

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA [NOTURNO]

Guilherme de Espindola da Silveira

**EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR METAIS E METALOIDES E
PARÂMETROS ECOLÓGICOS SOBRE OS NÍVEIS DE
METALOTIONEÍNAS NO FÍGADO DE ALBATROZES-DE-
SOBRANCELHA (*THALASSARCHE MELANOPHRIS*)**

Florianópolis

2024

GUILHERME DE ESPINDOLA DA SILVEIRA

**EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR METAIS E METALOIDES E
PARÂMTROS ECOLÓGICOS SOBRE OS NÍVEIS DE
METALOTIONEÍNAS NO FÍGADO DE ALBATROZES-DE-
SOBRANCELHA (*THALASSARCHE MELANOPHRIS*)**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) submetido
ao curso de Ciências Biológicas – Licenciatura
[noturno] da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a obtenção do título
de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: MSc. Patricia Pereira Serafini

Coorientadora: Profa. Dra. Karim Hahn Lüchmann

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

da Silveira, Guilherme

Efeitos da contaminação por metais e metaloides e parâmetros ecológicos sobre os níveis de metalotioneínas no fígado de albatrozes-de-sobrancelha (*Thalassarche melanophris*) / Guilherme da Silveira ; orientadora, Patricia Serafini, coorientadora, Karim Lüchmann, 2024.
54 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Albatroz-de-sobrancelha. 3. Metais. 4. Metalotioneínas. 5. Biomarcadores. I. Serafini, Patricia. II. Lüchmann, Karim. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Guilherme de Espindola da Silveira

**Efeitos da contaminação por metais e metaloides e parâmetros ecológicos
sobre os níveis de metalotioneínas no fígado de albatrozes-de-sobrancelha
(*Thalassarche melanophris*)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título
de Licenciado em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de
Ciências Biológicas – Licenciatura [noturno]

Florianópolis, 10 de dezembro de 2024

Profra. Dra Daniela Cristina de Toni
Coordenadora do Curso

Banca examinadora:

Orientadora: MSc Patricia Pereira Serafini
Universidade Federal de Santa Catarina / ICMBio

Profra. Dra Maria Risoleta Freire Marques
Membro titular
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas
Membro titular
Associação R3 Animal / Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer, primeiramente, a meus pais, Angela e Romualdo, e a minha querida irmã, Maria Luiza, pelo carinho e por todo o apoio que me forneceram, sem os quais eu não teria sido capaz de chegar ao fim desta longa jornada.

Agradeço a minha maravilhosa orientadora, Patricia Pereira Serafini, por acreditar em mim, por me dar seu total suporte, por compartilhar comigo seu vasto conhecimento, pelos seus conselhos, pelo seu companheirismo, pela sua amizade, e por se manter sempre radiante mesmo nos momentos mais difíceis. Ao longo deste caminho, a Patricia se tornou um grande exemplo para mim, não apenas como pesquisadora, mas também como pessoa. Como já falei algumas vezes, mas não me canso de repetir, espero poder ser igual a ela quando crescer!

A minha coorientadora, professora Karim Hahn Lüchmann, meu muito obrigado pelas suas dicas valiosas e por todo o seu apoio durante o desenvolvimento da minha pesquisa e a elaboração do meu projeto.

Quero agradecer profundamente a todos os membros do LABCAI por me acolherem ao longo dos últimos dois anos e meio, durante os quais compartilhamos muitas risadas e momentos de alegria. Meu muitíssimo obrigado a Daina, Bárbara, Camila, Vanessa, Clei, Juliana, Jacó e Miguel pela enorme ajuda com a padronização dos experimentos e pelas dicas e discussões valiosas. Agradeço novamente a Daina e a Vanessa por também me auxiliarem na produção das figuras. Agradeço muito a Beatriz, Ana Beatriz, Deivid, Ligia, Luiz, Luiza e Thiago pela amizade e parceria. Sou muito grato ao professor Afonso Celso Dias Bairy por abrir para mim as portas do laboratório e me dar liberdade para utiliza-lo durante a realização do meu trabalho. Enfim, todos me ajudaram de tantas formas diferentes que tenho dificuldade de listar todas, e para mim o LABCAI foi, ainda é, como uma segunda família.

Aos professores Guilherme Brito e Marcelo Farina, muito obrigado por avaliarem o meu projeto de pesquisa. Agradeço também a professora Maria Risoleta Freire Marques, a dra. Cristiane Kolesnikovas, e, novamente, ao professor Afonso por aceitarem fazer parte da banca avaliadora do meu TCC.

Eu gostaria de agradecer também a todos os demais colegas e professores com quem tive o prazer de conviver ao longo de toda a minha graduação. Em especial, ao professor Giordano Wosgrau Calloni, por me acolher na equipe do LPDCCN logo no início da graduação e me introduzir ao mundo das pesquisas acadêmicas.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer a Universidade Federal de Santa, a Petrobrás, e a equipe do LAMEB, sem os quais o desenvolvimento desta pesquisa não seria possível.

LISTA DE ABREVIATURAS

As	Arsênio
Ba	Bário
Cd	Cádmio
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DTNB	5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FA	Fator de alerta
GAM	Modelo aditivo generalizado
GLM	Modelo linear generalizado
GSH	Glutathiona
HCl	Ácido clorídrico
Hg	Mercúrio
IL-6	Interleucina-6
LABCAI	Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
MeHg	Metilmercúrio
Mn	Manganês
Mn-SOD	Manganês superóxido desmutase
Mo	Molibdênio
MT	Metalotioneínas
NaCl	Cloreto de sódio
Ni	Níquel
Pb	Chumbo
PR	Paraná
PMP-BS	Programa de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
SC	Santa Catarina
Se	Selênio
SIMBA	Sistema de Informação e Monitoramento da Biota Aquática

SP	São Paulo
TGI	Trato gastrointestinal
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
V	Vanádio
Zn	Zinco

RESUMO

Metais e metaloides são encontrados naturalmente na biosfera, mas atividades antropogênicas podem resultar na liberação de grandes quantidades desses elementos nos ecossistemas aquáticos, oferecendo riscos para comunidades ecológicas. As metalotioneínas (MT) são proteínas de baixo peso molecular que atuam na desintoxicação de metais na maior parte dos seres vivos. Assim como observado em diversas espécies animais, estudos realizados com aves marinhas demonstram a existência de correlações lineares positivas entre as concentrações de metais e MT no fígado, rins e sangue, apontando para um potencial uso de MT como biomarcadores da contaminação por esses elementos em ambientes aquáticos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi adaptar as metodologias descritas na literatura para outras espécies e analisar os efeitos da contaminação por metais e metaloides no fígado de albatrozes-de-sobrancelha (*Thalassarche melanophris*) encontrados mortos na costa brasileira. Além disso, buscou-se compilar dados de estudos semelhantes realizados em aves marinhas, presentes na literatura.

Dentre os metais e metaloides analisados, somente o zinco apresentou correlação linear positiva com os níveis de MT no fígado, além de ter sido identificado por meio de um modelo aditivo generalizado (GAM) como a variável que melhor explica as variações observadas nos níveis de MT. Outras variáveis detectadas como preditoras significativas dos níveis de MT através do GAM foram as concentrações de cádmio, cobre, mercúrio e manganês no fígado, a massa corporal e a presença de resíduos plásticos no trato gastrointestinal. Em todos os casos, as relações identificadas entre os metais e os níveis de MT apresentaram padrões complexos, sugerindo a possível atuação de outros mecanismos de desintoxicação. Além disso, este trabalho também investigou os diferentes fatores que poderiam ter influenciado as concentrações de metais observadas nos indivíduos analisados.

Palavras-chave: Metalotioneínas; Metais; Metaloides; Aves marinhas; Albatroz-de-sobrancelha;

ABSTRACT

Metals and metalloids are naturally found in the biosphere, but anthropogenic activities can result in the release of large amounts of these elements into aquatic ecosystems, offering risks for ecological communities. Metallothionein (MT) are low molecular weight proteins that act in the detoxification of metals in most living beings. As observed in several animal species, studies developed with seabirds demonstrate the existence of positive linear correlations between metals and MT concentrations in the liver, kidneys and blood, suggesting a potential use of MT as biomarkers of metal contamination in aquatic environments. Therefore, the objective of the present work was to adapt methodologies described in the literature for other species and to analyze the effects of metal and metalloid contamination in the liver of black-browed albatross (*Thalassarche melanophris*) found dead on the Brazilian coast, in addition to compiling literature data from similar studies carried out on seabirds.

Among the analyzed metals and metalloids, only zinc showed a positive linear correlation with the MT concentration in the liver, in addition to being identified through a generalized additive model (GAM) as being the variable that better explains the variation observed in MT levels. Other variables detected through GAM as significative predictors of MT levels were the cadmium, copper, mercury and manganese concentrations in the liver, body mass and the presence of plastic residues in gastrointestinal tract. In all of the cases, the relationships observed between metals and MT showed complex patterns, suggesting a possible action of other detoxification mechanisms. Furthermore, this work also investigated the different factors that may have influenced the metal concentrations observed in the analyzed birds.

Keywords: Metallothioneins; Metals; Metalloids; Seabirds; Black-browed albatross;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 METODOLOGIA	18
3.1 Revisão bibliográfica	18
3.2 Coleta de amostras	18
3.3 Quantificação de metalotioneínas	19
3.3.1 Preparo de amostras	19
3.3.2 Análise espectrofotométrica	20
3.4 Análises estatísticas	21
3.4.1 Análises estatísticas básicas	21
3.4.2 Modelos estatísticos – Modelo aditivo generalizado (GAM)	21
3.5 Fator de alerta para as concentrações de metais e metaloides	22
4 RESULTADOS	24
4.1 Revisão bibliográfica	24
4.2 Quantificação de metalotioneínas e investigação da associação com metais e metaloides e demais variáveis individuais	27
4.3 Fator de alerta para as concentrações de metais e metaloides	38
5 DISCUSSÃO	42
5.1 Associação dos níveis de metalotioneínas com as concentrações de metais e metaloides e demais variáveis individuais	42

5.2 Associação das concentrações de metais e metaloides entre si e com demais variáveis individuais	46
6 CONCLUSÕES	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

Metais e metaloides ocorrem naturalmente na biosfera, derivados principalmente de atividades vulcânicas e do intemperismo de rochas continentais, podendo atingir o ambiente aquático a partir da lixiviação do solo e da deposição atmosférica. No entanto, diversas atividades antropogênicas (e.g., mineração, fundição e atividades agrícolas, industriais e urbanas) resultam na liberação de grandes quantidades desses elementos nos ecossistemas, oferecendo riscos às comunidades biológicas presentes nas áreas afetadas (RICHIR; GOBERT, 2016).

Certos metais (e.g., ferro, zinco, cobre, manganês), tidos como essenciais, são necessários para o desenvolvimento e manutenção da homeostase da maior parte dos organismos. Porém, caso presentes em concentrações elevadas, esses mesmos elementos podem gerar efeitos tóxicos nos seres vivos (SOUZA *et al.*, 2019). Por sua vez, outros metais (e.g., cádmio, mercúrio, chumbo), considerados não essenciais, não possuem nenhuma função fisiológica conhecida, e podem apresentar toxicidade mesmo em baixas concentrações (THERON; TINTINGER; ANDERSON, 2012). Efeitos negativos gerados pela exposição a altas concentrações de metais e metaloides já foram observados em aves, mas os efeitos sinérgicos desses elementos ainda são pouco conhecidos em nível populacional (MA *et al.*, 2022).

Nos animais, os metais são obtidos principalmente através da dieta, podendo interagir com diferentes componentes celulares ou serem armazenados e/ou desintoxicados principalmente pela formação de concreções insolúveis ou pelo sequestro por proteínas ligantes de metais, como as metalotioneínas (MT) (WALLACE; LEE; LUOMA, 2003; WALLACE; LUOMA, 2003). As MT são proteínas intracelulares de baixo peso molecular presentes em uma ampla variedade de seres vivos. Suas funções ainda não são completamente conhecidas, mas incluem: homeostase de metais essenciais para o organismo; desintoxicação de metais não essenciais; doação de metais a metaloproteínas; e defesa contra danos oxidativos (ISANI; CARPENÈ, 2014; AMIARD *et al.*, 2006). Duas isoformas de MT são encontradas nas aves, MT1 e MT2, codificadas por dois genes diferentes, ambas contendo 63 aminoácidos, incluindo 20 resíduos de cisteína em posições conservadas (ISANI; CARPENÈ, 2014).

As aves marinhas, por serem em geral muito longevas e ocuparem posições elevadas nas cadeias tróficas, tendem a acumular em seus tecidos grandes

concentrações de poluentes, como metais (EINODER; MACLEOD; COUGHANOWR, 2018; BURGER; GOCHFELD, 2004). Esses fatores, somado ao fato desses animais serem relativamente grandes, conspícuos e frequentemente coloniais, fazem das aves marinhas possíveis espécies-sentinela para o monitoramento da presença de contaminantes nos ambientes aquáticos que ocupam (BURGER; GOCHFELD, 2004). Os albatrozes cumprem todos os aspectos mencionados acima, e seu monitoramento pode fornecer informações referentes à contaminação em regiões oceânicas. Entretanto, o hábito pelágico dessas espécies dificulta seu estudo, uma vez que adultos e ninhegos usualmente são acessados apenas durante o período reprodutivo (BILLERMAN *et al.*, 2023; DEL HOYO *et al.*, 2020). Além disso, o comportamento migratório dessas aves torna a inferência do local de contaminação possível apenas por meio de análises de isótopos estáveis e/ou técnicas de rastreamento (RENEDO *et al.*, 2021; BAAK *et al.*, 2024).

Os albatrozes-de-sobrancelha (*Thalassarche melanophris*) (Figura 1), apresentam uma população estimada de aproximadamente 2.300.000 indivíduos, distribuídos ao longo de todos os oceanos do hemisfério sul do planeta. Sua alimentação é constituída principalmente de crustáceos e peixes, sendo com frequência observados seguindo embarcações pesqueiras. Assim como a maior parte das aves pelágicas, os albatrozes-de-sobrancelha permanecem parte considerável de suas vidas em alto mar, retornando a terra firme apenas para nidificar em colônias presentes em ilhas oceânicas isoladas, normalmente entre os meses de setembro e outubro. Em geral, essas aves nidificam anualmente nas mesmas colônias com os mesmos parceiros reprodutivos, depositando um único ovo e cuidando do filhote até o final de abril, quando retornam solitários a suas áreas de forrageamento em mar aberto. Devido a sua longevidade de décadas e sua posição na cadeia trófica, os albatrozes-de-sobrancelha tendem a acumular grandes concentrações de poluentes em seus tecidos ao longo de seu ciclo de vida (DEL HOYO *et al.*, 2020).

Figura 1: Albatrozes-de-sobrancelha (*Thalassarche melanophris*) juvenis. Fonte: Patricia Pereira Serafini.



Uma série de estudos realizados com diversas espécies de vertebrados e invertebrados tem apontado para o potencial das MT como biomarcadores de contaminação por metais e metaloides nos ecossistemas marinhos (AMIARD *et al.*, 2006). Dentre eles, estão incluídos trabalhos com aves marinhas, que demonstram a existência de correlações lineares positivas entre as concentrações de diferentes metais, principalmente cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn) e mercúrio (Hg), e os níveis de MT no fígado e nos rins da maior parte das espécies (ELLIOTT *et al.*, 1992; STEWART; FURNESS; MONTEIRO, 1996; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 1997; TRUST *et al.*, 2000; BARJAKTAROVIC; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 2002; KOJADINOVIC *et al.*, 2007; BRAUNE; SCHEUHAMMER, 2008; KEHRIG *et al.*, 2015; ROMERO *et al.*, 2015).

Recentemente, Lima *et al.* (2022) analisaram as concentrações dos metais Cd, cromo (Cr), Cu, chumbo (Pb), manganês (Mn), molibdênio (Mo), Zn, níquel (Ni), bário (Ba) e vanádio (V) e do metaloide arsênio (As) em amostras de fígado de biguá (*Nannopterum brasiliense*), de albatrozes-de-sobrancelha e de albatrozes-de-nariz-amarelo (*Thalassarche chlororhynchos*) obtidas de animais mortos coletados pelo Programa de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) ao longo de parte da costa brasileira. Especificamente no albatroz-de-sobrancelha, foram

observados níveis de As considerados elevados para a maior parte das aves pelágicas (LIMA *et al.*, 2022). No entanto, pouco se conhece sobre a relação entre a indução da biossíntese de MT e as concentrações de metais e metaloides bioacumulados nesses animais.

Nesse contexto, o presente trabalho buscou elucidar de que forma os níveis de MT no fígado de albatrozes-de-sobrancelha são influenciados pelas concentrações de metais e metaloides nesse órgão, além de avaliar outros fatores como sexo, massa corporal, escore corporal, presença de ectoparasitas e presença de endoparasitas e resíduos plásticos no trato gastrointestinal (TGI). Para isso, foram utilizados dados provenientes do Sistema de Informação de Monitoramento da Biota Aquática (SIMBA), além de amostras em sua maioria derivadas dos mesmos indivíduos analisados por Lima *et al.* (2022). Adicionalmente, foi realizada uma revisão da literatura disponível sobre as correlações entre as concentrações de metais e MT em aves aquáticas, compilando estudos previamente publicados e avaliando as possíveis medidas de efeito que poderiam embasar uma potencial meta-análise sobre o tema.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da contaminação por metais e metaloides e de parâmetros como sexo, classe etária, escore corporal, massa corporal, presença de ectoparasitas e presença de endoparasitas e de resíduos plásticos no TGI sobre a concentração de MT no fígado de albatrozes-de-sobrancelha registrados ao longo dos estados de Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ).

2.2 Objetivos específicos

- Compilar dados do SIMBA referentes à identificação, coleta, necropsia, biometria e análise das concentrações de metais e metaloides no fígado dos albatrozes-de-sobrancelha amostrados.
- Reunir informações disponíveis na literatura sobre as correlações entre as concentrações de metais e metaloides e os níveis de MT em aves marinhas.
- Quantificar os níveis de MT nas amostras de fígado de albatrozes-de-sobrancelha obtidas no âmbito do PMP-BS.
- Investigar a relação entre a contaminação por metais e metaloides e os níveis de MT em amostras de fígado de albatrozes-de-sobrancelha obtidas no âmbito do PMP-BS.
- Avaliar os efeitos do sexo, massa corporal, escore corporal, presença de ectoparasitas e presença de endoparasitas e resíduos plásticos no TGI sobre a resposta de MT em amostras de fígado de albatrozes-de-sobrancelha obtidas no âmbito do PMP-BS.

3 METODOLOGIA

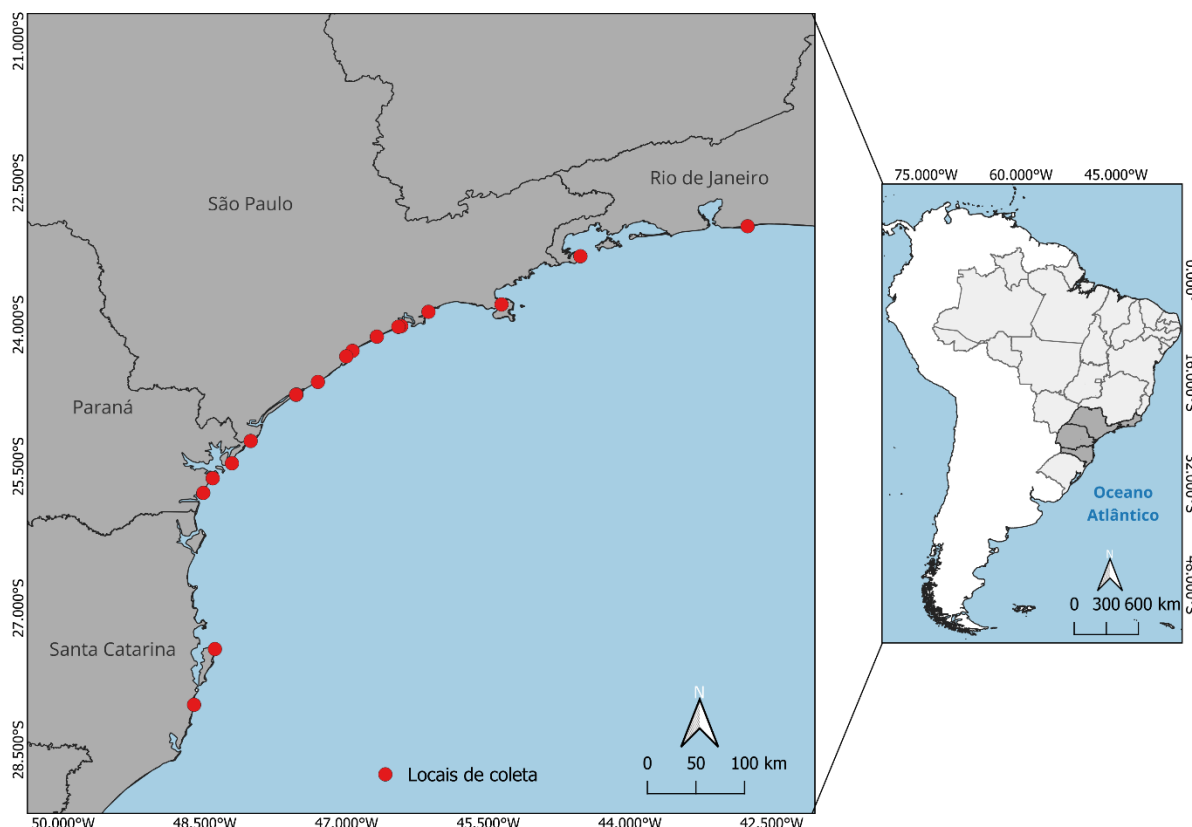
3.1 Revisão bibliográfica

A revisão bibliográfica para a compilação dos dados disponíveis na literatura sobre a correlação entre os níveis de MT e diferentes metais e metaloides em aves marinhas foi realizada a partir dos motores de busca “PubMed” e “Google Acadêmico”. Foram utilizadas diferentes combinações das seguintes palavras-chave: “sea birds”; “seabirds”; “shorebirds”; “metallothionein”; “MT”; “metals”; “metalloids”; “heavy metals”; e “trace-elements”. A revisão da literatura considerou os trabalhos publicados entre 1980 e 2023.

3.2 Coleta de amostras

As 20 amostras de fígado utilizadas neste trabalho foram coletadas entre 2017 e 2023 por instituições envolvidas no PMP-BS, a partir de carcaças frescas (código de decomposição 2) de albatrozes-de-sobrancelha encontradas ao longo da costa dos estados de SC, PR, SP e RJ (Figura 2). As amostras foram imediatamente armazenadas a -80 °C para análises posteriores. Os dados referentes à identificação, coleta (data de coleta e massa corporal), análises de metais e metaloides (concentrações de V, Hg, Cu, Pb, As, Cd, Cr, Mn, Mo, Zn, Ni e Ba no fígado), registros biométricos (comprimentos da cabeça, bico, tarso, pé e corda da asa), e necropsia (código de decomposição, sexo, classe etária, escore corporal, presença ectoparasitas, presença de endoparasitas no TGI e presença de resíduos plásticos no TGI) foram obtidos por meio do SIMBA (PETROBRAS, 2024).

Figura 2: Locais de amostragem dos albatrozes-de-sobrancelha analisados, distribuídos ao longo dos estados de Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ). Fonte: Daina de Lima.



3.3 Quantificação de metalotioneínas

A metodologia descrita a seguir foi desenvolvida a partir dos métodos de preparo de amostra e análise espectrofotométrica descritos por Viarengo *et al.* (1997), contendo modificações pontuais baseadas no método de quantificação de MT utilizado por Kehrig *et al.* (2015).

3.3.1 Preparo das amostras

Aproximadamente 75 mg de tecido de cada amostra foram pesados e adicionados a microtubos de 2 mL, sendo então homogeneizados 225 μ L tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 (contendo 0,01% β -mercaptoetanol e 0,5 mM PMSF). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 xg por 30 minutos a 4 °C. Toda a fração sobrenadante resultante desta centrifugação foi transferida para microtubos de 1,5 mL, dos quais foram retiradas alíquotas de 5 μ L para quantificação de proteínas totais

através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras foram então incubadas a 70 °C por 10 minutos e centrifugadas novamente a 20.000 xg por 30 minutos a 4 °C (KEHRIG *et al.*, 2015).

Foram transferidos para microtubos de 1,5 mL 100 µL de cada sobrenadante obtido nesta última centrifugação, aos quais foram adicionados 105 µL de etanol absoluto a -20 °C e 8 µL de clorofórmio. As soluções resultantes foram centrifugadas a 6.000 xg por 6 minutos a 4 °C, e os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 2 mL. Neles, foram adicionados 0,1 mg de RNA, 4 µL de HCl 37% e 651 µL de etanol absoluto a -20 °C. Após uma incubação a -20 °C por 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 6.000 xg por 10 minutos, e os sobrenadantes foram descartados. Os pellets obtidos foram lavados com 1 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,6, e uma nova centrifugação a 6.000 xg por 10 minutos foi realizada e os sobrenadantes foram descartados. Por fim, os precipitados foram ressuspensos em 150 µL de 0,25 M NaCl.

3.3.2 Análise espectrofotométrica

Nesta etapa, 50 µL de cada precipitado ressuspensado ao final do preparo das amostras foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 50 µL de 1 N HCl (contendo 4 mM EDTA) e 1,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,4 M, pH 8,0 (contendo 4 M NaCl e 0,86 mM DTNB), e as soluções resultantes foram incubadas por 5 minutos. Em seguida, 150 µL de amostra foram adicionados a uma microplaca transparente, tendo sua absorbância a 412 nm determinada em espectrofotômetro (multileitora Infinite M200, Tecan). As análises foram realizadas em duplicata. A partir dessa medida, a concentração de MT presente em cada amostra (nmol de MT/mg de proteína) foi calculada por meio de uma curva padrão de GSH, considerando que a estrutura das MT das aves apresenta, dentre um total de 63 aminoácidos, 20 resíduos de cisteína em posições conservadas (ISANI; CARPENÈ, 2014).

A curva padrão de GSH foi preparada a partir de uma solução tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 8,0, contendo GSH na concentração de 6.000 µM, que foi diluída seriadamente no mesmo tampão para obtenção de outras nove soluções contendo concentrações de GSH de 3.000 µM, 1.500 µM, 750 µM, 325 µM, 187,5 µM, 93,75 µM, 46,875 µM, 23,4375 µM e 11,71875 µM. Para leitura, 5 µL de cada solução, 5 µL de 1 N HCl (contendo 4 mM EDTA) e 140 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH

8,0 (contendo 2 M NaCl e 0,43 mM DTNB) foram adicionados a uma microplaca transparente, tendo sua absorbância a 412 nm determinada espectrofotometricamente (multileitora Infinite M200, Tecan).

3.4 Análises estatísticas

3.4.1 Análises estatísticas básicas

Tanto os dados gerados pela determinação da concentração de MT no fígado, quanto os dados de variáveis quantitativas coletados no SIMBA (concentração de metais e metaloides no fígado e massa corporal dos animais), foram testados para a presença de “outliers” e normalidade de sua distribuição através dos testes de Grubbs e de Shapiro-Wilk, respectivamente. As correlações existentes entre esses dados foram analisadas por meio dos testes de correlação de Spearman ou de Pearson. A influência do sexo, classe etária, escore corporal, presença de ectoparasitas e presença de endoparasitas e de resíduos plásticos no TGI sobre as concentrações de MT, metais e metaloides no fígado e massa corporal dos animais foi verificada utilizando test-t com correção de Welch ou teste de Mann-Whitney. Em todos os casos, os resultados foram considerados como significativos quando $P < 0,05$. O software GraphPad Prism 8.02 foi utilizado para realizar as análises estatísticas mencionadas acima.

3.4.2 Modelos estatísticos - Modelo Aditivo Generalizado (GAM)

Em ecotoxicologia, as relações entre contaminantes e as respostas biológicas são com frequência não lineares (WALKER, 2014). Além disso, dados ecotoxicológicos obtidos a partir de animais amostrados em ambientes naturais tendem a apresentar variações complexas devido a diversos fatores ambientais e ecológicos simultâneos, que podem inclusive interagir entre si (WALKER, 2014). Por esses motivos, os Modelos Aditivos Generalizados (GAMs), extensões dos Modelos Lineares Generalizados (GLMs), são especialmente adequados para estudos em ecotoxicologia, pois são capazes de avaliar relações não lineares complexas entre múltiplas variáveis dependentes e independentes simultaneamente (Tredennick *et al.*, 2021). Neste trabalho, análises utilizando GAMs foram realizadas para averiguar as relações entre os níveis de MT em amostras de fígado de albatrozes-de-sobrancelha (considerada como variável resposta), e todos os parâmetros coletados no SIMBA,

incluindo dados de coleta, necropsia, registros biométricos e quantificação de metais e metaloides no fígado (consideradas variáveis preditivas ou explicativas potenciais para a variável resposta). Essas análises foram desenvolvidas através do software R Studio 4.2.2, utilizando os pacotes DHARMA 0.4.6, dplyr 1.1.2, gam 1.22-3, GGally 2.2.0, ggeffects 1.3.4, ggplot2 3.4.4, mgcv 1.8-42 e MuMIn 1.47.5 (WOOD, 2017; HARTIG, 2022; BARTON, 2023; HASTIE, 2023; WICKHAM *et al.*, 2023; LÜDECKE *et al.*, 2024; SCHLOERKE *et al.*, 2024). Os resultados foram considerados como significativos quando $P < 0,05$.

3.5 Fator de alerta para as concentrações de metais e metaloides

Como forma de verificar se os dados disponíveis no SIMBA quanto às concentrações de metais e metaloides no fígado dos albatrozes-de-sobrancelha analisados encontram-se fora dos valores normais, sugerindo assim uma possível exposição a contaminantes antrópicos, foi utilizado o cálculo de fator de alerta (FA) para concentrações de elementos traço em aves pelágicas, desenvolvido por Lima *et al.* (2023) a partir das informações disponíveis na literatura para essa guilda ecológica (LIMA *et al.*, 2023).

O FA pode ser calculado através da divisão da concentração de um elemento no indivíduo analisado ($C_M amostra$) pela concentração média do mesmo elemento do mesmo elemento para o grupo obtida na literatura ($C_{ref} espécie$).

$$FA = \frac{C_M amostra}{C_{ref} espécie}$$

Dependendo do resultado obtido, o FA pode ser interpretado a partir dos intervalos a seguir:

- $FA \leq 1$ (concentração natural) (verde): concentração média encontrada na literatura, contendo pouca ou nenhuma contaminação.
- $1 < FA \leq 3$ (concentração moderada) (amarelo): a influência conjunta da dieta e de diferentes fatores físicos, químicos e biológicos podem ter aumentado a absorção do elemento, não sendo necessariamente derivado de contaminação.
- $3 < FA \leq 6$ (concentração preocupante) (laranja): pelo menos três vezes maior que a média descrita na literatura, apresentando um grau considerável de contaminação.

- FA > 6 (concentração alarmante) (vermelho): altos níveis de contaminação.

Os valores de $C_{ref\ espécie}$ calculados por Lima *et al.* (2023) para aves pelágicas a partir dos dados disponíveis na literatura são: V = 0,4; Hg = 16; Cu = 21,6; Pb = 0,1; As = 5,6; Cd = 16,2; Cr = 1,1; Mn = 14,4; Mo = 1,3; Zn = 192,7; Ni = 0,4; e Ba = 0,1 (LIMA *et al.*, 2023).

4 RESULTADOS

4.1 Revisão bibliográfica

Ao total, foram encontrados nove trabalhos na literatura publicados entre os anos de 1980 e 2023 referentes aos efeitos da contaminação por metais e metaloides sobre os níveis de MT em aves marinhas (ELLIOTT *et al.*, 1992; STEWART; FURNESS; MONTEIRO, 1996; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 1997; TRUST *et al.*, 2000; BARJAKTAROVIC; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 2002; KOJADINOVIC *et al.*, 2007; BRAUNE; SCHEUHAMMER, 2008; KEHRIG *et al.*, 2015; ROMERO *et al.*, 2015). Em todos os casos, os autores analisaram a existência de correlações lineares entre as concentrações de metais e metaloides e de MT no fígado, rins ou sangue através dos testes de correlação de Pearson ou de Spearman. De forma geral, foram observadas correlações positivas entre os níveis de MT e as concentrações de Cd, Cu, Zn ou Hg individualmente. Nenhuma correlação negativa foi identificada. Os resultados obtidos em cada trabalho encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados dos trabalhos encontrados na literatura referentes aos efeitos da contaminação por metais e metaloides sobre os níveis de metalotioneínas em aves marinhas, explicitando a espécie, os órgãos analisados e as correlações observadas. (+) correlação positiva; (0) correlação inexistente; (N/a) correlação não estabelecida.

Referência	Espécie	Órgão	Correlação MT x metal-metaloide				
			Cd	Zn	Cu	Hg	Pb
Elliott <i>et al.</i> (1992)	<i>Oceanodroma leucorhoa</i>	Rim	+	0	0	0	0
	<i>Fratercula arctica</i>	Rim	+	0	0	+	0
	<i>Larus argentatus</i>	Rim	+	0	0	0	0
	<i>Phalacrocorax auritus</i>	Rim	0	0	0	0	0
Stewart, Furness e Monteiro (1996)	<i>Larus fuscus</i>	Fígado	+	+	+	0	N/a
		Rim	+	+	+	0	N/a
	<i>Calonectris diomedea</i>	Fígado	0	+	0	N/a	N/a
		Rim	+	+	+	N/a	N/a
Elliott e Scheuhammer (1997)	<i>Cerorhinca monocerata</i>	Rim	+	0	0	0	N/a

	<i>Ptychoramphus aleuticus</i>	Rim	+	0	0	0	N/a
	<i>Synthliboramphus antiquus</i>	Rim	+	0	0	0	N/a
Trust <i>et al.</i> (2000)	<i>Somateria fischeri</i>	Fígado	0	0	0	0	N/a
		Rim	0	0	0	0	N/a
Barjaktarovic, Elliott e Scheuhammer (2002)	<i>Melanitta perspicillata</i>	Fígado	0	0	0	N/a	N/a
		Rim	+	0	+	N/a	N/a
	<i>Melanitta fusca</i>	Fígado	0	0	0	N/a	N/a
		Rim	0	0	+	N/a	N/a
Kojadinovic <i>et al.</i> (2007)	<i>Pterodroma baraui</i>	Fígado	+	+	0	+	N/a
		Rim	+	+	0	0	N/a
	<i>Puffinus lherminieri</i>	Fígado	+	+	+	+	N/a
		Rim	+	+	+	+	N/a
	<i>Phaethon lepturus</i>	Fígado	+	+	+	+	N/a

		Rim	+	+	+	+	N/a
Braune e Scheuhammer (2008)	<i>Fulmarus glacialis</i>	Rim	+	0	0	N/a	N/a
	<i>Uria lomvia</i>	Rim	+	+	0	N/a	N/a
	<i>Cephus grylle</i>	Rim	0	0	0	N/a	N/a
	<i>Rissa tridactyla</i>	Rim	+	+	0	N/a	N/a
	<i>Larus hyperboreus</i>	Rim	0	0	0	N/a	N/a
Kehrig <i>et al.</i> (2015)	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Fígado	+	N/a	N/a	+	+
Romero <i>et al.</i> (2015)	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Sangue	N/a	+	+	N/a	N/a

Adicionalmente, Trust *et al.* (2000) e Kojadinovic *et al.* (2007) avaliaram os efeitos de diferentes metais em conjunto sobre a concentração de MT, observando, respectivamente, a existência de correlações positivas entre os níveis de MT e as concentrações de MT e Cd, Cu e Zn nos rins de *Somateria fischeri* (TRUST *et al.*, 2000) e entre as concentrações de MT e Cd, Cu, Zn e Hg nos rins e fígado de *Pterodroma barau*, *Puffinus lherminieri* e *Phaethon lepturus* (KOJADINOVIC *et al.*, 2007).

Dentre os nove trabalhos analisados, cinco foram realizados com aves coletadas na América do Norte (ELLIOTT *et al.*, 1992; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 1997; TRUST *et al.*, 2000; BARJAKTAROVIC; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 2002; BRAUNE; SCHEUHAMMER; 2008), um com animais coletados na Europa (STEWART; FURNESS; MONTEIRO, 1996), dois com aves coletadas na América do Sul (KEHRIG *et al.*, 2015; ROMERO *et al.*, 2015), e um com aves coletadas na África (KOJADINOVIC *et al.*, 2007). Apenas três desses estudos utilizaram tecidos obtidos a partir de aves encontradas mortas (STEWART; FURNESS; MONTEIRO, 1996; KOJADINOVIC *et al.*, 2007; KEHRIG *et al.*, 2015), enquanto os demais fizeram uso de amostras coletadas exclusivamente de animais vivos (ROMERO *et al.*, 2015) ou eutanasiados (ELLIOTT *et al.*, 1992; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 1997; TRUST *et al.*, 2000; BARJAKTAROVIC; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 2002; BRAUNE; SCHEUHAMMER; 2008). É importante mencionar que, embora Stewart, Furness e Monteiro (1996) tenham coletado tecido hepático e renal de *Calonectris diomedea* encontrados mortos, as amostras de *Larus fuscus* analisadas foram obtidas a partir de aves eutanasiadas.

4.2 Quantificação dos níveis de metalotioneínas e investigação de sua associação com metais, metaloides e demais variáveis individuais das aves analisadas

Os dados referentes à quantificação de MT realizada neste trabalho, assim como as informações obtidas no SIMBA sobre a necropsia e as concentrações de metais e metaloides no fígado, estão descritos individualmente nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Concentração de metalotioneínas (MT) nas amostras de fígado analisadas (nmol/mg proteína) e dados coletados no SIMBA referentes ao sexo, classe etária, escore corporal, massa corporal (kg), presença de ectoparasitas, presença de endoparasitas no TGI e presença de resíduos plásticos no TGI para albatrozes-de-sobrancelha encalhados nos estados de SC, PR, SP e RJ entre os anos de 2017 a 2023. Cada indivíduo possui uma identificação única no SIMBA (ii).

ii	MT	Sexo	Classe etária	Escore corporal	Massa corporal	Ectoparasitas	Endoparasitas no TGI	Plástico no TGI
195493	0,9036	Fêmea	Juvenil	Caquético	2,27	Sim	Não	Sim
257330	0,8808	Fêmea	Juvenil	Magro	2,66	Não	Sim	Não
157764	0,8902	Macho	Juvenil	Caquético	2,845	Sim	Sim	Não
190634	0,6296	Macho	Juvenil	Caquético	3,21	Não	Sim	Não
971117	0,1967	Macho	Juvenil	Caquético	3,74	Não	Sim	Não
155279	0,7369	Macho	Juvenil	Magro	1,795	Sim	Sim	Sim
163173	0,6904	Fêmea	Adulto	Magro	2,36	Sim	Sim	Sim
29664	1,4559	Fêmea	Juvenil	Magro	4	Não	Não	Não
167204	0,5831	Macho	Juvenil	Magro	2,5	Sim	Não	Não
148201	0,4593	Fêmea	Juvenil	Magro	2,1	Sim	Não	Não

133226	0,4489	Fêmea	Juvenil	Magro	2,245	Sim	Sim	Não
138888	0,3926	Macho	Juvenil	Magro	-	Sim	Não	Sim
63870	0,6433	Fêmea	Juvenil	Magro	-	Sim	Não	Sim
49467	1,4578	Macho	Juvenil	Caquético	2,5	Sim	Sim	Não
50147	0,7117	Fêmea	Juvenil	Bom	1,8	Sim	Sim	Não
42683	0,2795	Fêmea	Juvenil	Magro	2,94	Sim	Sim	Não
29739	1,4459	Fêmea	Juvenil	Magro	2	Não	Sim	Não
150313	0,4097	Macho	Adulto	Magro	1,75	Sim	Sim	Não
147742	0,1641	Fêmea	Juvenil	Caquético	1,4	Sim	Sim	Não
170223	1,0885	Fêmea	Juvenil	Magro	2,4	Sim	Sim	Não

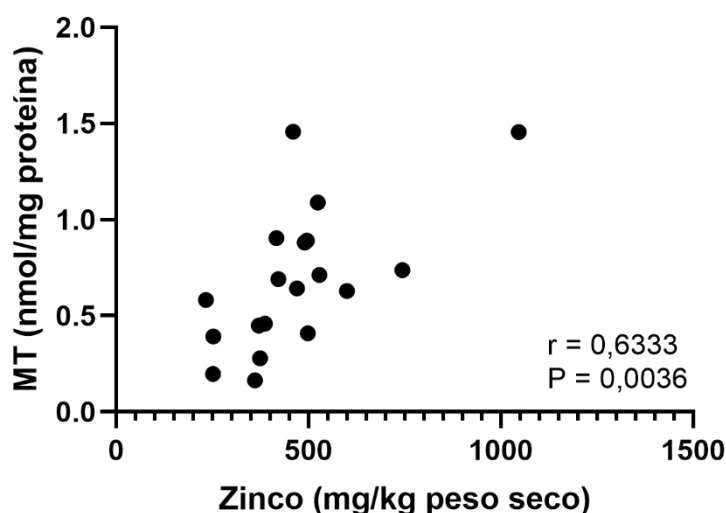
Os níveis de MT nas amostras de fígado analisadas variaram entre 0,1641 e 1,4578 nmol/mg proteína, apresentando um valor médio de 0,7234 nmol/mg proteína. Uma correlação positiva entre as concentrações de Zn e MT foi observada através do teste de correlação de Spearman ($r = 0,6333$; $P = 0,0036$) (Figura 3). Por outro lado, os testes de correlação de Pearson e de Spearman não demonstraram correlações significativas entre os níveis de MT e as concentrações dos demais metais ou massa corporal, e nenhuma diferença significativa foi observada por meio do teste-t com correção de Welch ao se analisar parâmetros como sexo, escore corporal, presença de ectoparasitas, presença de endoparasitas no TGI e presença de resíduos plásticos no TGI. Nenhuma análise estatística pôde ser realizada com os dados de classe etária e concentração de Ni, pois dentre as 20 amostras de fígado disponíveis, apenas duas derivam de indivíduos adultos, e somente duas possuíam níveis de Ni acima do limite de detecção (Tabelas 2 e 3).

Tabela 3: Dados coletados no SIMBA referentes às concentrações de metais e metaloides (mg/kg peso seco) em amostras de fígado de cada indivíduo analisado. (*) Valores removidos das análises estatísticas básicas por terem sido considerados como *outliers* através do teste de Grubbs. (<LD) Abaixo do limite de detecção. (ii) identificação única no SIMBA para cada albatroz-de-sobrancelha analisado.

ii	V	Hg	Cu	Pb	As	Cd	Cr	Mn	Mo	Zn	Ba	Ni
195493	0,71	11,45	17,86	0,06	42,40	2,59	<LD	15,55	1,62	415,95	<LD	<LD
257330	0,55	7,66	42,24	0,03	43,10	30,89	<LD	15,78	1,25	489,46	0,23	<LD
157764	0,72	36,65	26,70	<LD	29,67	11,56	0,12	11,18	1,13	495,04	<LD	<LD
190634	1,09	20,26	55,14	<LD	47,16	27,85	<LD	8,61	1,10	599,69	<LD	<LD
971117	1,23	9,88	25,74	<LD	16,66	47,83	<LD	11,06	2,03	251,39	<LD	<LD
155279	0,27	13,50	41,5	<LD	29,58	45,54	<LD	17,47	1,62	744,00	<LD	<LD
163173	1,30	9,98	30,88	0,04	27,51	148,56*	0,14	13,28	1,96	421,36	0,11	<LD
29664	0,23	14,12	1,86	0,01	17,66	13,01	0,85*	12,34	2,00	1.046,00	<LD	1,10
167204	0,53	123,19*	30,77	0,03	45,14	22,94	<LD	13,61	1,37	232,91	<LD	<LD

148201	0,55	15,75	10,13	<LD	5,44	4,86	<LD	17,43	<LD	386,37	<LD	<LD
133226	0,15	7,67	10,37	0,05	10,14	8,80	<LD	14,93	0,87	370,13	<LD	<LD
138888	0,55	5,34	38,28	0,03	23,34	6,89	<LD	12,56	0,92	251,94	<LD	<LD
63870	0,45	3,41	36,52	0,03	4,67	12,51	0,10	9,71	1,04	469,81	<LD	<LD
49467	0,39	3,52	14,79	0,03	3,64	2,66	0,20	10,72	1,32	459,44	<LD	<LD
50147	0,27	2,88	39,29	0,02	45,10	13,06	<LD	15,68	1,69	528,08	<LD	<LD
42683	0,40	54,27	49,14	0,08	31,61	26,60	0,21	14,01	1,82	373,49	0,32	<LD
29739	5,51*	8,58	4251,66*	0,03	21,66	44,12	0,26	9,06	2,16	1.801,46*	0,10	<LD
150313	0,26	2,48	23,87	0,02	24,41	24,14	<LD	10,63	1,70	498,13	<LD	<LD
147742	0,09	2,35	15,73	<LD	15,91	12,58	<LD	16,53	1,12	360,47	<LD	<LD
170223	0,14	6,83	23,23	0,02	8,82	16,68	0,10	27,45*	1,55	523,93	<LD	<LD

Figura 3: Teste de correlação de Spearman entre as concentrações de metalotioneínas e zinco no fígado, demonstrando uma correlação positiva significativa ($P = 0,0036$).



Por meio do teste de Mann-Whitney, foi verificado que indivíduos que continham endoparasitas no interior TGI apresentaram uma maior concentração de Cd no fígado ($P = 0,0365$) (Figura 4). Em contrapartida, foi observada uma menor concentração de Cd no fígado de animais nos quais foram encontrados ectoparasitas ($P = 0,0143$) (Figura 4). Além disso, também foi identificado por meio dos testes de correlação de Pearson e de Spearman a existência de correlações positivas entre a concentrações de V e Hg ($r = 0,4781$; $P = 0,0448$) (Figura 6), Cu e As ($r = 0,5952$; $P = 0,0072$) (Figura 5), Cu e Cd ($r = 0,5975$; $P = 0,0088$) (Figura 6), Cu e Ba ($r = 0,9992$; $P = 0,0254$) (Figura 5) e Cd e Mo ($r = 0,5397$; $P = 0,0208$) (Figura 6), além de uma correlação negativa entre Pb e Zn ($r = -0,6198$; $P = 0,0267$) (Figura 6). Por fim, foi observado através do teste de correlação de Spearman que a concentração de Hg no fígado está positivamente correlacionada com a massa corporal dos albatrozes amostrados ($r = 0,5613$; $P = 0,0209$) (Figura 6).

Figura 4: Concentração de cádmio no fígado de albatrozes-de-sobrancelha separados pela presença ou ausência de endoparasitas no trato gastrointestinal ou de ectoparasitas.

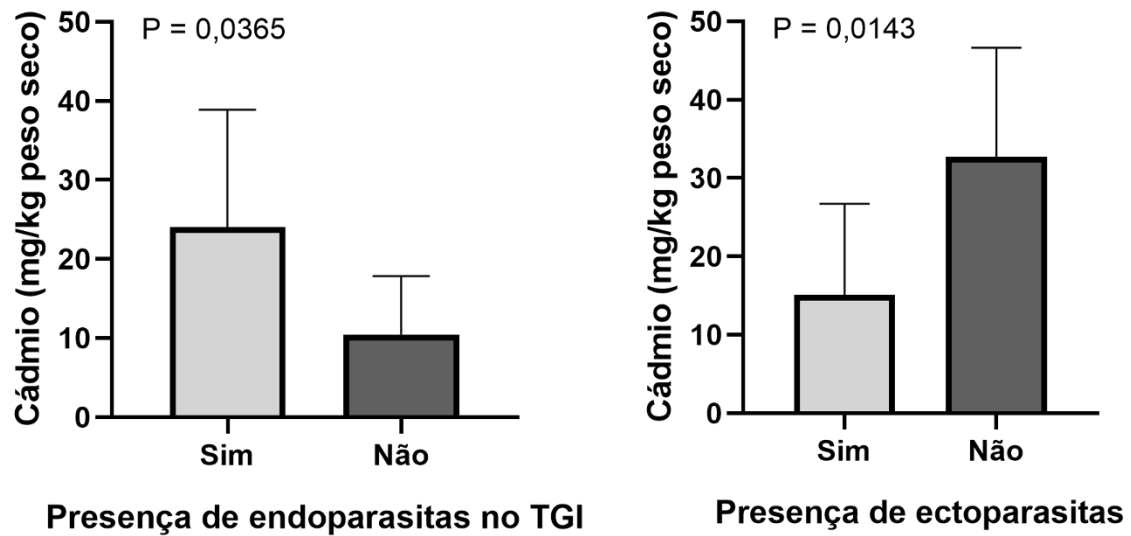


Figura 5: Testes de correlação de Pearson demonstrando a existência de uma correlação positiva significativa entre arsênio e cobre ($P = 0,0072$) e entre bário e cobre ($P = 0,0254$).

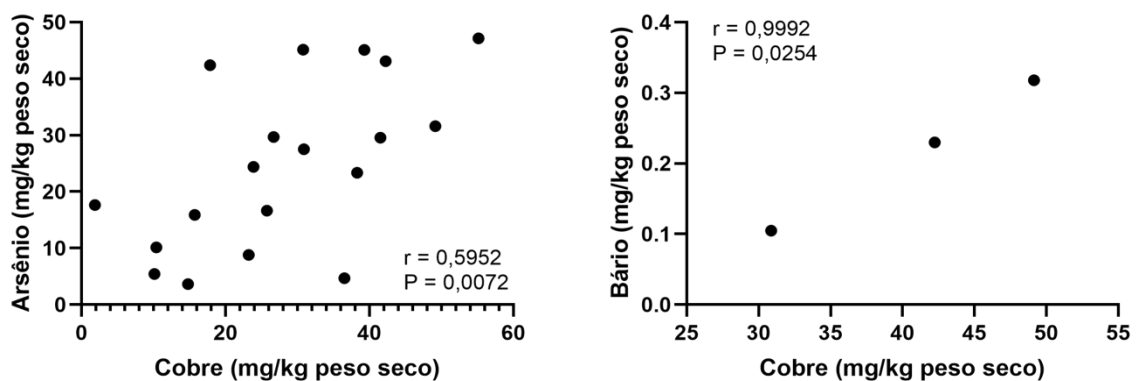
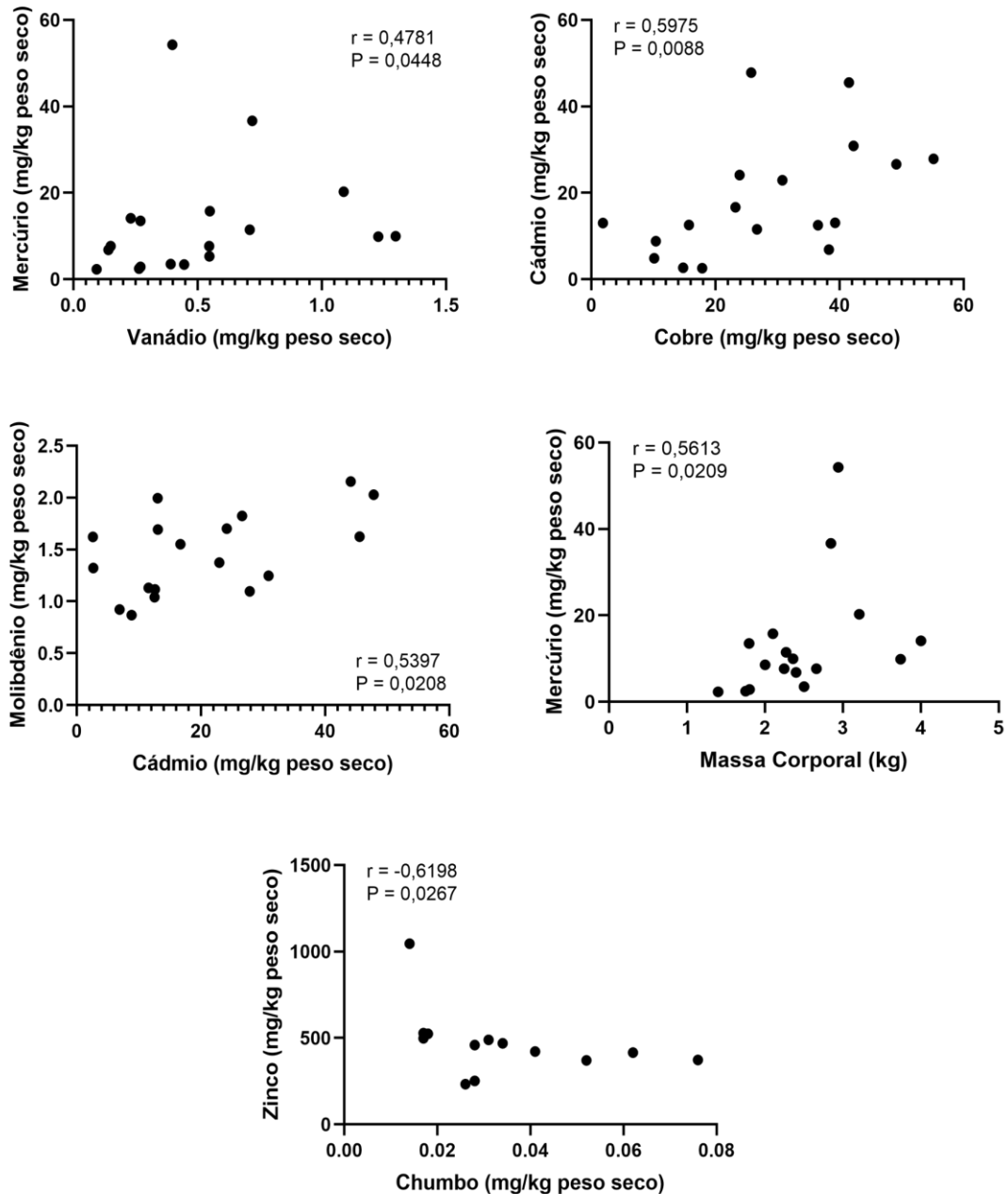


Figura 6: Testes de correlação de Spearman demonstrando uma correlação positiva significativa entre mercúrio e vanádio ($P = 0,0448$), cádmio e cobre ($P = 0,0088$), molibdênio e cádmio ($P = 0,0208$) e mercúrio e massa corporal ($P = 0,0209$), e de uma correlação negativa entre zinco e chumbo ($P = 0,0267$).

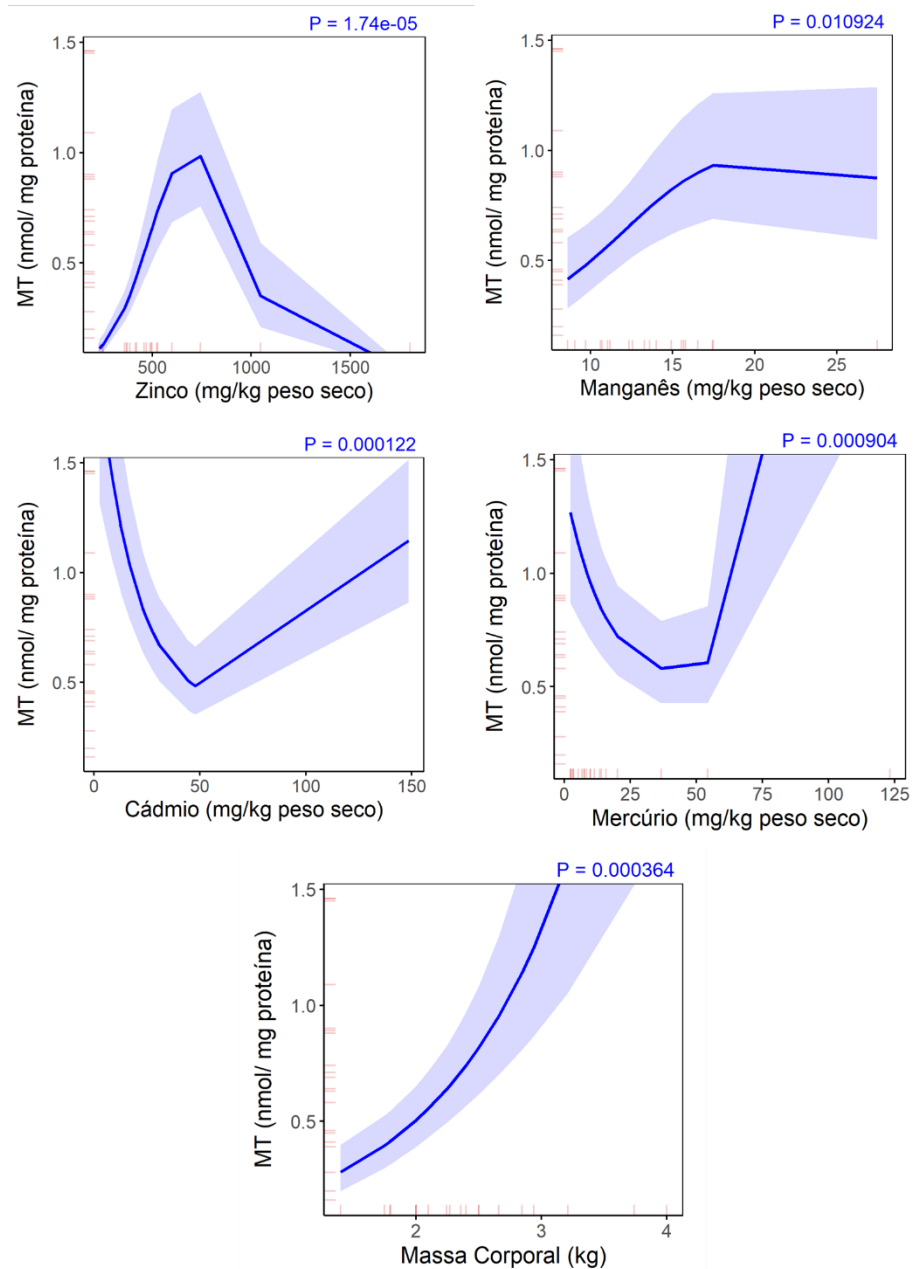


Considerando o modelo estatístico (GAM) com o melhor ajuste para o conjunto de dados do presente estudo, as variáveis identificadas como preditoras significativas para os níveis de MT nas amostras de fígado analisadas foram as concentrações de Zn ($P = 0,0000174$), Cd ($P = 0,000122$), Cu ($P = 0,0004$), Hg ($P = 0,001197$) e Mn ($P = 0,013411$) a massa corporal ($P = 0,000364$) e a presença de plástico no TGI ($P = 0,006387$), sendo capazes de explicar 94,6% da variância observada.

A concentração de Zn foi a variável que melhor explicou a variação dos níveis de MT ($P = 0,000174$), apresentando inicialmente uma correlação positiva entre ambos. No entanto, a partir de uma concentração de Zn de aproximadamente 700 mg/kg peso seco, os modelos preditivos demonstraram um decaimento nos níveis de MT (Figura 7). Uma relação similar, porém menos acentuada, foi observada entre a concentração de Mn e os níveis de MT (Figura 7). Por outro lado, o contrário foi verificado nas relações entre os níveis de MT e as concentrações de Cd e Hg. Nesses casos, conforme a concentração de ambos os metais aumenta, os níveis de MT tendem a diminuir, mas voltam a subir após atingirem seu valor mínimo (Figura 7). Por fim, foi observada uma associação positiva entre a massa corporal dos animais amostrados e os níveis de MT (Figura 7).

Indivíduos que possuíam resíduos plásticos no TGI apresentaram níveis significativamente maiores de MT no fígado ($P = 0,006387$), mas a natureza dicotômica desta variável impossibilitou a produção de um gráfico de curva. De forma similar, a concentração de Cu também foi identificada como preditora dos níveis de MT ($P = 0,0004$), entretanto, um modelo preditivo claro não pôde ser produzido devido a presença de um indivíduo contendo uma concentração de Cu muito maior que a dos demais (4251,66 mg/kg peso seco).

Figura 7: Modelos preditivos demonstrando a relação entre a concentração de metalotioneínas (MT) e as variáveis identificadas como significativas através do GAM, incluindo as concentrações de zinco, manganês, cádmio e mercúrio no fígado e a massa corporal.



4.3 Fator de alerta para as concentrações de metais e metaloides

Dentre os 20 albatrozes-de-sobrancelha cujas amostras de fígado estavam disponíveis para análise, sete apresentaram concentrações alarmantes de algum metal ou metaloide. O elemento no qual foi observado o maior número de indivíduos contendo concentrações preocupantes ou alarmantes foi o As (preocupantes = 8; alarmantes = 5), seguindo, em ordem decrescente, por Zn (preocupantes = 3; alarmantes = 1), V (preocupantes = 2; alarmantes = 1), Hg (preocupantes = 1; alarmantes = 1), Cu e Cd (preocupantes = 0; alarmantes = 1), e Ba (preocupantes = 1; alarmantes = 0). Os metais Pb, Cr, Mn, Mo e Ni demonstraram apenas concentrações naturais ou moderadas se comparadas às encontradas nas demais espécies de aves pelágicas. Os valores obtidos para os FA para cada metal em todos os indivíduos analisados encontram-se disponíveis na Tabela 4.

Tabela 4: Valores do fator de alerta (Lima *et al.*, 2023) para as concentrações de metais e metaloides no fígado de cada indivíduo analisado. (ii) identificação única do indivíduo no SIMBA. (<LD) Abaixo do limite de detecção. (verde) concentração natural. (amarelo) concentração moderada. (laranja) concentração preocupante. (vermelho) concentração alarmante.

ii	V	Hg	Cu	Pb	As	Cd	Cr	Mn	Mo	Zn	Ba	Ni
195493	1,77	0,72	0,83	0,62	7,57	0,16	<LD	1,08	1,25	2,16	<LD	<LD
257330	1,37	0,48	1,96	0,31	7,70	1,91	<LD	1,10	0,96	2,54	2,30	<LD
157764	1,80	2,29	1,24	<LD	5,30	0,71	0,11	0,78	0,87	2,57	<LD	<LD
190634	2,72	1,27	2,55	<LD	8,42	1,72	<LD	0,60	0,84	3,11	<LD	<LD
971117	3,07	0,62	1,19	<LD	2,98	2,95	<LD	0,77	1,56	1,30	<LD	<LD
155279	0,67	0,84	1,92	<LD	5,28	2,81	<LD	1,21	1,25	3,86	<LD	<LD
163173	3,24	0,62	1,43	0,41	4,91	9,17	0,13	0,92	1,51	2,19	1,05	<LD
29664	0,58	0,88	0,09	0,14	3,15	0,80	0,77	0,86	1,53	5,43	<LD	2,74
167204	1,31	7,70	1,42	0,26	8,06	1,42	<LD	0,94	1,06	1,21	<LD	<LD
148201	1,37	0,98	0,47	<LD	0,97	0,30	<LD	1,21	<LD	2,01	<LD	<LD
133226	0,37	0,48	0,48	0,52	1,81	0,54	<LD	1,04	0,67	1,92	<LD	<LD
138888	1,37	0,33	1,77	0,28	4,17	0,43	<LD	0,87	0,71	1,31	<LD	<LD

63870	1,11	0,21	1,69	0,34	0,83	0,77	0,09	0,67	0,80	2,44	<LD	<LD
49467	0,98	0,22	0,68	0,28	0,65	0,16	0,18	0,74	1,02	2,38	<LD	<LD
50147	0,67	0,18	1,82	0,17	8,05	0,81	<LD	1,09	1,30	2,74	<LD	<LD
42683	1,00	3,39	2,27	0,76	5,64	1,64	0,19	0,97	1,40	1,94	3,18	<LD
29739	13,77	0,54	196,84	0,32	3,87	2,72	0,23	0,63	1,66	9,35	1,02	<LD
150313	0,66	0,16	1,10	0,17	4,36	1,49	<LD	0,74	1,31	2,58	<LD	<LD
147742	0,23	0,15	0,73	<LD	2,84	0,78	<LD	1,15	0,86	1,87	<LD	<LD
170223	0,35	0,43	1,08	0,18	1,58	1,03	0,09	1,91	1,19	2,72	<LD	<LD

5 DISCUSSÃO

5.1 Associação dos níveis de metalotioneínas com as concentrações de metais e metaloides e demais variáveis individuais

Até o momento, o único estudo que investigou as concentrações de metais e metaloides no fígado de albatrozes-de-sobrancelha foi conduzido por Lima *et al.* (2023), que fazer parte da mesma equipe responsável por realizar a quantificação de metais e metaloides utilizada neste trabalho. As amostras analisadas por Lima *et al.* (2023) também foram obtidas através de instituições envolvidas no PMP-BS, coletadas entre 2015 e 2021 sob as mesmas condições. Devido à grande sobreposição entre os períodos de coleta, 15 das 20 amostras de fígado analisadas neste estudo derivam dos exatos mesmos indivíduos analisados por Lima *et al.* (2023). Em ambos os trabalhos, altos índices de contaminação por As foram observados, com cerca de dois terços dos animais amostrados apresentando FA preocupantes ou alarmantes para esse metaloides (LIMA *et al.*, 2023).

Apesar das MT possuírem baixa afinidade por As, estudos realizados em mamíferos demonstram que a exposição tanto *in vitro* como *in vivo* a diferentes formas químicas de As está associada a um aumento na expressão e biossíntese de MT em diversos tecidos (RAHMAN; LEY, 2016). Acredita-se que esse efeito esteja relacionado a possível função exercida pelas MT na defesa contra danos oxidativos (CHIAVERINI; LEY, 2010; RAHMAN; LEY, 2016), que constituem um dos principais mecanismos de toxicidades do As (HUGHES, 2002). No entanto, nenhum estudo desenvolvido até o momento, incluindo o presente trabalho, observou a existência de qualquer correlação entre as concentrações de As e os níveis de MT em aves.

Dentre os metais e metaloides analisados, somente o Zn apresentou uma correlação linear positiva com a concentração de MT no fígado dos albatrozes-de-sobrancelha amostrados. Experimentos conduzidos em galinhas demonstram que a biossíntese de MT pode ser induzida em diferentes órgãos a partir da exposição a Zn através da via oral (FLEET *et al.*, 1998). Somado a isso, trabalhos desenvolvidos em outras espécies de aves marinhas observaram a existência de correlações lineares positivas entre as concentrações de Zn e MT em diferentes tecidos, incluindo no fígado e nos rins de *Larus fuscus*, *Calonectris diomedea*, *Pterodroma barui*, *Puffinus lherminieri* e *Phaethon lepturus* (STEWART; FURNESS; MONTEIRO, 1996;

KOJADINOVIC *et al.*, 2007), nos rins de *Uria lomvia* e *Rissa tridactyla* (BRAUNE; SCHEUHAMMER, 2008) e no sangue de *Spheniscus magellanicus* (ROMERO *et al.*, 2015). Além disso, os modelos estatísticos realizados neste trabalho (GAM) demonstram que a concentração de Zn é a variável preditora que melhor explica as variações observadas nos níveis de MT, apresentando inicialmente uma correlação positiva entre ambas, que se inverte a partir de uma concentração de Zn de aproximadamente 700 mg/kg peso. É possível que essa redução se deva, ao menos em parte, ao acúmulo de Zn em vesículas citoplasmáticas denominadas de zincossomos. Até o momento, existência dessa organela foi observada em uma ampla variedade de células de fungos e de mamíferos, incluindo hepatócitos de ratos (EIDE, 2006). A origem e função dos zincossomos ainda não é completamente conhecida, mas estudos sugerem que eles atuam no armazenamento e/ou desintoxicação do excesso de Zn (PALMITER; COLE; FINDLEY, 1996; WELLENREUTHER *et al.*, 2009).

Além da concentração de Zn, as análises estatísticas realizadas utilizando o GAM também identificaram as concentrações de Cd, Cu, Hg e Mn, a massa corporal e a presença de resíduos plásticos no TGI como variáveis preditoras significativas dos níveis de MT nas amostras de fígado analisadas.

O Cd é um metal amplamente conhecido por sua capacidade de induzir a biossíntese de MT (NORDBERG; NORDBERG, 2022), e a existência de correlações lineares positivas entre as concentrações de Cd e MT foi observada tanto no fígado quanto nos rins de diversas espécies de aves marinhas (ELLIOTT *et al.*, 1992; STEWART; FURNESS; MONTEIRO, 1996; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 1997; BARJAKTAROVIC; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 2002; KOJADINOVIC *et al.*, 2007; BRAUNE; SCHEUHAMMER, 2008; KEHRIG *et al.*, 2015). Após sua absorção através do TGI, a maior parte dos íons Cd^{2+} se ligam a proteínas de alto peso molecular contendo grupamentos tiol, principalmente a albumina. Os complexos formados são degradados no fígado, e o Cd liberado é desintoxicado ao formar associações com GSH ou MT (ARROYO *et al.*, 2012; THÉVENOD; WOLFF, 2016). As teorias vigentes consideram que os complexos Cd-GSH sejam excretados juntamente com a bile (ARROYO *et al.*, 2012), enquanto as MT ligadas ao Cd são lentamente transportadas até os rins através da corrente sanguínea (THÉVENOD; WOLFF, 2016), possivelmente explicando em parte a redução inicial nos níveis de MT observada neste trabalho para as concentrações mais baixas de Cd.

Com um padrão similar ao observado com o Cd, os modelos preditivos do GAM demonstram uma redução inicial nos níveis de MT conforme as concentrações crescentes de Hg, mas que incrementam rapidamente a partir de concentrações de Hg de aproximadamente 55 mg/kg peso seco. Em aves marinhas, o Hg é obtido principalmente através da dieta na forma de metilmercúrio (MeHg), sendo metabolizado para formas inorgânicas menos tóxicas, predominantemente no fígado, onde tendem a se acumular (THOMPSON, 1990; KEHRIG *et al.*, 2015). O Hg inorgânico pode ser então desintoxicado ao se ligar a MT ou mediante a formação de complexos Hg-selênio inertes, que são possivelmente depositados em grânulos (ARAI *et al.*, 2004; KEHRIG *et al.*, 2015; SPILLER, 2018). No entanto, apesar das MT atuarem em um primeiro momento na defesa contra o Hg, esse metal apresenta maior afinidade por compostos contendo selênio (Se) do que por grupamentos tiol. Dessa forma, conforme as concentrações de Hg aumentam ao longo do tempo, o Hg tende a se desassociar das MT e a se ligar a selenoproteínas (SPILLER, 2018), oferecendo uma possível explicação para a associação inversamente proporcional entre MT e Hg observada inicialmente nos modelos estatísticos deste trabalho. É possível que, nas concentrações mais elevadas de Hg, os mecanismos de desintoxicação através de Se se encontrem saturados, justificando a indução da biossíntese de MT. Correlações lineares positivas entre as concentrações de MT e de Hg foram identificadas no fígado e nos rins de diferentes espécies de aves marinhas (ELLIOTT *et al.*, 1992; KOJADINOVIC *et al.*, 2007; KEHRIG *et al.*, 2015). Além disso, Kehrig *et al.* (2015) também observaram que os níveis de MT estão positivamente correlacionados com a concentração de Hg inorgânico no fígado de *Spheniscus magellanicus*, mas não com MeHg.

Diferente dos metais abordados anteriormente, o Mn não é capaz de se ligar a MT (WAALKES; HARVEY; KLAASSEN, 1984). Entretanto, as análises realizadas neste trabalho por meio do GAM apontam para o Mn como uma variável preditora significativa dos níveis de MT, apresentando inicialmente uma associação positiva entre ambos, seguida por uma associação negativa bastante sutil a partir de concentrações de Mn em torno de 17 mg/kg peso seco. A indução da biossíntese de MT no fígado após exposição a Mn por diferentes vias já foi observada em estudos realizados em roedores e em galinhas (SUZUKI; YOSHIKAWA, 1976; EATON *et al.*, 1980; WAALKES; KLAASSEN, 1985; FLEET *et al.*, 1990; SATO *et al.*, 2001; KOBAYASHI *et al.*, 2007). Somado a isso, Kobayashi *et al.* (2007) observaram em

camundongos que a exposição a Mn também resulta em um aumento na expressão do transportador de Zn ZIP14, através de um processo pouco conhecido, mas dependente da expressão de interleucina-6 (IL-6), gerando como consequência uma elevação nos níveis de MT (KOBAYASHI *et al.*, 2007). Por outro lado, as variações observadas nos níveis de MT podem não ser resultado direto do aumento das concentrações de Mn no fígado dos albatrozes analisados.

O Mn é um metal essencial, que assim como as MT, desempenha um papel importante na defesa contra danos oxidativos, atuando como cofator para enzimas manganês superóxido desmutase (Mn-SOD) presentes nas mitocôndrias (AGUIRRE; CULOTTA, 2012). Portanto, é possível que animais expostos a condições de estresse oxidativo apresentem concentrações mais elevadas tanto de MT quanto de Mn na forma de Mn-SOD. Nesse sentido, Sato, Sasaki e Hojo (1995) verificaram que ratos tratados com fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL-6, citocinas liberadas durante processos inflamatórios gerados por danos oxidativos, apresentaram um aumento simultâneo na expressão e biossíntese de MT e Mn-SOD. Além do mais, o tratamento prévio de ratos com TNF e IL-6 reduziu consideravelmente a peroxidação lipídica e os danos causados ao fígado pela administração de tetracloreto de carbono, sugerindo uma atuação conjunta das MT e Mn-SOD na defesa antioxidante (SATO; SASAKI; HOJO, 1995).

Como mencionado anteriormente, apesar do Cu ter sido identificado como uma variável capaz de explicar parte da variação observada nos níveis de MT, um modelo preditivo claro não pôde ser produzido devido a presença de um indivíduo contendo uma concentração de Cu no fígado muito mais elevada que os demais. No entanto, a capacidade do Cu de induzir a biossíntese de MT no fígado já foi demonstrada em experimentos realizados em ratos (SUZUKI; YOSHIKAWA, 1976; EATON *et al.*, 1980), e correlações lineares positivas entre as concentrações de Cu e os níveis de MT foram identificados no fígado, rins e sangue de diferentes espécies de aves marinhas (STEWART; FURNESS; MONTEIRO, 1996; BARJAKTAROVIC; ELLIOTT; SCHEUHAMMER, 2002; KOJADINOVIC *et al.*, 2007; ROMERO *et al.*, 2015).

Com relação à massa corporal, Carravieri *et al.* (2020), ao utilizarem um GLM multifatorial para analisar a influência de diversos fatores sobre as concentrações de metais no sangue de ninhegos de trezes espécies de aves marinhas, incluindo uma pertencente ao gênero *Thalassarche* (*T. carteri*), detectaram uma correlação negativa significativa entre a concentração de Zn e a massa corporal total dos animais,

possivelmente devido a um efeito de diluição do metal durante o crescimento. Apesar do Zn ser um potente indutor da biossíntese de MT (FLEET *et al.*, 1998), além de ter sido o principal fator que explicou sua variação, uma clara correlação positiva foi identificada por meio do GAM entre a massa corporal dos albatrozes-de-sobrancelha amostrados e os níveis de MT no fígado. Esse fenômeno se justifica ao menos em parte pela existência de uma correlação linear positiva entre a concentração de Hg no fígado e a massa corporal, porém novas análises sobre a relação entre a massa corporal destas aves e as concentrações de metais se fazem necessárias para elucidar essa questão.

Foi verificado também que albatrozes-de-sobrancelha que continham resíduos plásticos no TGI apresentavam uma maior concentração de MT no fígado. Estudos recentes observaram que metais e metaloides podem se adsorver a superfície de plásticos (DAVRANCHE *et al.*, 2019; RAI *et al.* 2022), possivelmente atuando como vetores desses contaminantes ao serem ingeridos (DAVRANCHE *et al.*, 2019). Roman *et al.* (2020) identificaram que indivíduos pertencentes a duas espécies de aves marinhas do gênero *Pachyptila* (*P. turtur* e *P. belcheri*) que haviam ingerido fragmentos de plástico, quando analisados em conjunto, possuíam concentrações significativamente maiores de Cu, Zn e Cd no fígado, enquanto metais como Al, Fe e Co encontravam-se reduzidos (ROMAN *et al.*, 2020). Portanto, é plausível argumentar que a maior concentração de MT no fígado observada em albatrozes-de-sobrancelha que continham resíduos plásticos no TGI seja resultado da presença de concentrações mais elevadas de metais indutores da biossíntese de MT no fígado.

5.2 Associação das concentrações de metais e metaloides entre si e com demais variáveis individuais

Foi observado através do teste de Mann-Whitney que indivíduos que possuíam endoparasitas no interior do TGI apresentavam uma concentração significativamente maior de Cd no fígado. Diversos estudos realizados em diferentes modelos animais demonstram que a exposição crônica a Cd resulta em alterações severas nas respostas imunológicas (WANG *et al.*, 2021), portanto, é possível que cargas mais elevadas de Cd no organismo gerem uma maior vulnerabilidade a infecções parasitárias. Curiosamente, uma relação oposta foi observada para a presença de ectoparasitas, com aves nas quais ectoparasitas foram encontrados apresentando uma concentração significativamente menor de Cd no fígado. Esse resultado, porém,

deve ser considerado com cautela, pois os ectoparasitas de aves marinhas são frequentemente móveis, podendo abandonar o hospedeiro após a sua morte, enviesando assim os dados quanto a presença de ectoparasitas utilizados neste trabalho (VANSTREELS; PALMA; MIRONOV, 2020).

Além disso, uma correlação linear positiva entre a concentração de Hg no fígado e a massa corporal também foi identificada nos albatrozes-de-sobrancelha analisados. Um resultado similar foi obtido por Albertos *et al.* (2020), ao avaliarem as concentrações de Hg no fígado, rins e cérebro de nove espécies de aves marinhas do mar Mediterrâneo. De acordo com os autores, esse resultado provavelmente se deve ao fato de aves maiores serem capazes de ingerir presas maiores, que por sua vez conteriam quantidades absolutas mais elevadas de Hg em seus tecidos (ALBERTOS *et al.* 2020). Em contraste, Ackerman, Eagles-Smith e Herzog (2011) observaram em ninhegos da espécie *Sterna forsteri* que a concentração de Hg no sangue se correlacionou negativamente com a massa corporal e a idade das aves analisadas, possivelmente devido ao efeito de diluição gerado pelo crescimento rápido e pela excreção de Hg através das penas. No entanto, ao se tornarem juvenis, período em que a produção de penas e a velocidade de crescimento reduzem de forma considerável, as concentrações de Hg no sangue voltam a aumentar, evidenciando possíveis diferenças na acumulação de metais em diferentes estágios de desenvolvimento (ACKERMAN; EAGLES-SMITH; HERZOG, 2011).

Por fim, as correlações entre as concentrações de diferentes metais no fígado de albatrozes-de-sobrancelha já haviam sido analisadas por Lima *et al.* (2023) através de uma análise multivariável de componentes principais (PCA), separando as aves em grupos referentes as regiões nas quais foram coletadas (LIMA *et al.*, 2023). Neste trabalho, por outro lado, a existência de correlações entre os metais foi avaliada através dos testes de correlação de Pearson e de Spearman, considerando todos os animais como pertencentes a um único grupo. Por esse motivo, os resultados obtidos em ambos os estudos não podem ser diretamente comparados. Salvo Lima *et al.* (2023), somente três outros trabalhos investigaram as correlações entre as concentrações de metais e metaloides em albatrozes-de-sobrancelha, tendo sido realizados utilizando penas e sangue desses animais (PON *et al.*, 2011; FURTADO *et al.*, 2019; FURTADO *et al.*, 2020). Com exceção das correlações lineares positivas entre Cd e Cu e entre As e Cu observadas, respectivamente, por Pon *et al.* (2011) nas penas primárias de machos e por Furtado *et al.* (2020) no sangue, as correlações

observadas no presente trabalho diferiram do que foi identificado em outros estudos de forma considerável, possivelmente refletindo diferenças entre os locais de coleta dos indivíduos analisados e na acumulação de metais e metaloides em cada tecido.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi identificada a existência de uma correlação linear positiva entre as concentrações de MT e Zn no fígado dos albatrozes-de-sobrancelha amostrados. As análises utilizando GAM também apontaram o Zn como a variável que melhor explica a variação observada nos níveis de MT nas aves. Dessa forma, é plausível argumentar que concentração de MT no fígado possui potencial para ser utilizada como um biomarcador de exposição a Zn nestes animais. Por outro lado, o mesmo não pode ser dito quanto ao As, que apesar de se encontrarem em concentrações mais elevadas do que o observado em outras espécies de aves marinhas, não apresentou nenhum efeito significativo sobre os níveis de MT em amostras de fígado de albatrozes-de-sobrancelha.

Além do Zn, outros fatores identificados no presente estudo como variáveis preditoras significativas da concentração de MT foram as concentrações de Cd, Cu, Hg e Mn no fígado, a massa corporal, e a presença de resíduos plásticos no TGI. As relações observadas entre as concentrações de metais e os níveis de MT apresentaram padrões complexos, sugerindo uma possível atuação de outros mecanismos de desintoxicação simultâneos. Dessa forma, novos estudos se fazem necessário para que essas relações possam ser plenamente compreendidas. Neste contexto, a contribuição mais relevante do presente trabalho é apresentar evidências concretas que embasam o uso dos níveis de MT no fígado como um biomarcador da contaminação por Zn para albatrozes, a ser utilizado em programas de monitoramento ambiental da contaminação de cadeias tróficas oceânicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, Joshua T.; EAGLES-SMITH, Collin A.; HERZOG, Mark P.. Bird Mercury Concentrations Change Rapidly as Chicks Age: toxicological risk is highest at hatching and fledging. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 12, p. 5418-5425, 2011.

AGUIRRE, J. Dafhne; CULOTTA, Valeria C.. Battles with Iron: manganese in oxidative stress protection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 17, p. 13541-13548, 2012.

ALBERTOS, Silvia *et al.* Mercury Exposure in Birds Linked to Marine Ecosystems in the Western Mediterranean. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, n. 4, p. 435-453, 2020.

AMIARD, J.-C. *et al.* Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 160-202, 2006.

ARAI, Teruko *et al.* Chemical Forms of Mercury and Cadmium Accumulated in Marine Mammals and Seabirds as Determined by XAFS Analysis. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 24, p. 6468-6474, 2004

ARROYO, Verónica Souza *et al.* Liver and Cadmium Toxicity. **Journal of Drug Metabolism & Toxicology**, v. 03, n. 06, 2012.

BAAK, Julia E. *et al.* Spatial ecotoxicology: what we know about the relationship between avian movements and contaminant levels. **Environmental Reviews**, v. 32, n. 3, p. 315-333, 2024.

BARTOŃ, Kamil. MuMIn: Multi-model Inference. R package version 1.48.4 (<https://cran.r-project.org/web/packages/MuMIn>).

BARJAKTAROVIC, L.; ELLIOTT, J. E.; SCHEUHAMMER, A. M.. Metal and Metallothionein Concentrations in Scoter (*Melanitta* spp.) from the Pacific Northwest of Canada, 1989-1994. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 486-491, 2002.

BILLERMAN, S. M. *et al.*. **Birds of the World**. Ithaca: Cornell Laboratory of Ornithology, 2023. Disponível em: <https://birdsoftheworld.org/bow/home>. Acesso em: 05 nov. 2023.

BRADFORD, Marion M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAUNE, Birgit M.; SCHEUHAMMER, Anton M.. Trace element and metallothionein concentrations in seabirds from the Canadian Arctic. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 645-651, 2008.

BURGER, Joanna; GOCHFELD, Michael. Marine Birds as Sentinels of Environmental Pollution. **Ecohealth**, v. 1, n. 3, p. 263-274, 2004.

CARRAVIERI, Alice *et al.* Trace elements and persistent organic pollutants in chicks of 13 seabird species from Antarctica to the subtropics. **Environment International**, v. 134, p. 105225, 2020.

CHIAVERINI, Natalie; LEY, Marc de. Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. **Free Radical Research**, v. 44, n. 6, p. 605-613, 2010.

DAVRANCHE, Mélanie *et al.* Are nanoplastics able to bind significant amount of metals? The lead example. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 940-948, 2019.

DEL HOYO, J. *et al.* Black-browed Albatross (*Thalassarche melanophris*), version 1.0. In: BILLERMAN, S. M. *et al.*. **Birds of the World**. Ithaca: Cornell Laboratory of Ornithology, 2023. Disponível em: <https://birdsoftheworld.org/bow/home>. Acesso em: 05 nov. 2023.

EATON, David L. *et al.* Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and cytochrome P-450. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 393-402, 1980.

EIDE, David J.. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 711-722, 2006.

EINODER, L. D.; MACLEOD, C. K.; COUGHANOWR, C.. Metal and Isotope Analysis of Bird Feathers in a Contaminated Estuary Reveals Bioaccumulation, Biomagnification, and Potential Toxic Effects. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 1, p. 96-110, 2018.

ELLIOTT, J. E. *et al.* Heavy metal and metallothionein concentrations in Atlantic Canadian seabirds. **Archives Of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 63-73, 1992.

ELLIOTT, John E.; SCHEUHAMMER, Anton M.. Heavy metal and metallothionein concentrations in seabirds from the Pacific coast of Canada. **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 10, p. 794-801, 1997.

FLEET, James C. *et al.* Tissue-Specific Accumulation of Metallothionein in Chickens as Influenced by the Route of Zinc Administration. **The Journal of Nutrition**, v. 118, n. 2, p. 176-182, 1988.

FLEET, James C. *et al.* Induction of hepatic metallothionein by intraperitoneal metal injection: an associated inflammatory response. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology**, v. 258, n. 6, p. 926-933, 1990.

FURTADO, Ricardo *et al.* Body feather mercury and arsenic concentrations in five species of seabirds from the Falkland Islands. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110574, 2019.

FURTADO, Ricardo *et al.* Trace elements' reference levels in blood of breeding black-browed albatrosses *Thalassarche melanophris* from the Falkland Islands. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 31, p. 39265-39273, 2020.

HARTIG, Florian. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (multi-level/mixed) Regression Models. R package version 0.4.6 (<https://cran.r-project.org/web/packages/DHARMA>).

HASTIE, Trevor. GAM: Generalized Additive Models. R package version 1.22-4 (<https://cran.r-project.org/web/packages/gam/>).

HUGHES, Michael F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. **Toxicology Letters**, v. 133, n. 1, p. 1-16, 2002.

ISANI, Gloria; CARPENÈ, Emilio. Metallothioneins, Unconventional Proteins from Unconventional Animals: a long journey from nematodes to mammals. **Biomolecules**, v. 4, n. 2, p. 435-457, 2014.

KEHRIG, Helena A. *et al.* Trace-elements, methylmercury and metallothionein levels in Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) found stranded on the Southern Brazilian coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 96, n. 1-2, p. 450-455, 2015.

KOBAYASHI, Kazuo *et al.* Induction of Metallothionein by Manganese Is Completely Dependent on Interleukin-6 Production. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 2, p. 721-727, 2006.

KOJADINOVIC, J. *et al.* Trace Elements in Three Marine Birds Breeding on Reunion Island (Western Indian Ocean): part 2.:factors influencing their detoxification. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 3, p. 431-440, 2007.

LIMA, Guilherme dos Santos *et al.* Pelagic and estuarine birds as sentinels of metal(loid)s in the South Atlantic Ocean: ecological niches as main factors acting on bioaccumulation. **Environmental Pollution**, v. 326, p. 121452, 2023

LÜDECKE, Daniel. ggeffects: Create Tidy Data Frames of Marginal Effects for 'ggplot' from Model Outputs. R package version 1.7.0 (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggeffects/>).

MA, Yanju *et al.* Review of contaminant levels and effects in shorebirds: knowledge gaps and conservation priorities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, p. 113868, 2022.

NORDBERG, Monica; NORDBERG, Gunnar F.. Metallothionein and Cadmium Toxicology - Historical Review and Commentary. **Biomolecules**, v. 12, n. 3, p. 360, 2022.

PALMITER, R. D.; COLE, T. B.; FINDLEY, S. D.. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. **The Embo Journal**, v. 15, n. 8, p. 1784-1791, 1996.

PETROBRAS. **Sistema de Informação de Monitoramento da Biota Aquática**. Disponível em: <https://simba.petrobras.com.br/simba/web/>. Acesso em: 16 jul. 2024.

PON, Juan Pablo Seco *et al.* Trace metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn) in feathers of Black-browed Albatross *Thalassarche melanophrys* attending the Patagonian Shelf. **Marine Environmental Research**, v. 72, n. 1-2, p. 40-45, 2011.

RAHMAN, Mohammad Tariqur; LEY, Marc de. Arsenic Induction of Metallothionein and Metallothionein Induction Against Arsenic Cytotoxicity. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 151-168, 2016.

RAI, Prabhat Kumar *et al.* Adsorption of environmental contaminants on micro- and nano-scale plastic polymers and the influence of weathering processes on their adsorptive attributes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 427, p. 127903, 2022.

RENEDO, Marina *et al.* Mercury isotopes of key tissues document mercury metabolic processes in seabirds. **Chemosphere**, v. 263, 2021.

RICHIR, Jonathan. Trace Elements in Marine Environments: occurrence, threats and monitoring with special focus on the coastal mediterranean. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 06, n. 01, p. 1-19, 2016.

ROMAN, Lauren *et al.* Plastic, nutrition and pollution; relationships between ingested plastic and metal concentrations in the livers of two *Pachyptila* seabirds. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

ROMERO, María Belén *et al.* Metallothionein and lipid peroxidation as markers to assess health status of chronically oiled Magellanic penguins in Argentina. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 23, n. 1, p. 15-24, 2015.

SATO, Itaru *et al.* Metallothionein and Several Other Antioxidative Factors in Mice Treated with Magnesium and Manganese. **Radioisotopes**, v. 50, n. 8, p. 353-356, 2001.

SATO, M.; SASAKI, M.; HOJO, H.. Antioxidative Roles of Metallothionein and Manganese Superoxide Dismutase Induced by Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6. **Archives Of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, n. 2, p. 738-744, 1995.

SCHLOERKE, Barret *et al.* GGally: Extension to 'ggplot2'. R package version 2.2.1 (<https://cran.r-project.org/web/packages/GGally>).

SPILLER, Henry A.. Rethinking mercury: the role of selenium in the pathophysiology of mercury toxicity. **Clinical Toxicology**, v. 56, n. 5, p. 313-326, 2017.

STEWART, F. M.; FURNESS, R. W.; MONTEIRO, L. R.. Relationships between heavy metal and metallothionein concentrations in lesser black-backed gulls, *Larus fuscus*, and Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 30, n. 3, p. 299-305, 1996.

SOUZA, Carla *et al.* Trace Minerals in Human Health: iron, zinc, copper, manganese and fluorine. **International Journal of Science and Research Metodology**, v. 13, n. 3, p. 57-80, 2019.

SUZUKI, Yasutomo; YOSHIKAWA, Hiroshi. Induction of Hepatic Zinc-binding Proteins of Rats by Various Metals. **Industrial Health**, v. 14, n. 1-2, p. 25-31, 1976.

THERON, AJ; TINTINGER, GR; ANDERSON, R. Harmful Interactions of Non Essential Heavy Metals with Cells of the Innate Immune System. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 3, n. 01, p. 1-10, 2012.

THÉVENOD, Frank; WOLFF, Natascha A.. Iron transport in the kidney: implications for physiology and cadmium nephrotoxicity. **Metallomics**, v. 8, n. 1, p. 17-42, 2016.

THOMPSON, David R.. Heavy Metals in the Marine Environment. In: FURNESS, Robert W.; RAINBOW, Philip S.. **Heavy Metals in the Marine Environment**. New York: Crc Press.

TREDENNICK, Andrew T. *et al.* A practical guide to selecting models for exploration, inference, and prediction in ecology. **Ecology**, v. 102, n. 6, 2021.

TRUST, K. A. *et al.* Contaminant Exposure and Biomarker Responses in Spectacled Eiders (*Somateria fischeri*) from St. Lawrence Island, Alaska. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 107-113, 2000.

VANSTREELS, Ralph Eric Thijl; PALMA, Ricardo L.; MIRONOV, Sergey V.. Arthropod parasites of Antarctic and Subantarctic birds and pinnipeds: a review of host-parasite associations. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 12, p. 275-290, 2020.

VIARENGO, Aldo *et al.* A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 1, p. 69-84, 1997.

WAALKES, Michael P.; HARVEY, Michael J.; KLAASSEN, Curtis D.. Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. **Toxicology Letters**, v. 20, n. 1, p. 33-39, 1984.

WAALKES, Michael P.; KLAASSEN, Curtis D.. Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 5, n. 3, p. 473-477, 1985.

WALLACE, William G.; LEE, Byeong-Gweon; LUOMA, Samuel N.. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). **Marine Ecology Progress Series**, v. 249, p. 183-197, 2003.

WALLACE, William G.; LUOMA, Samuel N. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). **Marine Ecology Progress Series**, v. 257, p. 125-137, 2003.

WALKER, Colin. **Ecotoxicology**: effects of pollutants on the natural environment. New York: CRC Press, 2014.

WELLENREUTHER, Gerd *et al.* The ligand environment of zinc stored in vesicles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 380, n. 1, p. 198-203, 2009.

WANG, Zhineng *et al.* Effects of Cadmium Exposure on the Immune System and Immunoregulation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

WICKHAM, Hadley *et al.* ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. R package version 3.5.1 (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2>).

WOOD, Simon N. **Generalized Additive Models**: An Introduction with R. 2. ed. New York: Crc Press, 2017.