

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/11/2017.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

**O CARANGUEJO-UÇÁ, (*UCIDES CORDATUS*) (LINNAEUS, 1763)
(CRUSTACEA, BRACHYURA, OCYPODIDAE), COMO ESPÉCIE
BIOINDICADORA DO ESTADO DE CONSERVAÇÃO DE MANGUEZAIS**

CAROLINE ARAÚJO DE SOUZA

Dissertação/tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Novembro - 2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



O CARANGUEJO-UÇÁ, *UCIDES CORDATUS* (LINNAEUS, 1763) (CRUSTACEA, BRACHYURA, OCYPODIDAE), COMO ESPÉCIE BIOINDICADORA DO ESTADO DE CONSERVAÇÃO DE MANGUEZAIS.

CAROLINE ARAÚJO DE SOUZA

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO ANTONIO AMARO PINHEIRO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO AUGUSTO TORRES

2016

595.3 Souza, Caroline Araújo de
S729c O caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)
(Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), como espécie
bioindicadora do estado de conservação de manguezais /
Caroline Araújo de Souza. - Rio Claro, 2016
112 f. : il., figs., gráfs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Marcelo Antonio Amaro Pinheiro
Coorientador: Rodrigo Augusto Torres

1. Crustáceo. 2. Decapoda. 3. *Ucides cordatus*. 4. Espécie
bioindicadora. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO DA TESE: O CARANGUEJO-UÇÁ, UCIDES CORDATUS (LINNAEUS, 1763)
(CRUSTACEA, BRACHYURA, OCYPODIDAE), COMO ESPÉCIE
BIOINDICADORA DO ESTADO DE CONSERVAÇÃO DE MANGUEZAIS**

AUTORA: CAROLINE ARAUJO DE SOUZA

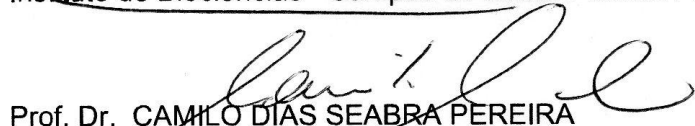
ORIENTADOR: MARCELO ANTONIO A PINHEIRO

COORIENTADOR: RODRIGO AUGUSTO TORRES

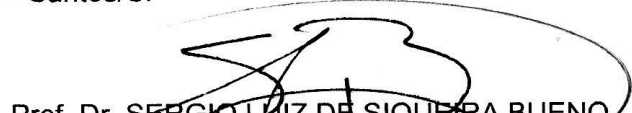
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCELO ANTONIO A PINHEIRO
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP - São Vicente / SP




Prof. Dr. CAMILO DIAS SEABRA PEREIRA
Departamento de Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Câmpus Baixada Santista - Santos/SP



Prof. Dr. SERGIO LUIZ DE SIQUEIRA BUENO
Departamento de Zoologia / Universidade de São Paulo - SP



Prof. Dr. RODRIGO BRASIL CHOUERI
Departamento de Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Câmpus Baixada Santista - Santos/SP



Profa. Dra. LUCIANA CAVALCANTI MAIA SANTOS
Curso de Engenharia de Pesca / UNESP - Câmpus de Registro - SP

Rio Claro, 04 de novembro de 2016

*Dedico à minha família, aos presentes e aos que
já se foram, que me guiaram até aqui.*

*“Moça olha só o que eu te escrevi
é preciso força pra sonhar e perceber que
a estrada vai, além do que se vê.”*

(Marcelo Camelo)

AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento especial às instituições e pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, em particular:

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, pela concessão de auxílio financeiro a partir de abril/2014, e a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES)*, pelo auxílio financeiro fornecido anteriormente. À *Comissão Técnico-Científica do Instituto Florestal (COTEC/FF)* pela autorização e auxílio para coleta dentro da *Estação Ecológica Juréia-Itatins (COTEC # 005.183/2015)*, bem como ao *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)*, pela licença destinada ao projeto de pesquisa de doutorado para *Caroline Araújo de Souza (SISBIO # 47.192-2)* e licença de coleta definitiva para *Marcelo Antonio Amaro Pinheiro (SISBIO # 13.581-1)*.

Ao *Prof. Dr. Marcelo A. A. Pinheiro*, meu orientador, que muito me ensinou, e por todas as oportunidades oferecidas que foram de grande valia para a minha formação. Agradeço pela paciência, pelas histórias e risadas, pelo eventual mau humor de ambos, por sabermos rir disso, e pela compreensão dos momentos pessoais. Espero que continuemos conduzindo muitos trabalhos juntos. Ao meu co-orientador, *Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres*, pela ajuda nos momentos de apuros do começo deste doutorado, e por ter me recebido em seu laboratório na *Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)*, em Recife (PE).

À *Priscila Ortega* e seu noivo (*Hector Vitorino*), pela ajuda e paciência. À *Profa. Dra. Flávia Pinheiro Zanotto*, que proporcionou esse contato. À *Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira*, por ter disponibilizado e compartilhado seu laboratório para minha aprendizagem. Aos professores da *UNESP IB/CLP*, *Dr. Marcos A. Oliveira* e *Dr. Marcos H. Toyama*, que disponibilizaram equipamentos imprescindíveis à conclusão deste trabalho nesta reta final.

Aos membros da minha banca de qualificação, *Prof. Dr. Patrício Alejandro Hernández Bové* e *Profa. Dra. Luciane Alves Maranhão*, pela solicitude e importantes apontamentos de melhorias neste trabalho.

Aos membros da minha banca de defesa de tese de doutorado, pela atenção dispensada e prontidão no aceite do convite. Obrigada por suas contribuições críticas à apresentação dos dados e melhorias a serem feitas.

Finalmente, mas sem nunca me esquecer, aos meus estimados colegas do *Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos (CRUSTA)*, da *UNESP IB/CLP*, por todos os momentos de amizade e dedicação. Agradeço, nominalmente, aos presentes, aos que já passaram e que

não fazem mais parte deste grupo: Camila Pimenta, Márcio João (*Xulala*), Victor Luiz (*Pi*), Nicholas Kriegler (*Maionese*), Michel Angeloni (*Mutley*), Michael Hereman (*Hetero*), Marcelo Souza, Dr. Felipe Duarte, Caio Nobre, Dr. Patrício Hernáez (Chile). Não há como não agradecer, distintamente, aos meus companheiros de madrugadas, coletas e ‘pizza na mão’: *Maionese*, *Mutley*, Camila e *Xulala*. Esse trabalho é de vocês também, porque sem vocês ele não teria acontecido.

Aos catadores de caranguejo, pilotos e donos de pousada que facilitaram muito o nosso trabalho. Em especial, ao *André Rodrigues* (“Andrézinho”), nosso catador de caranguejos oficial, pela simpatia, honestidade e eficiência. À Sílvia da Juréia, por ser sempre atenciosa, procurando ajudar na medida do possível cada um em seus projetos de pesquisa.

Aos meus amigos que estão sempre na torcida, mesmo não entendendo no que trabalho: *Hélida*; *Paloma* e *Tiago*; *Julia* e *Daniel*; *Jake* e *Suzana*; *Josi* e *Paulo*; *Karen* e *Evandro*; *Leandro*; *Lilian*; *Dayane*; *Gláucia* e *Daniel*; *Maurício*; *Rafael* e *Renata*; *Yokota* e *Vanessa*; *Lucio* e *Dani*. Amo pra sempre!

À minha família, meu amor incondicional, minha gratidão eterna pelo crédito que dão à minha capacidade e que, certamente, não mereço tanto. Meus pais, sempre tão presentes e compreensivos. Pensando neles, ainda acredito que há o melhor para as pessoas de bom coração. Isso pode não se traduzir em bens materiais, mas para alguns se revela na forma de carinho e reconhecimento. Um legado não palpável, mas que é repassado por gerações. Ao meu irmão *Thiago* e sua esposa, *Valéria*, pelas visitas, acolhimento em SP e descontração.

À família Viégas, da qual agora faço parte, sempre amorosos e barulhentos. Em especial à Dona Sogra (*Ana Maria*) que sempre se esmera em me agradar com comidinhas e pegar em nossas mãos quando a situação não vai bem.

Ao marido, companheiro da vida, exemplar pai de gato, *André Viégas*. Como nos votos do nosso casamento, reafirmo que só posso agradecer ao universo pelas nossas existências terem se cruzado. Como sempre, você esteve aqui, para me amparar, acalmar, alegrar e irritar com seu otimismo sem limites. Obrigada pela fé em mim.

SUMÁRIO

Introdução

1. Introdução

1.1 A importância dos manguezais e de *Ucides cordatus* 2

1.2 Ferramentas ecotoxicológicas 5

2. Objetivos

2.1 Objetivos específicos 8

3. Material e Métodos

3.1 Áreas de estudo e coleta de caranguejo 9

3.2 Ensaio do micronúcleo (MN‰) 10

3.3 Ensaio do vermelho neutro (NRRT) 11

3.4 Estimativa da concentração de metalotioneínas (MT) 12

3.5 Lipoperoxidação (LPO) 13

3.6 Experimento do efeito térmico sobre a integridade fisiológica da espécie 13

3.7 Análises estatísticas 14

4. Referências bibliográficas 15

Capítulo 1 24

Mangrove conservation monitoring by genocytotoxic biomarkers of the ‘uçá’-crab (*Ucides cordatus*): The seasonal effect on micronucleus (MN‰) and neutral red (NRRT) assays.

Capítulo 2 48

Biomarcadores de efeito genocitotóxico e fisiológicos no monitoramento de manguezais no Atlântico Ocidental: o caso do caranguejo *Ucides cordatus* como espécie-testemunho de qualidade ambiental.

Capítulo 3 88

Alterações térmicas e seu efeito sobre o estresse oxidativo (LPO) e estabilidade das membranas lisossômicas (NRRT) em um caranguejo de manguezal do Atlântico Ocidental.

RESUMO

Atividades antrópicas geram uma quantidade significativa de poluentes que são lançados no ambiente, muitas vezes ocasionando distúrbios ecológicos e possíveis alterações biológicas em vários níveis: molecular, celular, tecidual, individual, populacional e de comunidade. Entre os xenobiontes presentes nos ecossistemas aquáticos, inúmeros compostos químicos e orgânicos possuem potencial oxidativo, danificando membranas e aumentando os efeitos subletais. Desta forma, as quantificações dos danos celulares e defesas antioxidantes podem ser usadas como biomarcadores de contaminação. Foram coletados espécimes machos de *U. cordatus* em intermuda, em seis áreas de manguezal do litoral do Estado de São Paulo, com diferentes panoramas de contaminação, a fim de investigar possíveis diferenças sazonais, considerando duas épocas do ano verão (chuvosa) e inverno (estiagem). Inicialmente foi investigada a citogenotoxicidade dos espécimes, com registro das maiores médias de frequência de células micronucleadas (MN%) nos manguezais de Cubatão e São Vicente, coincidindo ao menor tempo de retenção do vermelho neutro (NRRT, em minutos), indicando sua alta interação com processos degenerativos, causados pelo contato com substâncias tóxicas. O inverso ocorreu nos manguezais de Cananéia e Juréia, considerados prístinos na avaliação dos dois biomarcadores. Os valores para NRRT demonstraram alterações sazonais, indicando uma maior sensibilidade desse marcador citotóxico em relação ao genotóxico. Os animais foram submetidos à biometria para detecção de possíveis alterações na relação do peso (em gramas, com balança de precisão) pela largura da carapaça (em milímetros, usando um paquímetro de precisão). O fator de condição para todas as áreas, independente do período amostral (chuvoso – verão; e seco – inverno), não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), enquanto no inverno ocorreram as maiores médias. Realizaram-se, também, as técnicas de metalotioneínas – MT e lipoperoxidação – LPO, em três tecidos: BA, brânquia anterior (respiratória); BP, brânquia posterior (osmorregulatória); e HP, hepatopâncreas (detoxificação). A concentração de metalotioneína foi mais elevada no verão, sempre obedecendo a ordem decrescente nos tecidos (HP > BP > BA), tendo se destacado na Juréia, em que se esperavam valores inferiores. Já para a lipoperoxidação as médias foram mais pronunciadas no inverno, com o hepatopâncreas detendo as maiores médias, com destaque a Juréia e Cananéia do restante das áreas. Estes dois biomarcadores fisiológicos foram sensíveis às alterações sazonais. Sob uma análise multivariada, concluímos que seria adequado o uso deste conjunto de biomarcadores durante a estiagem (inverno), em que outras influências biológicas são diminuídas, como é o caso da reprodução de *Ucides cordatus*, registrada sazonalmente mas para o verão. Além disso, foi constatado que todos os biomarcadores mostraram sensibilidade à poluição de cada uma das áreas amostrais, com destaque a NRRT e MT como os mais sensíveis à sazonalidade. O fator de condição foi descartado como biomarcador de efeito, pois seus resultados foram pouco explicativos para a contaminação local. Adicionalmente, foi realizado um experimento térmico, compreendendo teste agudo (horas) e crônico (dias), com manutenção de espécimes de *U. cordatus* sob elevada média térmica ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), visando avaliar as respostas fisiológicas frente a esta fonte de estresse. As células dos animais estudados apresentaram decréscimo do tempo de estabilidade da membrana lisossômica, pelo teste do vermelho neutro (NRRT), porém sem registro de diferenças expressivas quanto aos níveis de lipoperoxidação no hepatopâncreas e brânquias. Os dados sobre os danos subletais apresentados confirmam o caranguejo-uçá (*U. cordatus*) como espécie bioindicadora do estado de contaminação de áreas de manguezal do Atlântico Ocidental, podendo ser utilizadas em pacote tecnológico de monitoramento ambiental que está sendo refinado pelo Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos (CRUSTA), da UNESP IB/CLP. Os resultados obtidos evidenciam a necessidade de uma maior atenção do poder público sobre a contaminação de importantes ecossistemas costeiros, como os manguezais, que pela ação sinérgica de xenobióticos na biota pode ter prejudicado seus serviços ecossistêmicos.

ABSTRACT

Anthropic activities generate a significant amount of pollutants that are released into the environment, often causing ecological disturbances and possible biological changes at molecular, cellular, tissue, individual, population and community levels. Among xenobiotics in aquatic ecosystems, many chemical and organic compounds have oxidative potential, damaging membranes and increasing sublethal effects. Therefore, cell damage and antioxidant defenses measurements can be used as contamination biomarkers. *U. cordatus* intermolt male specimens were collected in six mangrove areas on the coast of the state of São Paulo, all in different contamination scenarios, in order to investigate possible seasonal differences, considering two weather seasons: summer (rainy) and winter (dry). Initially we investigated specimens' cytogenotoxicity, registering the highest average of micronucleated cells frequency (MN %) in the mangrove of Cubatão and São Vicente, matching the lowest neutral red retention time (NRRT, in minutes), indicating its high interaction with degenerative processes caused by the contact with xenobiotics. The opposite occurred in the mangroves of Cananéia and Juréia, considered pristine by the two biomarkers. NRRT values showed seasonal changes indicating a greater sensitivity of the cytotoxic marker in relation to the genotoxic one. Animals were submitted to biometrics to detect possible changes in weight (in grams, using a precision scale) through carapace width (in millimeters, using a precision caliper). The condition factor for all areas, regardless of the sampled period (rainy - summer, and dry - winter), did not show significant differences ($p < 0.05$), while in winter occurred the highest averages. There were also physiological tests (metallothionein - MT and lipid peroxidation - LPO) in three tissues: AG, anterior gill (respiratory); PG, posterior gill (osmoregulatory); and HP, hepatopancreas (detoxification). The concentration of metallothionein was higher in the summer, always following the descending order of the tissues (HP > PG > AG), especially in Juréia, in which lower values were expected. As for the lipid peroxidation, means were more pronounced in winter, with the hepatopancreas having the highest averages, especially in Juréia and Cananéia. These two physiological biomarkers were sensitive to seasonal changes. On a multivariate analysis, we concluded that it would be appropriate to use this set of biomarkers during the dry season (winter), in which other biological influences are diminished, such as *Ucides cordatus* reproduction, recorded seasonally, but in summer. Furthermore, it was found that all biomarkers shown sensitivity to pollution in each of the sampled areas, especially NRRT and MT as the most sensitive to seasonality. The condition factor was dismissed as an effect biomarker because its results did not explain the local contamination. Additionally, a thermal experiment was conducted, including acute (hours) and chronic (days) tests, maintaining *U. cordatus* specimens under high thermal average ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), aiming to evaluate the physiological responses to this stress source. Studied animals' cells showed a decrease in stability time of the lysosomal membrane by neutral red test (NRRT), but no significant difference records in lipid peroxidation levels in hepatopancreas and gills. Sublethal damage data presented confirm uçá-crab (*U. cordatus*) as a bioindicator species for mangrove areas' contamination status on the Western Atlantic, being able to be used in the environmental monitoring technological package being refined by the Research Group on Crustaceans Biology (CRUSTA), of the UNESP IB / CLP. The results show the need for greater attention from public authorities on the contamination of important coastal ecosystems, such as mangroves, that from the synergistic action of xenobiotics in their biota may have impaired their ecosystem services.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A avaliação do efeito de contaminantes sobre o ambiente e sua biota é um processo demasiadamente complexo e oneroso, pois os efeitos macroecológicos (p. ex., alterações em populações e comunidades), somente são evidentes após períodos de exposição crônica ou aguda (Moore *et al.*, 2004). Nesse sentido, a elucidação dos mecanismos iniciais de degradação (p. ex., nível molecular e/ou celular) pode garantir uma compreensão mais rápida sobre a situação do meio ambiente, evitando-se a ocorrência de danos em níveis biológicos superiores, caso aqueles iniciais sejam interrompidos ou mitigados em tempo hábil.

A ecotoxicologia é uma ciência que estuda o efeito que uma substância (ou conjunto delas) pode causar aos indivíduos, a uma população ou comunidade de organismos. Trata-se de um campo científico recente, com menos de 30 anos, que tem permitido avaliações do impacto ambiental por bioensaios agudos e crônicos, visando estabelecer relações de causa-efeito (Azevedo & Chasin, 2003). O biomonitoramento, que se insere nesta ciência, refere-se à análise sistemática de respostas biológicas dos organismos eleitos para avaliar mudanças ambientais, sejam elas causadas naturalmente ou por ação antrópica (Buss *et al.*, 2003).

O desenvolvimento urbano desenfreado dos municípios litorâneos brasileiros tem provocado impactos antrópicos diretos ao ecossistema manguezal (Martins & Wanderley, 2009). Com o advento da era industrial e da globalização, os impactos têm sido potencializados, gerando drásticas modificações às cidades litorâneas. Entre elas, destacando-se o elevado índice populacional, o uso inadequado dos recursos naturais e o expressivo aporte de efluentes de origem doméstica e industrial, que são lançados *in natura* nos corpos d'água, onde ocorre sua dispersão e biodisponibilidade aos vários ambientes costeiros (Cutroneo *et al.*, 2015). Os contaminantes produzem alterações bioquímicas e fisiológicas na biota, que podem ser quantificadas por índices estressores (ou biomarcadores) (Moore *et al.*, 1986; Dorigan & Harrison, 1987; Bayne *et al.*, 1988).

Os macroinvertebrados bentônicos estão entre os organismos de maior eficiência em processos de avaliação e monitoramento de impactos por atividade antropogênica, particularmente aqueles de ecossistemas aquáticos continentais (Goulart & Callisto, 2003). Diversos autores afirmam que o uso de organismos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos (p. ex., moluscos e crustáceos), seja mais vantajoso, devido a uma série de

características que possuem, como: *i*) Longevidade; *ii*) facilidade amostral e de identificação; *iii*) reduzida vagilidade; *iv*) ocupação diferencial de posições nas cadeias tróficas; e *v*) presença em uma grande variedade de nichos ecológicos (Barbour *et al.*, 1999; Baptista *et al.*, 2003; Silva, 2012). De acordo com Feldman & Connor (1992), a alteração de parâmetros abióticos pode ser decisória na estruturação da comunidade de macroinvertebrados, podendo influenciar sua distribuição espaço-temporal. Geralmente, a severidade dos impactos da contaminação varia de acordo com os tipos de substâncias disponíveis, com a sua toxicidade e estabilidade nos ecossistemas aquáticos, além do tempo de exposição (Baptista *et al.*, 2003).

Assim, o uso de macroinvertebrados como espécies bioindicadoras tem ganhado importância, pois refletem o histórico de um ambiente, particularmente aqueles de vida longa, como o caranguejo-uçá, que atinge seu tamanho máximo com 10 anos de idade (Pinheiro *et al.*, 2005). Apesar da importância desta espécie como recurso pesqueiro, seu uso como bioindicador de qualidade ambiental é recente, e alguns biomarcadores ainda estão em fase de validação para uso em protocolos de monitoramento (Pinheiro *et al.* 2012, 2013; Duarte *et al.* 2016).

1.1 A importância dos manguezais e de *Ucides cordatus*

Os manguezais oferecem condições propícias à alimentação e reprodução de muitas espécies, desempenhando um importante papel ecológico como berçário natural, fonte de abrigo e alimento (Schaeffer-Novelli, 1995; Pinheiro *et al.*, 2008; Schaeffer-Novelli *et al.*, 2016). São ecossistemas costeiros dotados de grande complexidade estrutural, permeando processos de diferentes origens e intensidades, resultando na interação entre ambientes (terrestre, marinho e de água doce) em regiões tropicais e subtropicais (Schaeffer-Novelli, 1995; Spalding *et al.*, 2010). Ainda, segundo Schaeffer-Novelli & Cintrón-Molero (1999), os manguezais resumem importância histórica e socioeconômica, servindo como sítio de pesca e mariscagem para muitas comunidades ao longo da costa brasileira.

É considerado um ambiente de alta produtividade, com relevante papel na ciclagem de nutrientes, que ali permanecem ou são transportados para outros ecossistemas costeiros adjacentes (Schaeffer-Novelli, 1995; Twilley *et al.*, 1997). Outros benefícios dos manguezais são: evitar o assoreamento do leito estuarino e atuar com barreira biogeoquímica à exportação de metais, seja por sua retenção nos sedimentos (Pinheiro *et al.*, 2012a,b; Lacerda *et al.*, 2013), em tecidos vegetais (Odum & Mciver, 1990; Silva *et al.*, 1990) e nos animais (Bastami *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.* 2012a,b; Hosseini *et al.*, 2012), além de fornecer proteção à linha

da costa contra a erosão por tsunamis e ressacas de maré, e representar importantes sítios de sequestro de carbono atmosférico (Barbier, 2000; Barbier *et al.* 2011).

No Código Florestal Brasileiro (Lei nº 12.651/2012), os manguezais são considerados Áreas de Preservação Permanente (APPs), apresentando relevância ecológica sobre o ciclo de vida de várias espécies de moluscos, crustáceos e peixes. Apesar de sua importância, este ecossistema tem sofrido impactos severos em toda a sua área de ocorrência no mundo, estimando-se que cerca de 50% de sua área total já tenha tido sua vegetação suprimida ou por sua convertida para atividades antrópicas, como a implantação de indústrias, portos, infraestruturas de urbanidade e tanques de aquicultura (FAO, 2007; Spalding *et al.*, 2010).

No Estado de São Paulo, em especial, a ocupação e uso inadequado de suas regiões litorâneas permitiu a instalação de diversas fontes de contaminação, que tem agido de forma contínua como estressores aos organismos desses ambientes (Abessa, 2002; Pinheiro *et al.*, 2008). Conforme Pusceddu *et al.* (2007), as ações antrópicas têm acarretado expressivo aporte de compostos químicos aos ambientes aquáticos, onde são acumulados na forma inerte ou tóxica, particularmente nos sedimentos. Tais contaminantes ficam biodisponíveis e podem ser encontrados nos diferentes nichos tróficos, causando desequilíbrios fisiológicos ao nível individual, populacional, de comunidade ou ecossistêmico (Seriani *et al.*, 2013). Neste sentido, avaliações sobre o estado de conservação de um organismo e/ou do ambiente que ocupa são necessárias, particularmente por análises ecotoxicológicas, que medem a capacidade dos compostos tóxicos causarem efeitos danosos aos organismos (Cesar *et al.*, 1997).

No ecossistema manguezal, *Ucides cordatus* (Figura 1) é um dos recursos pesqueiros mais importantes em toda sua área de ocorrência (Ivo & Gesteira, 1999), sendo a sua exploração uma das atividades extrativistas mais antigas em áreas litorâneas, gerando emprego, renda e subsistência às comunidades pesqueiras (Pinheiro & Fiscarelli, 2001). Esta espécie tem sido capturada muito além de sua capacidade de crescimento e recomposição populacional, somente se reproduzindo a partir de três anos de idade (com 6 cm, segundo a Portaria IBAMA nº 70/2000) e atingindo tamanho comercial (8 cm de largura de carapaça) com cerca de 10 anos, devido ao sua reduzida taxa de crescimento (Pinheiro *et al.*, 2005).

O caranguejo-uçá (*U. cordatus*) é um crustáceo semiterrestre, exclusivo de manguezais, com ampla distribuição no Atlântico Ocidental: Flórida, México, Antilhas, Norte da América do Sul, Guianas e Brasil (do Amapá até Santa Catarina) (Melo, 1996). Esta espécie já esteve integrada à família Ucididae, sendo composta por um único gênero (Števcíć, 2005; Ng *et al.*, 2008), representado por duas espécies: *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) e

Ucides occidentalis (Ortmann, 1987). Entretanto, recentemente, através de análises de relações filogenéticas (rDNA nuclear 28S, rDNA mitocondrial 16S e citocromo oxidase I), foi realocada, novamente, na família Ocypodidae, subfamília Ucidinae por Shih *et al.* (2016).

A espécie é responsável pela degradação da matéria vegetal senescente (folhas e propágulos) disponível sobre o sedimento (Christofolletti *et al.*, 2013), bem como por sua transformação em matéria orgânica particulada (Schories *et al.*, 2003; Nordhaus *et al.*, 2009). Também constroem tocas nas zonas intertidais, tendo relação direta com o sedimento e a água que invadem os manguezais durante a alta das marés (Pinheiro & Fiscarelli, 2001; Nordhaus *et al.*, 2009).



Figura 1. O caranguejo-uçá - *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763).
Foto: Delson Gomes.

A espécie consta na categoria de ‘Quase Ameaçada’ (NT) (Pinheiro *et al.*, 2016), tendo sido incluída no Plano de Ação Nacional para Conservação de Espécies Ameaçadas e de Importância Socioeconômica do Ecossistema Manguezal (PAN Manguezal / Portaria 9/2015, além de constar como uma das nove espécies em listas regionais que tratam da ameaçadas de extinção. Ainda, devido à sua importância econômica e ecológica, *U. cordatus* consta do Anexo II da Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004 (Brasil, 2004),

juntamente com o caranguejo guaiamú (*Cardisoma guanhumi*), o siri-azul (*Callinectes sapidus*) e outras espécies de invertebrados e peixes sobreexplorados ou ameaçados de sobreexploração. Na *Proposta de Plano Nacional de Manejo (PMN)* desses três braquiúros, organizada por Dias-Neto (2011), é evidente a preocupação com a qualidade ambiental e biota dos manguezais, indicando a premência de monitoramentos frequentes, assim como a mitigação de situações que impeçam o cumprimento dessas metas.

1.2 Ferramentas ecotoxicológicas

A absorção de poluentes por animais marinhos pode ocorrer por contato e/ou ingestão de compostos xenobióticos (Bryan, 1979). A contaminação por solução se dá através da absorção corpórea de poluentes, pela superfície corporal ou áreas específicas, como as brânquias; enquanto a ingestão ocorre quando o animal se alimenta. Segundo Adams *et al.* (1989) o contato constante com substâncias xenobióticas podem trazer impacto à biota, resultando em uma cascata de eventos que se inicia com efeitos celulares, químicos e biológicos, podendo, com o decorrer do tempo e contato, colocar em risco populações ou comunidades inteiras.

A exposição de um organismo *in situ* à substâncias xenobióticas pode acontecer de maneira rápida e intensa, causando a morte ou alterações severas em tecidos (imobilidade) e, portanto, com efeito letal ou de toxicidade aguda (CL 50) (Rand & Petrocelli, 1985). Já em análises ambientais, no caso de áreas degradadas, a avaliação pode ocorrer pelo estudo dos efeitos subletais, que nem sempre estão associados à mortalidade, mas às alterações na biologia do organismo, como a inibição do crescimento, alterações no comportamento e na fisiologia (Azevedo & Chasin, 2004). Neste caso, a concentração do agente tóxico permite a sobrevida do organismo, sendo denominada toxicidade crônica.

Neste sentido, os poluentes podem estimular os organismos a produzirem respostas, que são passíveis de identificação e quantificação pelo uso de biomarcadores (Amiard-Triquet *et al.*, 2013). O conceito geral do uso destes marcadores na biota implica na detecção precoce de perturbações ambientais, portanto, com caráter subletal, podendo levar ao declínio de populações ou comunidades inteiras ao longo do tempo (Amiard-Triquet *et al.*, 2011). Os danos subletais não matam imediatamente o animal, mas podem trazer consequências, como alterações no recrutamento de sua prole, gasto excessivo das reservas energéticas, diminuição da locomoção/reprodução, alterações comportamentais, sucesso reprodutivo, mobilização do metabolismo/energia, entre outros (Mcgeer *et al.*, 2000; Amiard-Triquet *et al.*, 2011).

Os animais apresentam mecanismos de detoxificação que impedem ou minimizam os danos subletais, sendo evidentes quando as concentrações dos xenobióticos superam a capacidade fisiológica de detoxificação do animal (Ahearn *et al.*, 2014). Quando a capacidade do sistema é extrapolada, os danos fisiológicos se instalam, podendo comprometer a capacidade dos organismos em responder às pressões do meio (Bijlsma & Loeschcke, 2012).

Dentre alguns métodos empregados na detecção de alterações pelos organismos estão o ensaio do vermelho neutro (Lowe *et al.*, 1995), a dosagem de metalotioneínas (Viarengo *et al.*, 1997), a análise de peroxidação lipídica (Halliwell & Gutteridge, 1985) e uma avaliação de danos ao DNA pelo teste do micronúcleo (Rose & Anderson, 2005).

O ensaio de tempo de retenção do vermelho neutro (NRRT) trata dos danos fisiológicos à membrana lisossômica, que ocorrem pelo ataque constante de radicais livres, prejudicando a permeabilidade e estrutura das membranas celulares (Lowe *et al.*, 1995). Trata-se de um teste *in vitro* extremamente eficaz, de baixo custo e fácil replicação, possibilitando avaliar a integridade da membrana lisossomal. Baseia-se no uso do vermelho neutro, um corante vital e solúvel em água, que pode atravessar a membrana plasmática e se concentrar nos lisossomos, onde se fixa por ligações eletrostáticas. Muitas substâncias danificam as membranas celulares e lisossomais, resultando no decréscimo de captura e ligação ao vermelho neutro, tornando possível a avaliação do estresse celular por sua intensidade da coloração (Daguano *et al.*, 2007). Este biomarcador foi previamente empregado por Pinheiro (2012) para esta mesma espécie alvo, embora isso tenha sido avaliado apenas para os meses de inverno. De acordo com Caricato *et al.* (2010), Hagger *et al.* (2010) e Dissanayake *et al.* (2011), já foram relatados efeitos diferentes entre diferentes épocas climáticas (verão e inverno) para algumas espécies de siris e moluscos, fatos desconhecidos para *U. cordatus*.

As metalotioneínas são proteínas de baixo peso molecular, produzidas por células, com capacidade de ligação a íons metálicos, que tem por função armazenar e imobilizar metais tóxicos em formas não tóxicas, além de auxiliarem a regulação metabólica (Viarengo *et al.*, 1999). Suzuki *et al.* (1998) relataram que as metalotioneínas sequestram os metais por seus grupos sulfidrilas, atuando, também, na proteção contra danos oxidativos (Patrick, 2003). A dosagem destas proteínas pode quantificar o quão ameaçada se encontra uma espécie ou seu habitat, o que pode ser correlacionado, indiretamente, à quantificação dos metais ou de um conjunto de xenobióticos no ambiente (Viarengo *et al.*, 1997).

Os sistemas de defesa antioxidante protegem o organismo de efeitos danosos, embora o insucesso na manutenção da homeostase extracelular possa levar ao estresse oxidativo

(Lima & Abdalla, 2001). Invertebrados estuarinos com respiração branquial estão frequentemente submetidos à extremas variações ambientais, enfrentando períodos cíclicos de privação de O₂. O constante estresse ambiental pode ser agravado pela presença de poluentes que acentuam os ciclos naturais de anoxia/hipoxia, reduzindo a disponibilidade de O₂ dissolvido na água, ocasionando variações metabólicas e fisiológicas prejudiciais, com alteração no balanço oxidativo das brânquias (Fernandes, 2010). Os trabalhos de Livingstone *et al.* (1986, 1988 e 1990), utilizando bivalves de água doce, confirmaram o potencial uso dos parâmetros antioxidantes como indicativos da contaminação ambiental. Também já foi demonstrado que alguns braquiúros respondem diferentemente ao estresse ambiental por seu sistema antioxidativo (Kong *et al.*, 2008). A lipoperoxidação (LPO) é um marcador de efeito citotóxico primário que quantifica os radicais livres (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio), que atacam os lipídeos da membrana celular do animal, podendo, assim, causar sua degeneração (Romero *et al.*, 1998). Tal ação pode desencadear alterações na membrana, como em sua permeabilidade e redução de seletividade, promovendo diversas lesões fisiológicas e ao DNA celular.

A quantificação da frequência de células micronucleadas é uma técnica simples, rápida e de fácil execução, que tem sido amplamente utilizada na avaliação do impacto genotóxico causado por substâncias xenobióticas (Scarpato *et al.*, 1990; Pinheiro *et al.*, 2013). Os micronúcleos podem ser gerados por exclusão de cromossomos inteiros ou fragmentos de cromatina, durante a divisão celular, permanecendo como estruturas citoplasmáticas envoltas por membrana, sem a existência de qualquer ligação ao núcleo (Stopper & Muller, 1997). Acredita-se que a frequência de micronúcleos em um organismo seja indicativa de seu grau de exposição às substâncias xenobióticas, com elevação deste parâmetro nos ambientes mais contaminados (Hoshina *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que os estudos que utilizam biomarcadores na detecção de impactos ambientais considerem diferenças sazonais quanto aos parâmetros abióticos (p. ex., temperatura, pH da água, oxigênio dissolvido, etc.) (Azevedo & Braga, 2011). Assim, a ação e combinação destes parâmetros criam situações diversas de contaminação pelas distintas vias de entrada desses xenobióticos nos organismos. No Brasil, por exemplo, na maior parte do território existe duas estações climáticas bem marcantes (verão e inverno), delimitadas, principalmente, por diferentes níveis de pluviosidade (época chuvosa e de estiagem) (Sant'anna-Neto, 2005). Diversos trabalhos têm detectado diferenças significativas nas respostas entre os biomarcadores, em uma gama de organismos, como plantas comerciais,

moluscos, crustáceos e peixes (Orbea *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2004; Koukouzika & Dimitriadis, 2005; Seriani *et al.*, 2013).

Conclusão

- As temperaturas aplicadas no experimento foram suficientes para a desestabilização das membranas celulares;
- Houve uma aclimação dos animais após um longo período de exposição;
- O estudo traz o primeiro registro de influência de temperatura sobre as membranas celulares de *Ucides cordatus*.

Referências bibliográficas

Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2014. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J. Comp. Physiol. B* 174, 439-452.

Amiard-Triquet, C. Rainbow, P.S., Roméo, M., 2011. *Tolerance to Environmental Contaminants*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Anger, K., Harms, J., Montú, M., De Bakker, C., 1990. Effects of salinity on the larval development of a semiterrestrial tropical crab, *Sesarma angustipes* (Decapoda: Grapsidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 62, 89-94.

Araújo-Júnior, J.M.C., Ferreira, T.O., Suarez-Abelenda, M; Nóbrega, G.N., Albuquerque, A.G.B.M., Bezerra, A.C., Otero, X.L., 2016. The role of bioturbation by *Ucides cordatus* crab in the fractionation and bioavailability of trace metals in tropical semiarid mangroves. *Mar. Poll. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2016.07.011

Arenas-Sánchez, A., Rico, A., Vighi, M., 2016. Effects of water scarcity and chemical pollution in aquatic ecosystems: State of art. *Sci. Total Environ.* 572, 390-403.

Branco, J.O., 1993. Aspectos ecológicos do caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus 1763) (Crustacea, Decapoda) do manguezal do Itacorubi, Santa Catarina, BR. *Arq. Biol. Tecnol.* 36(1), 133-148.

Branco, P.C., 2014. Avaliação de resposta imune nata de ouriços-do-mar antárticos *Sterechinus neumayeri* e tropicais *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* frente ao aquecimento global. Tese de doutorado - Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo (SP), 189p.

Christofoletti, R.A., Hattori, G.Y., Pinheiro, M.A.A. 2013. Food selection by a mangrove crab: temporal changes in fasted animals. *Hydrobiologia* 702, 63-72.

- Cottens, K.F., Silva, U.A., Becker, A.G., Istchiuk, I., Ostrensky, A., 2010. A variação da taxa de sobrevivência e do tempo de desenvolvimento de larvas de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) cultivadas sob diferentes temperaturas. Boletim Técnico-Científico CEPNOR 10(1), 67-78.
- Duarte, L.F.A., Souza, C.A., Nobre, C.R., Pereira, C.D., Pinheiro, M.A.A., 2016. Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western Atlantic. Ecotox. Environ. Safe. 133, 176-187.
- Dutra, B.K., Fernandes, F.A., Lauffer, A.L., Oliveira, G.T., 2009. Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). Comp. Biochem. Phys. C 149, 640-646.
- Gardner, G., Maguire, G.B., Williams, H., 2004. Effects of water temperature and thermoclines on larval behavior and development in the giant crab *Pseudocarcinus gigas* (Lamarck). J. Plankton Res. 26(4), 393-402.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn, W.O., 1954. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. Science 119, 4562-4570.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, New York.
- Harding, J.M., Couturier, C.Y.R., Parsons, G.J., Ross, N.W., 2004. Evaluation of the neutral red retention assay as a stress response indicator in cultivated mussels (*Mytilus* spp.) in relation to post-harvest processing activities and storage conditions. Aquaculture 231, 315-326.
- Hauton, C., Hawkins, L.E., Hutchinson, S., 1998. The use of the neutral red assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). Comp. Biochem. Phys. B 119, 619-623.
- Hermes-lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue based on the Fe(III)Xylenol orange complex formation. Free Radical Bio. Med. 19, 271-280.

Hochaka, P.W. and Somero, G.N., 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, Oxford.

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais, 2003. Portaria nº 52, de 30 de setembro de 2003.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change, 2014. Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the IPCC, IPCC, Geneva, Switzerland.

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007. Impacts, adaptation and vulnerability summary for policymakers. Working Group II Contribution to the IPCC, Fourth Assessment Report Climate Change.

Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384-389.

Jiang, Z.Y., Woolard, A.C.S., Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and iodometric method. *Lipids* 26, 853-856.

Lee, S.B., Birch, G.F., Lemckert, C.J., 2011. Field and modelling investigations of freshwater plume behavior in response to infrequent high precipitation events, Sydney Estuary, Australia. *Estuar. Coast. Shelf S.* 92, 389-402.

Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* 68, 253-278.

Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H., 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an *in vitro* study. *Mar. Ecol. – Prog. Ser.* 129, 189-196.

Magrin, G.O., Marengo, J.A., Boulanger, J.P., Buckeridge, M.S., Castellanos, E., Poveda, G., Scarano, F.R., Vicuña, S., 2014. Central and South America. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Barros, V.R., Field, C.B., Dokken, D.J., Mastrandrea, M.D., Mach, K.J., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B., Kissel, E.S., Levy, A.N.,

- Maccracken, S., Mastrandrea, P.R., White, L.L. (eds.]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1499-1566.
- Maciel, F.E., Rosa, C.E., Santos, E.A., Monserrat, J.M., Nery, L.E.M., 2004. Daily variations in oxygen consumption antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Can. J. Zool.* 8, 1871-1877.
- Maciel, F.E., Geihs, M.A., Vargas, M.A., Cruz, B.P., Ramos, B.P., Vakkuri, O., Meyer-Rochow, V.B., Nery, L.E.M., Allo, S., 2008. Daily variation of melatonin content in the optic lobes of the crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Phy. A* 149, 162-166.
- Martinez, C.B.R., E. P. Alvares, Harris, R.R., Santos, M.C.F., 1999. A morphological study on posterior gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. *Tissue Cell* 31(3), 380-389.
- Mcgeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout: 1. Ion-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat. Toxicol.* 50, 231-243.
- Molinos, J.G., Halpern, B.S., Schoeman D.S., Brown, C.J., Kiessling, W., Moore, P.I., Pandolfi, J.M., Poloczanska, E.S., Richardson, A.J., Burrows, M.T., 2015. Climate velocity and future global redistribution of marine biodiversity. *Nat. Clim. Change* 6, 83-88.
- Nordhaus, I., Diele, K., Wolff, M., 2009. Activity patterns, feeding and burrowing of the crab *Ucides cordatus* (Ucididae) in a high intertidal mangrove forest in North Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol* 379, 104-112.
- Ortega, P., Santos, R.A., Lacouth, P., Rozas, E.E., Custodio, M.R., Zanotto, F.P., 2014. Cytochemical characterization of gill and hepatopancreatic cells of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura) validated by cell metal transport. *Iheringia Ser. Zool.* 104, 347-354.
- Peters, E.C., Gassman, N.J., Firman, J.C., Ricnmond, R.H., Power, E.A., 1997. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(1), 12-40.
- Pinheiro, M.A.A. e Almeida, R., 2015. Monitoramento da densidade e da estrutura populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura: Ucididae). In: TURRA, A.; DENADAI, M. R. (Orgs.). Protocolos de campo para o monitoramento de habitats bentônicos costeiros. Rede de Monitoramento de Habitats Bentônicos Costeiros. São Paulo: ReBentos, p. 118-129.

- Pinheiro, M.A.A., Duarte, L.F.A., Toledo, T.R., Adam, M.L., Torres, R.A., 2013. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tolls to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 185, 8273-8285.
- Pinheiro, M.A.A., Silva, P.P.G., Duarte, L.F.A., Almeida, A.A., Zanotto, F.P., 2012. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). *Ecotox. Environ. Safe.* 81, 114-121.
- Pinheiro, M.A.A. e Hattori, G. Y., 2003. Embryology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae). *J. Crustacean Biol.* 23(3), 729-737.
- Pinheiro, M.A.A. e Fiscarelli, A.G., 2001. Manual de apoio a fiscalização do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*). Itajaí: UNESP, CEPSUL/IBAMA, 43p.
- Pinheiro, M.A.A.; Fransozo, A. e Negreiros-Fransozo, M.L. 1994. Estimativa da Duração do Desenvolvimento larval em função da temperatura para a Família Majidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Boletim do Instituto de Pesca*, 21(único): 75-81.
- Pinto, H.S., 2010. Adaptação do Setor Agrícola Brasileiro. *In: Marengo, J., Schaeffer, R., Zee, D., Pinto, H.S. Mudanças Climáticas e Eventos Extremos no Brasil. FBDS – Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável*, 34-51.
- Ralston, D.K., Warner, J.C., Geyer, W.R., Wall, G.R., 2013. Sediment transport due to extreme events: The Hudson River estuary after tropical storms Irene and Lee. *Geophys. Res. Lett.* 40, 5451-5455.
- Runcie, D.E., Garfield, D.A., Babbitt, C.C., Wygoda, J.A., Mukherjee, S., Wray, G.A., 2012. Genetics of gene expression responses to temperature stress in a sea urchin gene network. *Mol. Ecol.* 21(18), 4547-4562.
- Sastry, A.N., 1983. Ecological aspects of reproduction. *In: Vernberg, F.J. & Vernberg, W.B. (eds.) The biology of Crustacea. Environmental Adaptations.* New York, Academic Press, 179-270.

Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., Adaime, R.R., Camargo, T.M. (1990) Variability of the mangrove ecosystem along the Brazilian coast. *Estuaries* 13(2), 204-218.

Schaeffer-Novelli, Y., Soriano-Sierra, E.J., Vale, C.C., Bernini, E., Rovai, A.S., Pinheiro, M.A.A., Schmidt, A.J., Almeida, R., Coelho-Jr, C., Menghini, R.P., Martinez, D.I., Abuchahla, G.M.O., Cunha-Lignon, M., Charlier-Sarubo, S., Shirazawa-Freitas, J., Cintrón-Molero, G (2016) Climate changes in mangrove forests and saltmarshes. *Braz. J. Oceanogr.* 64(sp2), 83-98.

Sokal, R.R. e Rohlf, F.J., 2003. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. New York: W.H. Freeman, 3rd Ed., 887p.

Somero, G.N., 2010. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *J. Exp. Biol.* 213, 912-920.

Sokolova, I.M. e Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Res.* 37, 181-201.

Tomita, R.Y. e Beyruth, Z., 2005. *Divulgação Técnica: Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos*. São Paulo, 135-142.

Trenberth, K.E., Jones, P.D., Ambenje, P., Bojariu, R., e outros, 2007. Observations: surface and atmospheric climate change. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M Miller HL (eds) *Climate Change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the 4th Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, 235-336.

Trídico, C.P., Rodrigues, A.C.F, Nogueira, L., Silva, D.C., Moreira, A.B., Almeida, E.A., 2010. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pirene and Diazinon. *Ecotox. Environ. Safe.* 73(5), 858-863.

Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M., 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecol. Indic.* 23, 274-279.