação é um dos principais métodos de reduzir a perda de biodiversidade em sua extensão. Tendo isso em mente, o projeto aqui descrito tem como objetivo comparar as condições ambientais de riachos, um dos sistemas mais impactados pela poluição e desmatamento na província biogeográfica, utilizando parâmetros ecofisiológicos que podem indicar a presença de poluentes. Para tanto, foram coletados peixes de uma única espécie (*Hemigrammus unilineatus*) que vivem dentro da Reserva Biológica Guaribas (PB) e fora dela, sujeitos a interferências humanas distintas. A partir dos espécimes coletados, biomarcadores fisiológicos foram utilizados como parâmetros de uniformidade para as distintas relações entre os grupos de peixes estudados, sendo eles a quantificação das proteínas plasmáticas totais, teor hídrico percentual de brânquias e músculo, e atividade do fenótipo MXR. Os resultados dos dois primeiros parâmetros fisiológicos evidenciaram estatisticamente a presença de diferenças entre os dois grupos, levando a conclusões positivas a respeito da efetividade da Unidade de Conservação, enquanto o terceiro parâmetro teve resultados inconclusivos pela provável presença de inibidores do fenótipo MXR nos locais de estudo.

Palavras-Chave: Biomarcadores fisiológicos; Estresse fisiológico; Unidade de Conservação.

ABSTRACT

The Mata Atlântica is one of the most degraded biogeographic provinces in Brazil, and the creation of Conservation Units is one of the main methods to reduce the loss of biodiversity in its extension. Having this in mind, the purpose of this project is to compare the environmental condition of streams, one of the systems that are most affected by pollution and deforestation in the biogeographic province, utilizing ecophysiology parameters that can indicate the presence of pollutants. For that, fishes of a single species (*Hemigrammus unilineatus*) were collected within the Guaribas Biological Reserve (Paraíba) and outside it, subject to distinct human interferences. From the collected specimens, physiology biomarkers were used as uniformity parameters to the distinct relations from the two studied groups of fishes, them being the quantification of total plasmatic proteins, percentual moisture content from gills and muscle, and MXR phenotype activity. The results for the first two physiologic parameters demonstrated statistical differences between the two groups, leading to positive conclusions regarding the effectiveness of the Conservation Unit, while the third parameter had inconclusive results due to the probable presence of MXR phenotype inhibitors at the studied sites.

Keywords: Physiologic biomarkers; Physiologic stress; Conservation Unit.

1 INTRODUÇÃO

A degradação de rios e córregos da Mata Atlântica, província biogeográfica (UDVARDY, 1975) que integra a lista de *Hotspots* mundiais (altas taxas de biodiversidade, endemismo e pressão antrópica - MYERS et al, 2000), tem como principais causas a poluição, desmatamento, represamentos e introdução de espécies exóticas. A poluição reduz a abundância e riqueza dos peixes locais, sendo agravada pela perda da mata ciliar quando há desmatamento ou quando o curso do rio muda em decorrência de represamentos. Essas reduções populacionais também são causadas na presença de espécies invasoras introduzidas acidental ou propositalmente pelo ser humano, modificando as relações de competição/predação originais (MIRANDA, 2012).

Com cerca de 2 a 5% da vegetação original preservada na Mata Atlântica (MIRANDA, 2012), uma das principais estratégias de conservação e preservação da biodiversidade dessa e de outras províncias biogeográficas é a delimitação de áreas conhecidas como Unidades de Conservação (UC), regulamentadas no Brasil pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC) e implementadas pelo Instituto Chico Mendes (ICMBio) para serem geridas nas esferas federal, estadual e municipal. Sendo uma das onze UC's da Mata Atlântica na Paraíba, a Reserva Ambiental Guaribas (ReBio Guaribas) foi escolhida como local de estudo (Figura 1), estando localizada na Zona da Mata, mesorregião mais úmida e economicamente relevante do estado. Agrupada, segundo o SNUC, dentro das áreas de proteção integral (objetivam a conservação de biodiversidade, estando em minoria dentro da província biogeográfica - 26% das UC's), as reservas biológicas são definidas como áreas de preservação integral da biota, sem interferência humana dentro de seus limites, exceto, para ações de manejo visando sua preservação e recuperação. Apesar de ser um dos tipos de Unidade de Conservação mais restritos quanto a presença humana direta, há 22 populações que influenciam a ReBio Guaribas em decorrência de fatores históricos de ocupação e pela ausência de uma zona de amortecimento efetiva ao redor das três áreas que compõem a Reserva. Essas populações são predominantemente rurais e causam impactos diretos, com o uso de madeira e plantas da reserva, e indiretos, causando assoreamento dos rios e contaminação dos lençóis freáticos pelo uso de fossas sépticas e liberação de químicos agrícolas no solo, promovendo possíveis respostas ecofisiológicas comparáveis na ictiofauna de dentro e fora da UC (ARRUDA, 2013).

A avaliação ecofisiológica do impacto humano na mata, que é próxima a áreas de monocultura e vegetação natural modificada para agropecuária, foi guiada majoritariamente pela chave de identificação de espécies de peixes da ReBio Guaribas produzida por Gouveia (2014), em estudo que lista 17 espécies de cinco ordens diferentes: Characiformes (11 espécies), Perciformes (3 espécies), Synbranchiformes (1 espécie), Siluriformes (1 espécie) e Cyprinodontiformes (1 espécie). Destas, duas são exóticas - *Oreochromis niloticus* (conhecida como tilápia do nilo), segunda maior espécie de peixe em criação no mundo e tolerante a variação, e *Poecilia reticulata* (conhecida como barrigudinho), amplamente utilizada no controle de mosquitos e por ser resistente a ambientes estressantes (MIRANDA, 2012) - e nenhuma das espécies listadas está ameaçada. A predominância de peixes de pequeno porte explica o alto endemismo nos riachos, decorrente da especiação alopátrica gerada pelo baixo deslocamento realizado por esses peixes e

do consequente isolamento de populações (GOUVEIA, 2014). Tendo em mente essa proximidade filogenética dos peixes de riachos, o trabalho aqui realizado apresenta dados representativos para toda a ictiofauna local utilizando uma única espécie, *Hemigrammus unilineatus*, espécie da ordem Characiformes, de corpo comprimido e ligeiramente alongado, de coloração castanho-amarelada, com manchas negras na região ventral do corpo, na nadadeira anal e sobre os raios da nadadeira dorsal, e de ampla distribuição geográfica nas Américas Central e do Sul, com registros em outros estados brasileiros, como Alagoas e Pernambuco (SERRA, 2010).

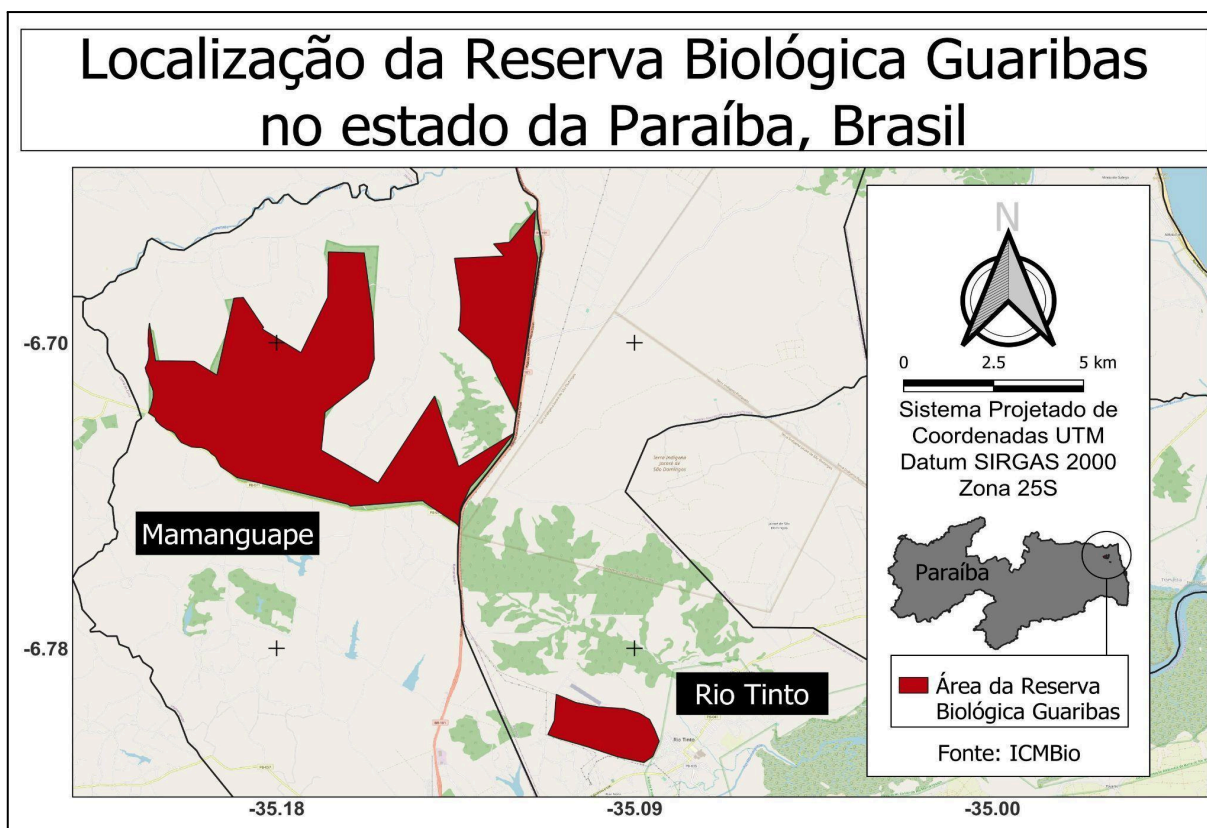


Figura 1 - Localização da Reserva Biológica Guaribas no estado da Paraíba, Brasil.

Os dados ecológicos, como riqueza e abundância de espécies, são os mais estudados e representam como os animais aquáticos lidam com a poluição em geral, mas a toxicidade responsável por essas mudanças comportamentais depende do organismo, tempo de exposição e tipo de partícula, o que demonstra a necessidade de se realizar estudos fisiológicos, especialmente em ambientes naturais (AMOATEY e BAAWAIN, 2019). Assim como a fisiologia, os aspectos morfológicos e comportamentais das espécies representam como suas funções no ecossistema são desempenhadas, sendo chamadas de características funcionais, comumente estudadas pelos atributos de resistência e resiliência. Mudanças nessas características refletem mudanças ambientais que podem não ser vistas por parâmetros de diversidade taxonômica, o que ocorre quando espécies diferentes possuem funções semelhantes, reforçando o quanto esses estudos, ainda escassos, podem ser promissores (CAVALCANTI JÚNIOR, 2021).

Uma das principais funções fisiológicas afetadas por agentes poluidores (pesticidas, metais pesados, drogas, microplásticos e etc) é a osmorregulatória, e que, assim como o controle de pH, é feita predominantemente pelas brânquias, além

de fundamentais nas trocas gasosas, regulação iônica e excreção de nitrogênio na forma de amônia. Suas funções são realizadas, em parte, pelo controle hormonal do fluxo sanguíneo (realizado por catecolaminas, que reduzem a resistência vascular nas brânquias - via beta-adrenoreceptores - e aumentam o fluxo sanguíneo na artéria eferente - via alfa-adrenoreceptores), e, principalmente, pelo transporte de íons realizadas, provavelmente, nas células de cloreto do epitélio filamentososo, as quais possuem enzimas transportadoras chamadas ATPases dependentes de sódio/potássio (EVANS, 1987).

A ação de compostos tóxicos nas brânquias gera uma série de histopatologias em resposta ao estresse, como necrose e descamação epitelial, geradas mais frequentemente por falhas na osmorregulação celular devido a inibição de ATPases e comprometimento morfológico das células de cloreto ou das brânquias como um todo. O efeito dessa ação no organismo pode ser medido através de alguns marcadores no sangue, principalmente níveis diminuídos de íons Cloro e Sódio, obtidos pelos peixes de água doce pela troca com íons internos (EVANS, 1987), e proteínas plasmáticas elevadas (Sabae e Mohamed, 2015).

O nível de hidratação de brânquias e músculo (Teor Hídrico) é um parâmetro fisiológico ligado à capacidade do animal de lidar com a variação de salinidade, e que, por isso, sofre efeitos mensuráveis da ação de compostos tóxicos no ambiente. Este parâmetro de controle ativo foi discutido por Ayrapetyan (2012) como um biomarcador universal para detecção de poluição no ambiente, sendo comprovado por David et al (2018) em estudo com ostras osmoconformadoras e eurialinas sob efeitos de salinidades diferentes, porém habituais, e, de forma mais discreta, no estudo de Sabae e Mohamed (2015) com peixe de água doce.

Outro marcador biológico relevante é a atividade anormal do fenótipo de resistência a multixenobióticos (MXR), um gene inato de muitas espécies aquáticas que é expresso em órgãos como brânquias, rins, barreira hematoencefálica, fígado e pâncreas. Sua ativação é feita pela exposição de poluentes e resulta na produção de glicoproteínas de membrana-P (Pgp), que atuam na retirada de componentes tóxicos endógenos ou exógenos para fora da célula, protegendo o DNA e induzindo sua excreção. Apesar do MXR explicar como algumas espécies são mais resistentes à presença de poluentes, algumas substâncias podem reverter sua efetividade, sendo chamadas de *chemosensitizers* (quimiossensibilizantes, em tradução livre, ou simplesmente chamados de inibidores do fenótipo MXR). Estes compostos podem anular a atividade de Pgp, alterar a regulação do mecanismo, saturar ou até mesmo reverter a atividade de MXR, agindo, neste caso, na retirada desses compostos com alta ligação a bomba ppg e permitindo que outros xenobióticos entrem na célula e aumentem sua toxicidade, mesmo que os quimiossensibilizantes não sejam tóxicos. Justamente por serem em maioria orgânicos, naturais, primariamente inofensivos e muito presentes nos materiais emitidos antropicamente na natureza, a detecção desses agentes inibidores de MXR também deve ser prioridade em estudos de risco ambiental (SMITAL e KURELEC, 1998).

A identificação de biomarcadores de estresse fisiológico nos peixes coletados tem como objetivo principal avaliar a saúde ecológica de pontos dentro e fora da UC, a fim de comparar quantitativamente a influência da ação antrópica com os dados de um ambiente legalmente protegido, promovendo uma abordagem mais palpável em contraste com outros trabalhos científicos que realizam apenas a avaliação qualitativa de Unidades de Conservação, e utilizando marcadores mais específicos em contraste com trabalhos que exploram apenas as consequências ecológicas da exposição à poluição.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os pontos de coleta foram previamente catalogados e numerados pelo colaborador deste trabalho (prof. dr. Elvio Sérgio Figueiredo Machado) em trabalhos anteriores, sendo utilizados três pontos amostrais dentro da Reserva Biológica Guaribas (n de peixes coletados=92) e três pontos no entorno (n=97) da mesma (Figura 2), sendo numerados, em ordem, P5 (n=29), P6 (n=31) e P7 (n=32), e P8 (n=28), P9 (n=35) e P10 (n=34), entre Outubro e Novembro de 2023.

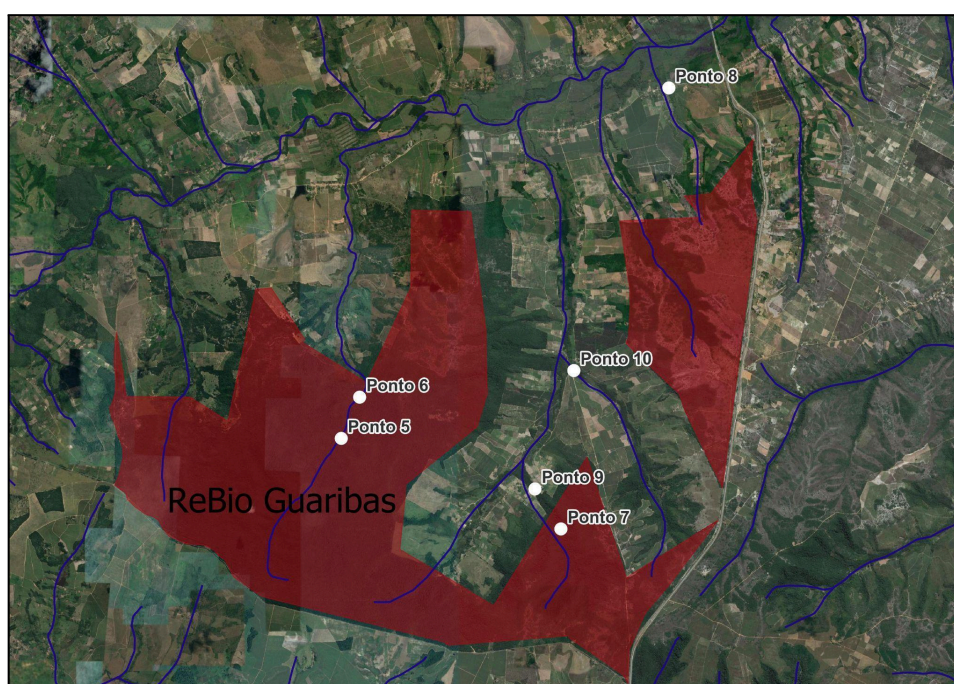


Figura 2 - Localização dos pontos de coleta dentro (P5 - 06° 42' 40,17764" S, 35° 10' 39,81853" W -, P6 - 06° 42' 17,47922" S, 35° 10'29,73711"W - e P7 - 06°43'30.05004"S, 35°08'39.27784"W) e fora da ReBio Guaribas (P8 - 06° 39' 27.17598" S, 35° 07' 40.03858" W -, P9 - 06° 43' 08.00821" S, 35° 08' 53.51826" W - e P10 - 06° 42' 02.83023" S, 35° 08' 32.18162" W). No total, foram capturados 92 peixes dentro da Unidade de Conservação e 97 em seu entorno.

Por motivos de uniformização dos dados, somente peixes da espécie *Hemigrammus unilineatus* (Figura 3) foram analisadas, por ter sido encontrada em todos os pontos e em abundância, sendo capturados com uso de puçá, em movimentos de varredura nas águas rasas dos riachos. Para um manejo facilitado, os espécimes foram transportados em sacos plásticos com ar e água local até o Laboratório de Ecofisiologia Animal (UEPB-Campus V/João Pessoa).

Para analisar a função osmorregulatória dos peixes, amostras de sangue foram coletadas de parte dos exemplares capturados (38 peixes de dentro da reserva e 40 de fora). Para tanto, esses indivíduos foram anestesiados com Eugenol e uma alíquota de sangue foi obtida através de punção no coração, com auxílio de

uma pipeta com ponteira heparinizada. As amostras obtidas foram mantidas em gelo e na sequência o plasma foi separado das células por centrifugação. Devido ao baixo volume de plasma obtido, em razão do tamanho pequeno dos peixes, as dosagens do íon Cloro não puderam ser realizadas. Destes mesmos animais, brânquias e músculo foram coletados para o cálculo do teor hídrico dos tecidos. As amostras de plasma e de tecidos foram armazenadas em freezer a -20°C até a realização das análises. A outra parte dos peixes capturados (54 de dentro da reserva e 57 de fora) foi utilizada para análise do fenótipo MXR.



Figura 3 - *Hemigrammus unilineatus*.

2.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

As amostras do plasma foram descongeladas e uma alíquota de $2\ \mu\text{L}$ de cada uma foi diluída com $8\ \mu\text{L}$ de água destilada (razão 1/5) para dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), cujo colorante também fora diluído na razão 1/5. A intensidade da coloração de cada amostra foi medida em uma leitora de microplacas (SpectraMax i3) no comprimento de onda de $595\ \text{nm}$, e comparada com uma curva padrão (proteína BSA). Os resultados foram transferidos para uma planilha, onde foi calculado o valor médio em miligramas da dosagem de proteínas plasmáticas para cada ponto, seguido de um teste de análise de variância (ANOVA) unilateral calculado no Google Planilhas com a extensão XLMiner Analysis ToolPak para determinar a uniformidade dos dados dos pontos do interior e do entorno da ReBio Guaribas.

2.3 TEOR HÍDRICO

As amostras de tecido foram armazenadas individualmente em eppendorfs de $2\ \text{mL}$ (previamente pesados), pesados inicialmente com o tecido úmido, e, depois de passarem 24 horas em estufa a $60^{\circ}\ \text{C}$, pesados com o tecido seco. Os resultados foram transferidos para uma planilha, onde foi calculado o teor hídrico percentual dos tecidos e o valor médio para cada ponto, seguido de um teste ANOVA unilateral calculado no Google Planilhas com a extensão XLMiner Analysis ToolPak para determinar a uniformidade desses dados.

2.4 ATIVIDADE DO FENÓTIPO MXR

A atividade do fenótipo MXR foi analisada através do ensaio de acúmulo de rodamina B adaptado de Smital e Kurelec (1998). A rodamina B é um substrato da glicoproteína-P, base molecular do fenótipo MXR, assim, após exposição dos peixes a esse substrato, a análise da quantidade de rodamina acumulada nos tecidos do animal (principalmente a brânquia) reflete a atividade do fenótipo MXR, quanto maior o acúmulo, menor atividade, e quanto menor o acúmulo, maior a atividade. Sendo assim, parte dos peixes de cada ponto amostral (pontos amostaris = 6, 3 dentro da UC e 3 fora) foram transferidos para aquários de plástico contendo água declorada e rodamina B na concentração 2,5 μM e ficaram nessa condição por 1 hora. O aquário permaneceu sob aeração constante e foi protegido da incidência direta de luz. Após a exposição, os animais foram anestesiados com Eugenol e então sacrificados para amostragem das brânquias. As amostras dos tecidos foram colocadas em tubos eppendorfs e pesadas em balança analítica. O peso úmido do tecido foi obtido subtraindo o peso dos eppendorfs que foram pesados previamente. Os tecidos foram então homogeneizados em 500 μl de água destilada e o sobrenadante transferido em triplicata de 100 μl para uma microplaca escura de 96 poços. A intensidade de fluorescência desse sobrenadante (que corresponde à fluorescência da rodamina intracelular no tecido) foi então medida em uma leitora de microplacas (SpectraMax i3) com 544 nm excitação e 590 nm emissão. O valor de fluorescência foi então normalizado pelo peso úmido do tecido em miligramas, seguido de um teste ANOVA unilateral calculado no Google Planilhas com a extensão XLMiner Analysis ToolPak para determinar a uniformidade desses dados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 DADOS ABIÓTICOS

Dados	Média Dentro	Média Fora	Proporção (fora/dentro)
Amônia ($\mu\text{g}^*\text{L}$)	61,91	135,40	2,187
Nitrito ($\mu\text{g}^*\text{L}$)	0	0	0
Nitrato ($\mu\text{g}^*\text{L}$)	45.462,61	45.405,00	0,999
O-fosfato ($\mu\text{g}^*\text{L}$)	0	0	0
Fósforo ($\mu\text{g}^*\text{L}$)	45.361,00	45.427,25	1,001
Clorofila-A	N/A	N/A	N/A
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25,844	27,011	1,045
Oxigênio Dissolvido (mg^*L)	7,844	6,922	0,882
pH	6,414	6,461	1,007

Tabela 1 - Nutrientes e demais dados abióticos medidos e reunidos de acordo com a sua localização em relação a Reserva Biológica Guaribas.

Os dados abióticos da água de cada ponto foram mensurados e reunidos na Tabela 1, acima. A proporção anormal de amônia indica a presença de efluentes nas águas fora da Reserva Biológica Guaribas, e, como discutido por Piedras et al (2006), essa concentração elevada gera retenção de amônia metabólica, causando toxicidade. O mesmo estudo também informa que a toxicidade da amônia não ionizada no ambiente aquático é maior em organismos menores, mas depende da interação com outras variáveis ambientais, como temperatura, pH e salinidade, havendo necessidade de estudos específicos com a espécie *Hemigrammus unilineatus* para determinar sua tolerância à amônia.

3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

A média da dosagem de proteínas plasmáticas, parâmetro que se relaciona positivamente ao estresse ambiental, foi de 32,229 mg para os pontos dentro da Reserva Biológica Guaribas (n=18) e de 80,086 mg para os pontos fora (n=26), revelando uma concentração quase 150% maior nos locais com mais influência humana (Gráfico 1). O número total de dosagens de plasma (n=44) foi menor que o total de peixes capturados (n=78) pela dificuldade em coletar o sangue dos exemplares de menor tamanho, além da necessidade de coletar uma quantidade mínima de plasma necessária no método de Bradford. O p-valor obtido no teste ANOVA unilateral foi menor que 0,05 nos pontos dentro da ReBio (Tabela 2), demonstrando que há uma uniformidade estatística na área legalmente preservada, diferentemente dos pontos fora da mesma, cujo p-valor foi maior que 0,05 (variância significativa). Também foram feitas comparações no teste ANOVA entre os três pontos de dentro da Reserva em relação a cada ponto de fora, onde houve variação significativa quando adicionados os pontos P8, P9 e P10, concluindo que realmente não há semelhança entre a concentração de proteínas plasmáticas dos peixes dentro da reserva com os de fora.

Teste ANOVA	F	p-valor	Resultado
Dentro (P5+P6+P7)	2,02	0,17	Não Significativo
Fora (P8+P9+P10)	4,05	0,03	Significativo
Dentro+P8	58,64	0,00	Significativo
Dentro+P9	71,50	0,00	Significativo
Dentro+P10	41,83	0,00	Significativo

Tabela 2 - Resultados do teste de Análise de Variância com os dados de proteínas plasmáticas.

O aumento da concentração de proteínas totais em animais expostos à poluição é compatível com o estudo de Sabae e Mohamed (2015), que atribui esse aumento a cinco possibilidades: ativação de sistemas metabólicos em resposta a exposição de poluentes, degradação de material celular no fígado, condições patológicas severas no fígado e rins, perda de água no plasma e indução de síntese protéica no fígado.

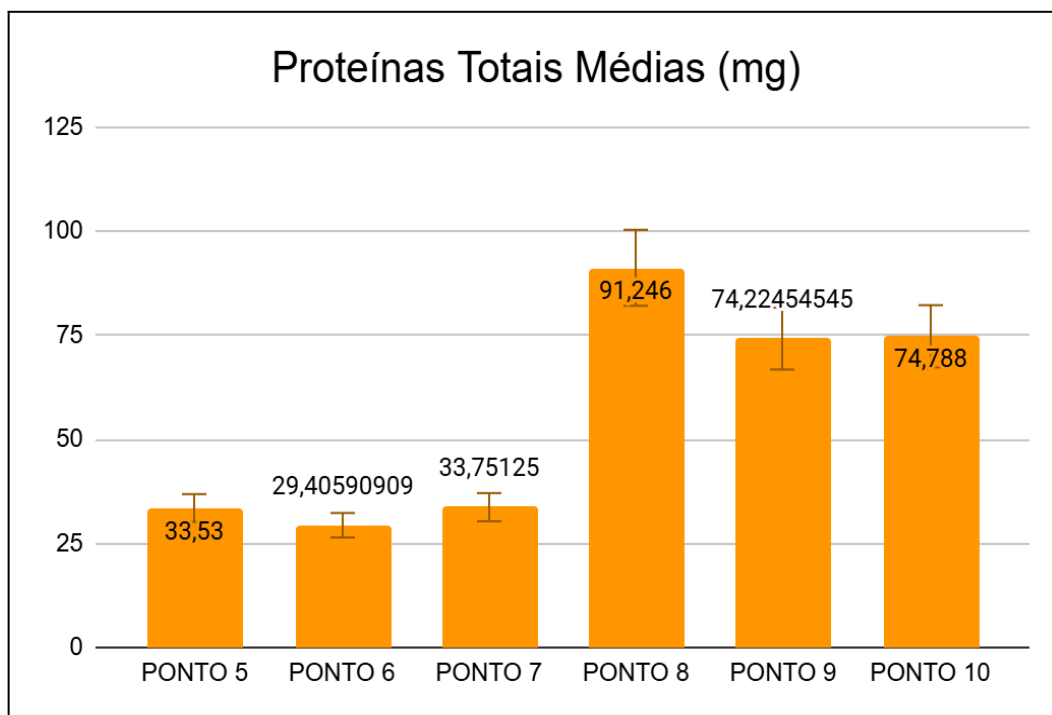


Gráfico 1 - Proteínas totais médias (mg) dos pontos de dentro (P5, P6 e P7) e de fora da ReBio Guaribas (P8, P9 e P10).

3.3 TEOR HÍDRICO

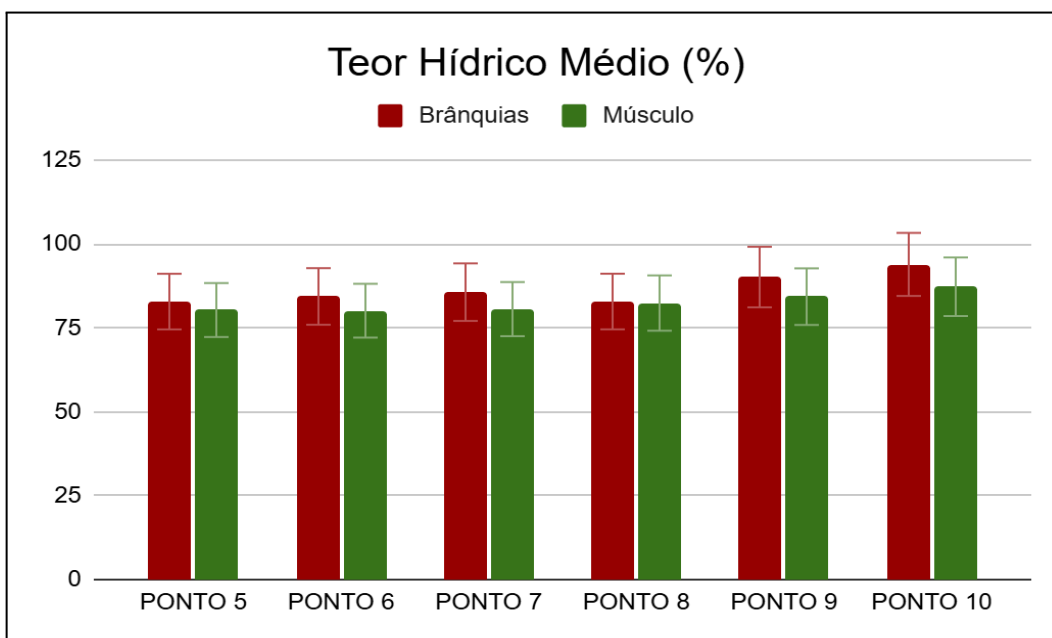


Gráfico 2 - Teor Hídrico médio (%) dos pontos de dentro (P5, P6 e P7) e de fora da ReBio Guaribas (P8, P9 e P10).

As médias do teor hídrico, parâmetro que se relaciona com a função osmorregulatória, foram de 84,268% para as brânquias e de 80,332% para o músculo nos pontos dentro da ReBio Guaribas (n=38). Já para os pontos fora (n=40), as médias foram de 88,954% para as brânquias e de 82,317% para o músculo, acrescentando, em ordem, apenas cerca de 5,6% e 2,5% dos valores de

dentro (Gráfico 2), resultados pouco expressivos, assim como os vistos no trabalho de HAREDI (2020). Entretanto, o p-valor obtido no teste ANOVA unilateral demonstrou diferença estatística tanto para os dados das brânquias quanto do músculo dos peixes dos pontos fora da ReBio Guaribas (Tabela 3), o que não se viu, mais uma vez, na análise dos 3 pontos dentro da mesma. Foram feitas comparações adicionais entre os três pontos de dentro adicionados a cada ponto de fora no teste ANOVA, onde houve correspondência positiva com o ponto P8 tanto para brânquias quanto para músculo (p-valor maior que 0,05) e negativas para P9 e P10.

A baixa diferença das médias de teor hídrico dos peixes dentro e fora da UC (incluindo semelhança estatística entre P8 e os pontos dentro da reserva) reforçam este como um parâmetro mais discreto e ineficiente para comparação quantitativa direta de animais expostos a baixa variação de salinidade no ambiente, mas que atestam eficientemente o grau de uniformidade dos dois grupos comparados (peixes de dentro e de fora da UC).

Teste ANOVA	F	p-valor	Resultado
Brânquias Dentro (P5+P6+P7)	0,49	0,62	Não Significativo
Músculo Dentro (P5+P6+P7)	0,07	0,93	Não Significativo
Brânquias Fora (P8+P9+P10)	31,64	0,00	Significativo
Músculo Fora (P8+P9+P10)	3,49	0,04	Significativo
Brânquias Dentro+P8	0,71	0,55	Não Significativo
Brânquias Dentro+P9	3,63	0,02	Significativo
Brânquias Dentro+P10	8,78	0,00	Significativo
Músculo Dentro+P8	1,54	0,22	Não Significativo
Músculo Dentro+P9	4,85	0,01	Significativo
Músculo Dentro+P10	6,12	0,00	Significativo

Tabela 3 - Resultados do teste de Análise de Variância com os dados de teor hídrico.

3.4 ATIVIDADE DO FENÓTIPO MXR

As médias da fluorescência normalizada medida nas brânquias dos peixes coletados foram de 25.449,193 rfu/mg (unidades de fluorescência relativa/miligrama de tecido) dentro da Unidade de Conservação (n=54) e de 67.138,295 rfu/mg fora da mesma (n=57), valor aproximadamente 2,64 vezes maior. Esta diferença, ilustrada no Gráfico 3 e oposta ao que se esperava para tal experimento, pode ser explicada pela presença de inibidores do fenótipo MXR, cujas concentrações foram altamente correlacionadas a águas mais poluídas no estudo de Kurelec et al (2000). Entre os possíveis poluentes presentes, pesticidas, fragrâncias, produtos de degradação microbiana e inibidores naturais oriundos de espécies invasoras foram descritos como compostos com alta probabilidade de afinidade a Pgp ou de inibição do modulador PKC (proteína quinase C), resultando em alto acúmulo de Rodamina B (SMITAL, 2004). Além disso, também foram realizados testes ANOVA para os pontos dentro e fora da UC (Tabela 4), novamente com resultados contrários ao esperado, especialmente após as correlações da dosagem de proteína e de teor hídrico,

havendo diferença estatística entre os dados da fluorescência dentro da ReBio Guaribas enquanto houve relação positiva entre os três pontos de fora. Porém, correlações posteriores mostraram que a diferença visual entre as fluorescências médias presente no Gráfico 3 também é apoiada estatisticamente (vide “Dentro x Fora” na Tabela 4), e os dados do ponto 5 foram os responsáveis pela diferença estatística entre os dados de dentro da reserva (análise somente com P6 e P7).

Teste ANOVA	F	P-valor	Resultado
Dentro (P5+P6+P7)	10,61	0,00	Significativo
Fora (P8+P9+P10)	0,70	0,50	Não Significativo
Dentro x Fora	75,85	0,00	Significativo
Dentro+P8	37,43	0,00	Significativo
Dentro+P9	23,33	0,00	Significativo
Dentro+P10	16,96	0,00	Significativo
P5+P6	13,61	0,00	Significativo
P6+P7	1,48	0,23	Não Significativo
P5+P7	10,42	0,00	Significativo

Tabela 4 - Resultados do teste de Análise de Variância com os dados da atividade do fenótipo MXR.

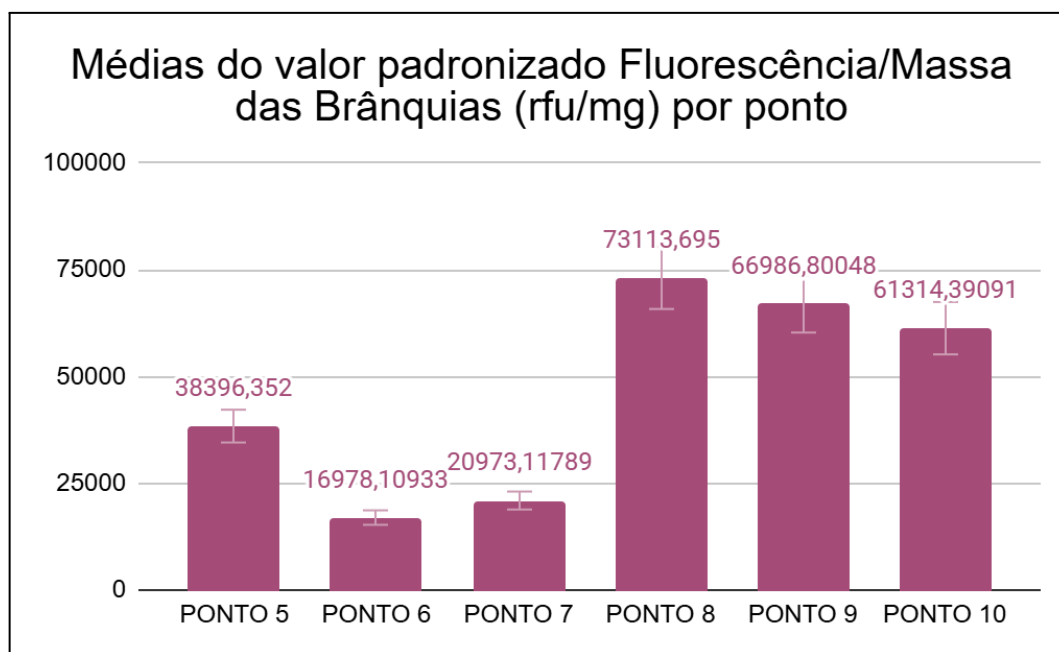


Gráfico 3 - Dados da fluorescência média dos pontos dentro (P5, P6, P7) e fora da ReBio Guaribas (P8, P9, P10), expressa em unidades de fluorescência relativa/milograma de tecido (brânquia).

4 CONCLUSÃO

As análises estatísticas do teor hídrico tecidual de brânquias e músculo e da dosagem de proteínas plasmáticas dos peixes capturados dentro da Unidade de Conservação mostraram resultados uniformes entre os três pontos de coleta, em

especial os índices de Teor Hídrico de músculo e brânquias, condizente com o que se espera de ambientes naturais com pouca influência humana. Já para fora da UC, os resultados mostraram diferenças estatísticas nos dois parâmetros fisiológicos analisados entre os três pontos e em comparação com os pontos de dentro, evidenciando que há alterações ambientais impactando os peixes dos riachos estudados, principalmente em relação à elevação de proteínas plasmáticas, que respondem positivamente com a presença de estresse fisiológico (Gráfico 4).

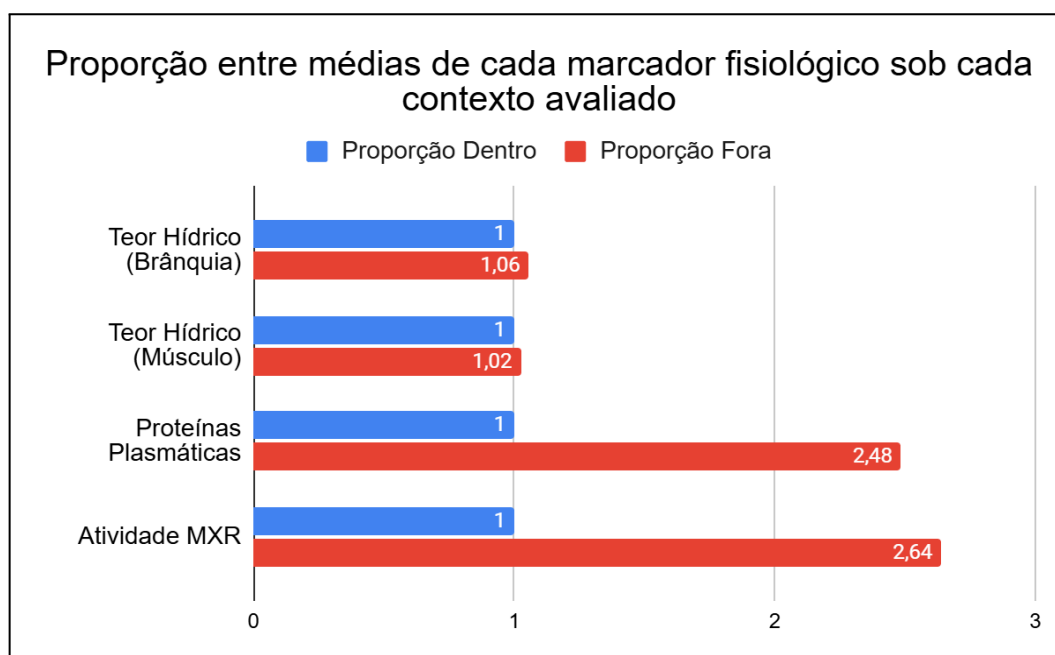


Gráfico 4 - Proporção entre os valores médios obtidos de cada marcador fisiológico analisado, comparando cada um de acordo com sua relação com a Reserva Biológica Guaribas.

Esses dados preliminares obtidos foram precisos em indicar que há diferença significativa nas condições do meio em que os peixes coletados viviam, incluindo os dados de MXR, porém estes mostraram valores inversos ao esperado, e com inconsistência entre o ponto 5 e os outros pontos dentro da UC, além de alta fluorescência nos tecidos dos peixes de fora dela, o que normalmente se relaciona a baixa atividade do fenótipo MXR. Porém, esta inconsistência pode ser explicada pela possível presença de quimiossensibilizantes na água, já que os peixes não passaram por período de descontaminação, e, assim, poluentes ambientais poderiam estar ligados ao sítio ativo da Pgp e impedindo a ligação da rodamina ao mesmo. A presença desses quimiossensibilizantes pode ser quantificada através da criação de uma curva de calibração, como descrito por Kurelec et al (2000), mas, até ser realizada, a análise do fenótipo MXR deve ter sua relevância reduzida ao contexto estatístico.

Dos resultados finais, faz-se uma avaliação positiva importante com relação a proteção ambiental que uma Unidade de Conservação exerce em sua extensão, mesmo ao analisar uma Reserva Ambiental com problemas históricos de delimitação e que ainda não está totalmente livre de impactos antrópicos. Somando o fato de estar localizada dentro da Mata Atlântica, classificado como um *Hotspot*, a comprovação da eficiência de uma UC nessa província biogeográfica é ainda mais relevante, pois reforça a necessidade dos governos criarem mais áreas legalmente protegidas como estratégia chave na redução da crise ecológica global. O estudo

também realizou uma importante descrição do uso de marcadores fisiológicos em análises ecológicas, elevando o potencial da ecofisiologia como base de futuros ensaios, podendo ser incorporada a índices de efetividade como o visto no artigo de Masullo et al (2020) e apresentando dados quantificáveis que podem complementar estudos com análise de dados históricos e geográficos, como o de Assis, Faria e Bayer (2021).

REFERÊNCIAS

AMOATEY, P.; BAAWAIN, M.S. **Effects of pollution on freshwater aquatic organisms**. Water Environ Res, Set. 2019, Volume 91, Páginas 1272-1287.

ARRUDA, D.B.; CUNHA, B.P.; RÊGO, K.M.C. **Conflitos entre ReBio Guaribas e comunidades locais: (in)justiça ambiental e ecologia política**. Revista Direitos Emergentes na Sociedade Global, Volume 2, Número 2, Jul./Dez. 2013.

ASSIS, P.C.; FARIA, K.M.S; BAYER, M. **Unidades de Conservação e sua efetividade na proteção dos recursos hídricos na Bacia do Rio Araguaia**. Sociedade & Natureza, Dez. 2021, Uberlândia - MG, Volume 34.

AYRAPETYAN, S. **Cell hydration as a universal marker for detection of environmental pollution**. Environmentalist, 2012, Volume 32, Páginas 210–221.

BRADFORD, M.M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. Analytical Biochemistry, Jan. 1976, Volume 72, Páginas 248-254.

CAVALCANTI JÚNIOR, M.M. **Funcionamento de Rios Intermitentes sob Influência da Transposição do Rio São Francisco**. 2021. Tese de doutorado (Doutorado em Ecologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

DAVID, D.D. et al. **Capacity of tissue water regulation is impaired in an osmoconformer living in impacted estuaries?** Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, Volume 166, Páginas 375-382.

EVANS, D.H. **The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants**. Environmental Health Perspectives, Abr. 1987, Volume 71, Páginas 47-58.

GOUVEIA, R.S.D. **Ictiofauna da Reserva Biológica Guaribas e seu entorno (Paraíba, Brasil)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, João Pessoa, 2014.

HAREDI, A.M.M. et al. **Lake Edku pollutants induced biochemical and histopathological alterations in muscle tissues of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. Toxicology and Environmental Health Sciences, 2020, Volume 12, Páginas 247-255.

KURELEC, B. et al. **Multixenobiotic Resistance, P-Glycoprotein, and Chemosensitizers**. Ecotoxicology, 2000, Volume 9, Páginas 307–327.

MASULLO, Y.A.G. et al. **Avaliação da efetividade em unidades de conservação: um estudo de caso no estado do Maranhão, Brasil**. Revista Tamoios, São Gonçalo, Ano 16, Edição 3, Dez. 2020.

MIRANDA, J.C. **Ameaças aos peixes de riachos da Mata Atlântica**. Natureza On Line, Set. 2012, Volume 10, Páginas 136-139.

MYERS, N. et al. **Biodiversity hotspots for conservation priorities**. Nature, Volume 403, Fev. 2000, Páginas 853–858.

PIEDRAS, S.R.N. et al. **Toxicidade aguda da amônia não ionizada e do nitrito em alevinos de *Cichlasoma facetum* (Jenyns, 1842)**. Ciênc. agrotec., Lavras, Volume 30, Edição 5, Páginas 1008-1012, Out. 2006.

SABAE, S.Z.; MOHAMED, F.A.S. **Effect of Environmental Pollution on the Health of Tilapia spp. from Lake Qarun**. Global Veterinaria, 2015, Volume 14 (3), Páginas 304-328.

SERRA, J.P. **Análise filogenética das espécies de *Hemigrammus* Gill, 1858 (Characiformes, Characidae)**. Tese de doutorado (Doutorado em Biologia Animal) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, 2010.

SMITAL, T.; KURELEC, B. **The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants**. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Mar. 1998, Volume 399, Edição 1, Páginas 43-53.

SMITAL, T. et al. **Emerging contaminants-pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms**. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Ago. 2004, Volume 552, Edições 1-2, Páginas 101-117.

UDVARDY, M.D.F. **A classification of the biogeographical provinces of the world**. Morges (Switzerland): International Union of Conservation of Nature and Natural Resources. IUCN Occasional paper, Volume 18, 1975.