

---

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).



**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**

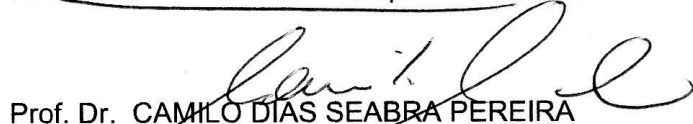
**ORIENTADOR: MARCELO ANTONIO A PINHEIRO**

**COORIENTADOR: RODRIGO AUGUSTO TORRES**

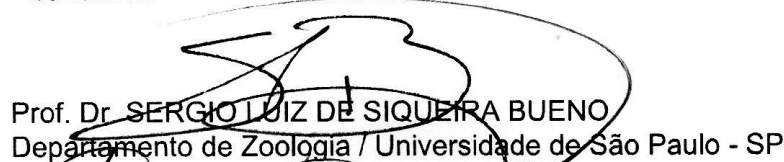
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:



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



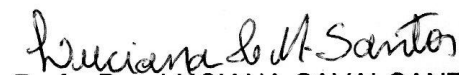
Prof. Dr. CAMILO DIAS SEABRA PEREIRA  
Departamento de Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Câmpus Baixada Santista - Santos/SP



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 O<sub>2</sub>. O constante estresse ambiental pode ser agravado pela presença de poluentes que acentuam os ciclos naturais de anoxia/hipoxia, reduzindo a disponibilidade de O<sub>2</sub> 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).

## 2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar biomarcadores aplicados ao caranguejo-uçá, espécie chave do ecossistema manguezal, submetida a diferentes impactos antrópicos e contaminação no litoral paulista. Assim, avaliou-se a existência de diferenças sazonais quanto ao comprometimento de sua integridade biológica (saúde), bem como seu possível uso como bioindicador da qualidade ambiental.

### 2.1 Objetivos específicos

- a) Utilizar, concomitantemente, um conjunto de biomarcadores para avaliar a qualidade ambiental de seis áreas de manguezal do litoral paulista, com base em testes específicos de hemolinfa do caranguejo-uçá, em base genotóxica (MN%, teste micronúcleo) e citotóxica (NRRT, teste vermelho neutro), assim como testes fisiológicos (LPO, lipoperoxidação; e MT, metalotioneína);
- b) Avaliar o efeito de alterações nos parâmetros físico-químicos ambientais, decorrentes da sazonalidade (época chuvosa *vs.* época estiagem) sobre a resposta de biomarcadores genocitotóxicos e fisiológicos, em áreas de manguezal com diferentes níveis de contaminação estabelecidos previamente; e
- c) Reconhecer, experimentalmente, os possíveis efeitos do estresse térmico sobre o comprometimento das membranas lisossômicas da espécie (NRRT, teste vermelho neutro), assim como sobre os níveis de lipoperoxidação (LPO) para os tecidos branquiais (anterior e posterior) e hepatopancreático do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*).

Tendo em vista os diferentes impactos antrópicos e cenários de contaminação ambiental nos manguezais do Estado de São Paulo, o presente estudo complementa e dá continuidade à série de dados obtidos durante o desenvolvimento do *Projeto Uçá III (Fapesp Proc. # 2009/14725-1)*, coordenado por Pinheiro (2012), relativo a contaminação de metais

sobre os manguezais e sua biota (*Rhizophora mangle* e *Ucides cordatus*). Neste trabalho foram dosadas as concentrações de metais em diferentes compartimentos ambientais (água; sedimento; e folhas senescentes do mangue-vermelho – alimento do caranguejo-uçá), assim como em tecidos do caranguejo-uçá (brânquias, hepatopâncreas e musculatura), registradas em seis áreas de manguezal do Estado de São Paulo. Naquela ocasião foi registrado o acúmulo de metais na água (Pb), no sedimento (Cd, Pb, Cr e Hg), assim como nos tecidos desse caranguejo (Cu e Mn) e nas folhas daquela espécie arbórea (Mn). Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram que em cada área de manguezal foram registrados metais em diferentes proporções. Aliado a isso, existe, ainda, o conhecido histórico diferencial de contaminação das áreas de manguezal estudadas, respaldado em artigos previamente publicados, que atestam distintos panoramas de degradação dessas áreas litorâneas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Áreas de estudo e coleta de caranguejo

Os manguezais estudados foram previamente caracterizados durante o desenvolvimento do *Projeto Uçá III (FAPESP – Proc. # 2009/14725-1)*, sob a coordenação de Pinheiro (2012), quando foram quantificados seis metais (Cd, Cu, Cr, Mn, Hg e Pb) em diferentes compartimentos: água, sedimento, folhas do mangue-vermelho (*R. mangle*) e tecidos do caranguejo-uçá. Segundo esta análise preliminar, estas seis áreas de manguezal (Figura 2) apresentaram níveis de contaminação distintos, seguindo a seguinte ordem hierárquica crescente: Juréia = Cananéia > (Iguape = Bertioga = Cubatão) > São Vicente. Importante destacar que estes manguezais ocorrem muitas vezes em áreas estuarinas distintas, sendo caracterizadas, por seu histórico de contaminação, da seguinte forma: **1) Cananéia (CAN)**, no extremo sul paulista, faz parte da Unidade de Conservação Estadual: Parque Estadual Ilha do Cardoso (PEIC), com intensa atividade pesqueira artesanal (Mendonça, 2015; Collaço *et al.*, 2015a, b); **2) Iguape (IGU)**, no mesmo complexo estuarino, com influência mineradora ocorrida de 1954 a 1995, às margens do Rio Ribeira de Iguape (Mahiques *et al.*, 2009, 2013); **3) Juréia (JUR)**, uma Unidade de Conservação Estadual (EEJI, Estação Ecológica Juréia-Itatins), livre de contaminantes (área controle) (Souza & Barrela, 2001; Pinheiro *et al.*, 2013; Baptista & Vieira, 2014); **4) Cubatão (CUB)**, localizada no Estuário de Santos-São Vicente (ESSV), com histórico de presença de diversos contaminantes, principalmente aqueles derivados de escórias industriais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Martins *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012, 2013); **5) São Vicente**

(SAV), localizada no mesmo estuário da área de Cubatão, com intenso impacto antrópico, causado, principalmente, por efluentes domésticos e resíduos sólidos (Kirschbaum *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2013); e 6) **Bertioga (BET)**, com grande representatividade de manguezais, manutenção da beleza paisagística e reduzida influência antrópica local (Eichler *et al.*, 2006).

Os exemplares de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) foram coletados em três subáreas de manguezal (réplicas), para cada área previamente citada. Estes foram coletados por braceamento (vide Pinheiro & Fiscarelli, 2001), compreendendo 10 animais adultos íntegros (presença de todos os apêndices locomotores), em estágio de intermuda (Pinheiro & Fiscarelli, 2001) e largura da carapaça  $\geq 60$  mm (segundo IBAMA, 2003). Foram realizadas duas expedições em 2015 – verão (janeiro-março) e inverno (julho-agosto) – somando 180 exemplares/estação e totalizando 360 indivíduos. Logo após a captura, os animais foram transportados até o laboratório, em caixas térmicas e imobilizados, evitando, assim, confrontos agonísticos. Após aclimatados, foram submetidos a biometria, aferindo-se a medida de seu tamanho (LC, largura da carapaça) com paquímetro de precisão (0,05mm), e peso úmido com balança de precisão (0,01g).

### 3.2 Ensaio micronúcleo (MN‰)

De cada caranguejo foi retirada uma amostra de hemolinfa para a confecção de lâminas para o ensaio micronúcleo, seguindo o protocolo modificado de Scarpato *et al.* (1990), previamente utilizado para *U. cordatus* por Nudi *et al.* (2010) e Pinheiro *et al.* (2013). Cada lâmina de microscopia (n=2) recebeu uma gota de hemolinfa, com posterior realização de um esfregaço similar ao sanguíneo humano. As lâminas foram inicialmente secas naturalmente ao ar (20 min.), submetidas à solução de Carnoy (3:1 metanol/ácido acético) por para fixação das células (20 min.) e novamente secas por igual tempo. Cada lâmina foi corada com solução Giemsa 2% ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,8) por 15 min., em seguida lavada com água deionizada para remoção do excesso. Após secas, cada lâmina recebeu uma lamínula com Entellan<sup>®</sup> (Merck<sup>®</sup>). A fim de se identificar o número de células micronucleadas por 1.000 analisadas (MN‰), as lâminas foram observadas em microscópio óptico Zeiss<sup>®</sup> (1.000x), com anotação das formações nucleares obedecendo às características propostas por Countryman & Heddle (1976).



**Figura 2** – Seis áreas de manguezal do Estado de São Paulo, estabelecidas para a captura dos exemplares de *Ucides cordatus*, cada uma representada por três subáreas amostrais (réplicas = pontos vermelhos) (Fonte: Imagens de satélite do Google Earth<sup>®</sup>, modificadas por Gustavo Pinheiro).

### 3.3 Ensaio vermelho neutro (VN) ou estabilidade da membrana lisossômica

Foram obtidas amostras de hemolinfa de 30 animais para cada área de manguezal analisadas, em duas estações (verão e inverno), totalizando 360 animais estudados. A integridade lisossomal foi avaliada pelo método adaptado de Lowe *et al.* (1995), desenvolvido para moluscos bivalves, que foi alterada em sua composição e aplicada com sucesso em *Ucides cordatus*, por Duarte *et al.* (2016). As lâminas foram descontaminadas com ácido nítrico (5%), lavadas e secas, sendo, posteriormente, tratadas com solução de 10 $\mu$ L de Poly-L-lisina (1:10 em água destilada), para a adesão dos hemócitos. Para a diluição da hemolinfa foi utilizada uma solução fisiológica (4,77g de HEPES + 25,58g de cloreto de sódio + 4,36g de sulfato de magnésio + 0,75g de cloreto de potássio + 1,92g de cloreto de cálcio, em 1L de água destilada, mantendo-se pH 7,36). Uma solução estoque de vermelho neutro foi preparada (22,8 mg do corante em 1mL de DMSO), sendo diluída para a obtenção da solução de trabalho (10 $\mu$ L solução estoque em 5mL de solução fisiológica). Adicionalmente, foi preparada uma solução anticoagulante (2,05g glicose + 0,8g de citrato de sódio + 0,42g de cloreto de sódio, em 100 mL de água destilada). A solução anticoagulante e fisiológica foram misturadas (3:2 respectivamente), com um volume de 0,5mL disposto em seringas hipodérmicas munidas de agulha hipodérmica de 21G, juntamente adicionados a 0,5 mL da

hemolinfa de cada animal, com homogeneização deste conteúdo e transferência para microtubos (2mL), que foram mantidos em descanso (15-20 min.). Posteriormente, 40 $\mu$ L dessa solução foi espalhada por toda a superfície de cada lâmina, que foram mantidas em câmara úmida escura (15 min.), para melhor aderência das células à superfície laminar. Em seguida, 40 $\mu$ L da solução trabalho de vermelho neutro foi gotejada sobre a camada de hemócitos, com as lâminas mantidas em uma câmara escura/úmida (15 min.), cobertas por lamínula e removendo o excesso desse líquido com papel filtro. Na primeira hora, a cada 15 minutos, as lâminas foram examinadas sob microscópio óptico (40 X) e, caso necessário, durante uma segunda hora a cada 30 minutos. Diferentemente do ensaio micronúcleo, foram avaliados os hemócitos dos tipos granulócito e semi-granulócito (Hose *et al.*, 1990; Martinez *et al.*, 1999; Matozzo & Marin, 2010), com anotação do tempo de retenção do vermelho neutro, estimando-se a proporção de células com extravasamento lisossomal para o citossol. Para auxílio na determinação do nível de estresse, foram conferidas, também, anormalidades no tamanho/cor dos lisossomos, já que a forma celular também pode ser modificada em função do impacto causado por contaminantes (Collier *et al.*, 2013). Os critérios detalhados para a determinação de granulócitos e semi-granulócitos saudáveis e sob estresse durante o ensaio do vermelho neutro podem ser observados em Lowe *et al.* (1995).

### **3.4 Estimativa da concentração de metalotioneínas (MT)**

Foi utilizado o método proposto por Viarengo *et al.* (1997), com uso do tecido branquial (segunda brânquia anterior e penúltima brânquia posterior), bem como de uma porção de hepatopâncreas, que foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até as análises laboratoriais. As amostras foram homogeneizadas em tampão (sacarose 0,5M + Tris-HCl 20 mM + PMSF 100 mM +  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01%), com pH a 8,6. O tecido homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm, com 100 $\mu$ L do sobrenadante tratado com etanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e 8 $\mu$ L de clorofórmio. Uma nova centrifugação foi realizada, a 8.000 rpm (10 min., a  $4^{\circ}\text{C}$ ), e ao sobrenadante foi adicionado HCl 37% e etanol puro. As amostras foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por uma hora. Posteriormente, uma nova centrifugação foi realizada, e cada tubo tratado com solução de etanol-clorofórmio, sendo novamente centrifugado. Os pellets foram ressuspensos com 30 $\mu$ L NaCl (250mM) e 30 $\mu$ L de solução de EDTA (4mM). As amostras (20 $\mu$ L) foram transferidas para poços de microplaca transparentes, aos quais foram adicionados 280 $\mu$ L de solução trabalho de DTNB (1200mM), com leitura realizada por espectrofotometria (412nm). A

concentração de metalotioneína foi estimada em função da concentração de glutathiona reduzida (GSH), expressa em uma reta padrão.

### 3.5 Lipoperoxidação (LPO)

Foram utilizadas frações de hepatopâncreas e brânquias (anterior e posterior) de 05 animais/subárea. Utilizou-se o protocolo adaptado de Hermes-Lima *et al.* (1995) e Jiang *et al.* (1991, 1992), nomeado Método FOX Modificado ou Ensaio de Laranja de Xilenol. As amostras foram pesadas e diluídas com metanol (1:9) e homogeneizadas em gelo. **Etapa 1:** os microtubos foram centrifugados a 5.000 rpm (5 min.) e o sobrenadante recuperado e utilizado na seguinte ordem: 90µL de FeSO<sub>4</sub> (1mM) + 35µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25mM) + 35µL de laranja de xilenol (1mM) + 175µL de água milliQ + 15µL de amostra. A solução então, foi incubada (1h) à temperatura ambiente com a placa de ELISA coberta para evitar o contato com a luz. Realizou-se a primeira leitura a 580nm. **Etapa 2:** Preparou-se uma solução de Cumene Hidroperóxido (CHP), conforme descrito a seguir: 45µL de solução estoque de CHP + 1mL de metanol 100%, obtendo-se uma solução de 250mM. Pipetou-se 10µL da solução anteriormente obtida + 2,5mL de água MilliQ, obtendo-se uma solução de 1mM. Da solução obtida no passo anterior, pipetou-se 1mL + 4,714mL de água MilliQ, obtendo-se assim uma solução de 0,175mM. Em continuidade, pipetou-se 10µL da solução de CHP (0,175mM) e adicionou-se à microplaca preparada na Etapa 1, aguardando-se 15 minutos, até a reação se estabilizar. Assim, foi realizada nova leitura de absorvância em espectrofotômetro a 580nm. A diferença da absorvância após a adição de CHP foi determinada e os valores da absorvância da amostra sem CHP foram divididas pelos valores de absorvância obtidos com a solução de CHP, a fim de expressar os hidroperóxidos em equivalentes de CHP por grama de peso seco de tecido.

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

Foram coletados 60 caranguejos de manguezal (*U. cordatus*) na Estação Ecológica Juréia-Itatins (EEJI). Após a coleta, cinco espécimes foram submetidos ao teste micronúcleo e do vermelho neutro para avaliação de sua condição primordial no ambiente. Os animais restantes (n=55) foram distribuídos em 11 aquários (05 espécimes/cada), contendo água com



salinidade específica, oriunda do local de sua captura, ocupando uma coluna de 5cm de altura. Nestes aquários foram colocados cinco canos de PVC (15cm de comprimento x 10cm de diâmetro), para uso pelos animais como galerias, minimizando o estresse e possíveis confrontos agonísticos. Assim, permaneceram aclimatados durante 5 a 7 dias, em temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro), com o oferecimento de alimentação diária (folhas verdes maduras de *R. mangle* do local de captura) e monitoramento diário da salinidade da água, com salinômetro digital Mettler (precisão 0,01). Foram realizados dois testes térmicos (agudo e crônico), conforme segue:

**a) Teste agudo (efeito imediato):** Foram utilizados 15 animais dispostos em três caixas (05 exemplares cada), dispostas em uma câmara climática (BOD) sob temperatura de  $30\pm 1^\circ\text{C}$ , salinidade  $15\pm 1$  e fotoperíodo 12:12h. Em intervalos de tempo de 12, 24 e 48h, após o início do experimento, foram retirados cinco animais para coleta de hemolinfa para a análise do biomarcador fisiológico vermelho neutro e recolhimento de tecidos (brânquias – anteriores e posteriores; hepatopâncreas; e musculatura), visando a dosagem da lipoperoxidação. O mesmo foi efetuado com cinco animais do grupo controle (condição de aclimação), que foram mantidos em aquários fora da câmara climática, sob uma temperatura de  $24\pm 1^\circ\text{C}$ , salinidade  $15\pm 1$  e fotoperíodo 12:12h;

**b) Teste crônico (efeito prolongado):** De modo similar, outros 15 animais foram dispostos na câmara climática, também sob estresse térmico ( $30\pm 1^\circ\text{C}$ ), com salinidade e fotoperíodo idênticos ao teste anterior. Foram realizados os mesmos procedimentos para a aplicação das técnicas de vermelho neutro e lipoperoxidação, porém, em intervalos de análise de 2, 5 e 7 dias. O grupo controle permaneceu fora da BOD, submetido a  $24\pm 1^\circ\text{C}$ , salinidade  $15\pm 1$  e fotoperíodo 12:12h, sendo usados para análise nos mesmos intervalos de dias.

### 3.7 Análises estatísticas

Cada uma das variáveis quantitativas foi previamente submetida a um teste de homogeneidade das variâncias (L, Levene) e de normalidade (W, Shapiro-Wilk). Na confirmação de normalidade ( $p > 0,05$ ) os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), com confronto das médias “a posteriori” pelo teste de Tukey (Sokal & Rohlf, 2003). A não confirmação de normalidade ( $p < 0,05$ ) indica a aplicação de um teste não paramétrico (KW, ANOVA por postos de Kruskal-Wallis), com o confronto das medianas

ocorrendo “a posteriori” por um teste de comparações múltiplas entre os tratamentos (Siegel & Castellan-Jr., 1988).

Os dados foram submetidos a uma ANOVA fatorial de três vias (A, área amostral; S, sazonalidade; e T, tecido), para avaliação da significância dos efeitos nas diferentes fontes de variação, bem como em suas interações de primeira e segunda ordem. Também foi empregada uma análise multifatorial (PCA), compreendendo o uso de uma matriz com as médias de todos os biomarcadores utilizados, para reconhecimento de possíveis padrões. Como as variáveis apresentam unidades distintas, com diferente amplitude de variação, tiveram seus dados submetidos à função *decostand* do pacote *Vegan* (Oksanen *et al.*, 2016), em ambiente *R*, que padroniza os dados entre “0” e “1” pelos valores mínimo e máximo de cada variável da matriz, respectivamente (Legendre & Gallagher, 2001; Anderson *et al.* 2006).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abessa, D.M.S. 2002. **Avaliação da qualidade de Sedimento do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil.** 2002. 340p. Tese de doutorado - Universidade de São Paulo – Instituto Oceanográfico São Paulo, São Paulo (SP).
- Adams, S.M.; Shepard, K.L.; Greeley Jr., M.S.; Jimenez, B.D.; Ryan, M.G.; Shugart, L.R.; Mccarthy, J. F.; Hinton, D. E. 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research*, 28: 459-464.
- Ahearn, G.A.; Mandal, P.K.; Mandal, A. 2014. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 174: 439-452.
- Amiard-Triquet, C. & Amiard, J.C. 2013. **Behavioral Ecotoxicology.** In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C. & Rainbow, P.S. (ed.) *Ecological Biomarkers.* CRC Press/Taylor & Francis Group, 450p.
- Amiard-Triquet, C.; Rainbow, P.S.; Roméo, M. 2011. (eds.). **Tolerance to Environmental Contaminants.** Boca Raton, FL: CRC Press.
- Anderson, M.J.; Ellingsen, K.E.; McArdle, B.H. 2006. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology Letters*, 9: 683-693.
- Andrade, V.M.; Silva, J.; Silva, F.R.; Heuser, V.D.; Dias, J. F.; Yoneama, M.L.; Freitas, T.R.O. 2004. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two Southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(5): 459-468.
- Azevedo, F.A. & Chasin, A.A.M. 2003. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia.** São Carlos: Rima. 322 p..

- Azevedo, S.J. & Braga, E.S. 2011. Caracterização hidroquímica para qualificação ambiental dos estuários de São Vicente e Cananéia. *Arquivo de Ciências do Mar*, Fortaleza, 44(2): 52-61.
- Baptista, B.W.M. & Vieira, L.G.S. 2014. A cultura como ferramenta de manutenção das raízes caiçaras da Juréia. *Revista Observatório da Diversidade Cultural*, 1(1): 78-89.
- Baptista, D.F.; Buss, D.F.; Egler, D.F. 2003. **Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos contaminados por agrotóxicos**. In: Peres, F. & Moreira, J.C. (orgs.) *É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente*. Editora FIOCRUZ, 384p.
- Barbier, E.B. 2000. Valuing the environment as input: review of applications to mangrove-fishery linkages. *Ecological Economics*, 35: 47-61.
- Barbier, E.B.; Hacker, S.D.; Kennedy, C.; Koch, E.W.; Stier, A.C.; Silliman, B.R. 2011. The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monographs*, 81:169-193.
- Barbour, M.T.; Gerritsen, J.; Snyder, B.D.; Stribling, J.B. 1999. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, Benthic macroinvertebrates and fish. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Bastami, A.A.; Kazemzadeh, K.J., Esmailian, M. 2012. Bioaccumulation of heavy metals in sediment and crab, *Portunus pelagicus* from Persian Gulf, Iran. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 12(6): 886-892.
- Bayne, B.L.; Clarke, K.R.; Gray, J.S. 1988. Special-Biological effects of pollutants: Results of a practical workshop. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 1- 278.
- Bijlsma, R. & Loeschcke, V. 2012. Genetic erosion impedes adaptative responses to stressful environments. *Evolutionary Applications*, 5(2): 117-129.
- Brasil, 2004. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da União - Seção 1. Brasília.
- Brasil, 2012. Código Florestal, Lei 12.651/2012. [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2011-2014/2012/lei/L12651.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/L12651.htm) (Acesso em 09/10/2016)
- Bryan, G.W.; Waldichuk, M.; Pentreath, R.J.; Darracott, A. 1979. Bioaccumulation of marine pollutants [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 286: 483-505.
- Buss, D.F.; Baptista, D.F.; Nessimian, J.L. 2003. Bases conceituais para aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Caderno Saúde Pública*, 19: 473-495.
- Caricato, R.; Lionetto, M.G.; Schettino, T. 2010. Seasonal variation of biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* sampled inside and outside Mar Piccolo of Taranto (Italy). *Chemistry and Ecology*, 26(1): 143-153.
- Cesar, A.; Silva, S.L.R.; Santos, A.R. 1997. **Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição** – Universidade Santa Cecília – UNISANTA - Santos. São Paulo, Brasil. 37p.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 2007. **Relação de áreas contaminadas – Novembro de 2007 – Relação por municípios**. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/texto\\_areas\\_cont\\_nov\\_08.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_08.pdf)>. Acesso em 10 mar. 2016.

Collier, T.K.; Chiang, M.W.L.; Au, D.W.T.; Rainbow, P. S. 2013. **Biomarkers currently used in environmental monitoring**. In: Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.C. & Rainbow, P.S. (ed.). *Ecological Biomarkers*. CRC Press / Taylor & Francis Group, 450p.

Collaço, F.L.; Sartor, S.M.; Barbieri, E. 2015a. Cultivo de bijupirá (*Rachycentron canadum*) em Cananeia, SP, Brasil. Avaliação da viabilidade utilizando geoprocessamento. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 15(2): 277-289.

Collaço, F.L.; Sartor, S.M.; Barbieri, E. 2015b. Uso do geoprocessamento para definição de áreas de cultivo de ostras na região estuarina de Cananéia, São Paulo, Brasil. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 15(2): 193-207.

Countryman, P.I. & Heddle, J.A. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human Lymphocytes. *Mutation Research*, 41: 321-332.

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.

Cutroneo, L.; Castellano, M.; Carbone, C.; Consani, S.; Gaino, F.; Tucci, S.; Magri, S.; Povero, P.; Bertolotto, R.M.; Canepa, G.; Capello, M. 2015. Evaluation of the boundary condition influence on PAH concentrations in the water column during the sediment dredging of a port. *Marine Pollution Bulletin*, 101: 583-593.

Daguano, J.K.M.F.; Santos, C.; Rogero, S.O. 2007. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 12: 134-139.

Dias-Neto, J. 2011. **Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável do caranguejo-uçá, do guaiamum e do siri-azul**. Brasília. IBAMA. 156p.

Dissanayake, A.; Galloway, T.S.; Jones, M.B. 2011. Seasonal differences in the physiology of *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda) from estuaries with varying levels of anthropogenic contamination. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 93(4): 320-327.

Dorigan, J.V. & Harrison, F.L. 1987. **Physiological Responses of Marine Organisms to Environmental Stressors**., US Department of Energy, Washington, DC 20545.

Eichler, P.P.B.; Eichler, B.B.; David, C.J.; Miranda, L.B.; Sousa, E.C.P.M. 2006. The estuary ecosystem of Bertioga, São Paulo, Brazil. *Journal of Coastal Research*, 39: 1110-1113.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007. The world's mangrove 1980-2005. *FAO Forestry Paper*, nº 153.

Feldman, R.S. & Connor, E.F. 1992. The relationship between pH and community structure of invertebrates in streams of the Shenandoah National Park, Virginia, USA. *Freshwater Biology*, 27: 261-276.

- Fernandes, F.A. **Estresse osmótico: proteínas de estresse e balanço oxidativo em *Neohelice granulata* (Crustacea, Decapoda, Veronidae)**. 2010. Tese de doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Goulart, M.D. & Callisto, M. 2003. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM*, 2(2): 153-164.
- Hagger, J.A.; Lowe, D.; Dissanayake, A.; Jones, M.B.; Galloway, T.S. The influence of seasonality on biomarker responses in *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology*, 19(5): 953-962, 2010.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1985. **Free Radicals in Biology & Medicine**, Clarendon Press, Oxford.
- 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 Biology & Medicine*, 19: 271-280.
- Hose, J.E.; Martin, G.G.; Gerard, A.S. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *The Biological Bulletin* 178: 33-45.
- Hoshina, M.M.; Sarkis, J.E.S.; Bonetti, J.; Bonetti, C. 2008. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutation Research*, 656: 44-48.
- Hosseini, M.; Nabavi, S.M.B.; Bastami, A.A., Parsa, Y. 2012. Mercury concentration in tissues of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) and sediments from Persian Gulf coasts, Iran. *World Applied Sciences Journal*, 18(3): 322-327.
- IBAMA 2003 - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Portaria nº 52, de 30 de setembro de 2003.
- Ivo, C.T.C. & Gesteira, T.C.V. 1999. Synopsis of the observations on the bioecology and fishery of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), caught in estuaries in Brazil. *Boletim Técnico Científico do Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste*, 1(7): 9-52.
- 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. *Analytical biochemistry*, 202:384-389.
- Jiang, Z.Y.; Woolard, A.C.S.; Wolff, S.P. 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and iodometric method. *Lipids*, 26:853-856.
- Kirschbaum, A.A.; Seriani, R.; Pereira, C.D.S.; Assunção, A.; Abessa, D.M.S.; Rotundo, M.M.; Ranzani-Paiva, M.J.T. 2009. Cytogenetic biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 32(1): 151-154.
- Kong, X.; Wang, G.; LI, S. 2008. Seasonal variations of ATPase activity and antioxidant defenses in gills of the mud crab *Scylla serrata* (Crustacea, Decapoda). *Marine Biology*, 154: 269-276.

- Koukouzika, N. & Dimitriadis, V.K. 2005. Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece Coast: "Lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress". *Ecotoxicology*, 14(4): 449-463.
- Lacerda, L.D.; Campos, R.C.; Santelli, R.E. 2013. Metals in water, sediments, and biota of an offshore oil exploration area in the Potiguar Basin, Northeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1-21.
- Legendre, P. & Gallagher, E.D. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129: 271-280.
- Lima, E.S. & Abdalla, D.S.P. 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37: 293-303.
- Livingstone, D.R. 1998. Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* L to environmental and experimental exposure to pollutants. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 37-43.
- Livingstone, D.R.; Garcia, M.P.; Michel, X.; Narbonne, J.F.; O'Hara, S.; Ribeira, D.; Winston, G.W. 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other mollusks. *Functional Ecology*, 4: 415-424.
- Livingstone, D.R.; Stickle, W.B.; Kapper, M.; Wang, S. 1986. Microsomal detoxication enzyme responses of the marine snail, *Thais haemastoma* to laboratory oil exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36: 843-850.
- 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. *Marine Ecology Progress Series*, 129: 189-196.
- Mahiques, M.M.; Burone, L.; Figueira, R.C.L.; Lavenère-Wanderley, A.A.O; Capellari, B.; Rogacheski, C.E.; Barroso, C.P.; Santos, L.A.S.; Cordero, L.M.; Cussioli, M.C. 2009. Anthropogenic influences in a lagoonal environment: a multiproxy approach at the Valo Grande Mouth, Cananéia-Iguape System (SE, Brazil). *Brazilian Journal of Oceanography* 57(4): 325-337.
- Mahiques, M.M.; Figueira, R.C.L.; Salaroli, A.B.; Alves, D.P.V.; Gonçalves, C. 2013. 150 years of anthropogenic metal input in a biosphere reserve: The case study of the Cananéia-Iguape coastal system, southeastern Brazil. *Environmental Earth Sciences*, 4(68): 1073-1087.
- Martinez, C.B.R.; Alvares, E.P.; Harris, R.R.; Santos, M.C. 1999. F. A morphological study on posterior gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. *Tissue & Cell*, 31(3): 380-389.
- Matozzo, V. & Marin, M.G. 2010. First cytochemical study of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). *European Journal of Histochemistry*, 54: 44-49.
- 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. Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, 50: 231-243.
- Martins, C.C.; Bicego, M.C.; Mahiques, M.M.; Figueira, R.C.L.; Tessler, M.G.; Montone, R. C. 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a large South American industrial

coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil): Sources and depositional history. *Marine Pollution Bulletin*, 63: 452-458.

Martins, P.T.A. & Wanderley, L.L. 2009. Dinâmica de ocupação espacial de áreas contíguas (período 1987-2008) e sua relação com tensores de origem antrópica no manguezal do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia. *Sociedade & Natureza*, Uberlândia, 21(2): 77-89.

Melo, G.A.S. 1996. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo, Editora Plêiade.

Mello, K; Toppa, R.H.; Abessa, D.M.S.; Castro, M. 2013. Dinâmica de expansão urbana na zona costeira brasileira: o caso do município de São Vicente, São Paulo, Brasil. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 13(4): 539-551.

Moore, M.N.; Depledge, M.H.; Readman, J.W.; Leonard, D.R.P. 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*, 552 (1-2): 247-268.

Moore, M.N.; Lowe, D.M.; Livingstone, D.R.; Dixon, D.R. 1986. Molecular and cellular indices of pollutant effects and their use in environmental impact assessment. *Water Science & Technology*, 18: 223-228.

Ng, P.K.L.; Guinot, D.; Davie, P.J.F. 2008. Systema Brachyurorum: Part I. Na annotated checklist of extant Brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 17: 1-286.

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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 379: 104-112.

Nudi, A.H.; Wagener, A.L.R.; Francioni, E.; Sette, C.B.; Sartori, A.V.; Scofield, A.L. 2010. Biomarkers of PAH exposure in crabs *Ucides cordatus*: laboratory assay and field study. *Environmental Research*, 110: 137-145.

Odum, W.E. & Mciver, C.C. 1990. Mangroves. **Ecosystems of Florida**, 517-548.

Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlenn, D.; Minchin, P.R.; O'hara, R.B.; Stimpson, G.L.; Solymos, P.; Henry, M.; Stevens, H.; Szoecs, E.; Wagner, H. 2016. Vegan: Community Ecology Package – Version 2.4-1. <[cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf](http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf)> (Acessado em 07/10/2016).

Orbea, A.; Ortiz-Zarragoitia, M.; Solé, M.; Porte, C.; Cajaraville, M.P. 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBS in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology*, 58: 75-98.

Patrick, L. 2003. Toxic metals and antioxidants. Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Alternative Medicine Review*, 8(2): 106-128.

Pinheiro, M.A.A. 2012a. **Projeto Uçá III - Impacto genotóxico em populações do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae): Avaliação e correlação com a concentração de metais pesados em seis manguezais do Estado de São Paulo**. Relatório científico final (FAPESP, Proc. nº 2009/14725-1), UNESP/CLP, 153p.

- Pinheiro, M.A.A.; Costa, T.M.; Gadig, O.B.F.; Buchman, F.S.C. 2008. **Os ecossistemas costeiros e sua biodiversidade na Baixada Santista**. In: Oliveira, A.J.F.C.; Pinheiro, M.A.A.; Fontes, R.F.C. (Eds.) *Panorama Ambiental da Baixada Santista*, Universidade Estadual Paulista – Campus Experimental do Litoral Paulista, São Vicente (SP), pp 7-26.
- Pinheiro, M.A.A.; Duarte, L.F.A.; Toledo, T.R.; Adams, M.A.; Torres, R. 2013. A. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea, Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(10): 8273-8285.
- Pinheiro, M.A.A.; Fiscarelli, A.G.; Hattori, G.Y. 2005. Growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura: Ocypodidae) at Iguape, SP, Brazil. *Journal of Crustacean Biology*, 25(2): 293-301.
- Pinheiro, M.A.A. & Fiscarelli, A.G. 2001. **Manual de apoio a fiscalização do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*)**. Itajaí: UNESP, CEPESUL/IBAMA, 43p.
- Pinheiro, M.A.A.; Santos, L.C.M.; Souza, C.A.; João, M.C.A.; Netos, J.D.; Ivo, C.T.C. 2016. **Avaliação do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Ucididae)**. In: Pinheiro, M.A.A. & Boos, H. (orgs) *Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014*. Sociedade Brasileira de Carcinologia, Porto Alegre, 466 p.
- Pinheiro, M.A.A.; Silva, P.P.G.; Duarte, L.F.A.; Almeida, A.A.; Zanotto, F.P. 2012b. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81: 114-121.
- Pusceddu, F.H.; Alegre, G.F.; Pereira C.D.S.; Cesar, A. 2007. Avaliação da toxicidade dos sedimentos do complexo estuarino de Santos empregando ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. *Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology*, 3(2): 237-242.
- Rand, G.M. & Petrocelli, J.R. 1985. **Fundamentals of aquatic toxicity**. McGraw Hill Internation Book Company, 666p.
- Romero, F.J.; Bosch-Morell, F.; Romero, M.J.; Romero, B.; Marin, N.; Roma, J. 1998. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environmental Health Perspectives*, 106: 1229-1234.
- Rose, W.L. & Anderson, S.L. 2005. Genetic Ecotoxicology, 126-132. In: **Encyclopedia of Toxicology**. 2<sup>nd</sup> ed., Elsevier Ltd., Oxford: UK.
- Sant'anna Neto, J.L. 2005. Decálogo da climatologia do Sudeste brasileiro. *Revista Brasileira de Climatologia*, 1(1): 43-60.
- Scarpato, R.; Migliore, L.; Alfinito-Cognetti, G.; Barale, R. 1990. Induction of micronucleus in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Marine Pollution Bulletin*, 21(2): 74-80.
- Schaeffer-Novelli, Y. 1995. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. *Caribbean Ecological Research*, São Paulo, 64 p.
- 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. *Brazilian Journal of Oceanography*, 64(sp2): 83-98.
- Schaeffer-Novelli, Y. & Cintrón-Molero, G. 1999. Brazilian mangroves: a historical ecology. *Ciência e Cultura*, 51(3): 271-286.
- Schories, D.; Barletta-Bergan, A.; Barletta, M.; Krumme, U.; Mehlig, U.; Rademarker, V. 2003. The keystone role of leaf removing crabs in mangrove forests of north Brazil. *Wetlands Ecology and Management*, 11: 243-255.
- Seriani, R.; Abessa, D.M.S.; Pereira, C.D.S.; Kirschbaum, A.A.; Assunção, A.; Ranzani-Paiva, M.J.T. 2013. Influence of seasonality and pollution on the hematological parameters of the estuarine fish *Centropomus parallelus*. *Brazilian Journal of Oceanography*, 61(2): 105-111.
- Shih, H-T.; Ng, P.H.L.; Davie, P.J.F.; Schubart, C.D.; Türkay, M.; Naderloo, R.; Jones, D.; Liu, M-Y. 2016. Systematics of the family Ocypodidae Rafinesque, 1815 (Crustacea:Brachyura), based on phylogenetic relationships, with a reorganization of subfamily rankings and a review of the taxonomic status of *Uca* Lecha, 1814, sensu lato and its subgenera. *Raffles Bulletin of Zoology*, 64: 139-175.
- Siegel, S. & Castellan Jr., N.J. 1988. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. New York (NY): McGraw-Hill, 2<sup>nd</sup>Ed., 400p.
- Silva, C.A.R.; Lacerda, L.D.; Rezende, C.E. 1990. Metals Reservoir in a Red Mangrove. *Biotropica*, 22(4): 339-345.
- Silva, C.S.L.M. 2012. Utilização de ensaios ecotoxicológicos na avaliação de risco ambiental promovido por pesticidas: caso-estudo Brejo do Cagarrão. 128 p. Dissertação de mestrado – Escola Superior Agrária de Beja, Portugal.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 2003. **Biometry: The principles and practice of statistics in biological research**. New York: W.H. Freeman, 3<sup>rd</sup> Ed., 887p.
- Souza, M.R. & Barreia, W. 2001. The popular knowledge about fish at a “caiçara” community of Juréia-Itatins Ecological Station-SP. *Boletim do Instituto de Pesca* 27(2): 123-130.
- Spalding, M.; Kainuma, M.; Collins, L. 2010. **Mangrove and People**. In: Spalding, M.; Kainuma, M.; Collins, L. (eds) Word Atlas of Mangroves. Earthscan, Washington (DC), pp 23-43.
- Štević, Z. 2005. The reclassification of brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Natura Croatica*, 14(1): 1-159.
- Stopper, H. & Muller, S.O. 1997. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. *Toxicology in vitro*, 11: 661-667.
- Suzuki, J.S.; Kodama, N.; Molotkov, A.; Aoki, E.; Tohyama, C. 1998. Isolation and identification of metallothionein isoforms (MT-1 and MT-2) in the rat testis. *Biochemistry Journal*, 334: 695-701.

Twilley, R.R.; Pozo, M.; Garcia, V.H.; Rivera-Monroy, V.H.; Zambrano, R.; Boderó, A. 1997. Litter Dynamics in Riverine Mangrove Forests in the Guayas River Estuary, Ecuador. *Oecologia*, 111(1): 109-122.

Viarengo, A.; Burlando, B.; Dondero, F.; Marro, A.; Fabbri, R. 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, 4: 455-466.

Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F.; Fabbri, R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research*, 44: 69-84.

# Capítulo 1

---

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

Submitted as original scientific article to  
*Environmental Science and Pollution Research (ESPR)* at July 2016

## Abstract

The biological monitoring of animals exposed to environmental contaminants *in situ*, when using genetic and physiological biomarkers, is an effective tool for assessing the contamination of estuarine systems. The simultaneous action of various pollutants causes systemic changes to the biota, and such changes have worrying impacts in higher biological levels (e.g., populations and communities). The objective of this study was to evaluate two damage biomarkers in *Ucides cordatus* using the micronucleus test (MN ‰) and neutral red retention time (NRRT). Male specimens during intermolt were collected in six mangrove areas in the state of São Paulo, with different perspectives of contamination, in order to investigate possible differences between the sampling areas in two times of year: summer (rainy) and winter (dry season). The highest MN ‰ averages were recorded in the mangroves in the cities of Cubatão and São Vicente, as well as the shorter NRRT (in minutes), indicating its high interaction with degenerative processes caused by the contact with xenobiotics. The opposite occurred in the mangroves in the cities of Cananéia and Juréia, considered pristine by the two biomarkers. The values of NRRT showed seasonal changes, indicating a greater cytotoxic sensitivity compared to the genotoxic.

**Keywords:** conservation, key species, mangrove, micronucleus, neutral red, pollution

## Introduction

The mangrove is an important transition ecosystem between land and marine environments, characterized by its high productivity, and also providing shelter, feeding and breeding area for several animal species (Schaeffer-Novelli 1995; Pinheiro et al. 2008; Schaeffer-Novelli et al. 2016). In addition, among other ecosystem properties offered by this ecotone, there is the protection of the coastline against erosion, which prevents the siltation of the estuarine beds and acts as a geochemical barrier for some pollutants exportation (e.g., heavy metals) which are retained in their fine sediments, with high organic matter content and CTC (Pinheiro et al. 2012; Lacerda et al. 2013; Faridah-Hanum et al. 2014; Udechukwu et al. 2014). Nevertheless, some abiotic parameters changes (e.g., pH and salinity) can cause the mobility of these pollutants to the waters and its availability to plants (Silva et al. 1990; Defew et al. 2005; Anouti 2014) and animals (Bastami et al. 2012; Hosseini et al. 2012; Pinheiro et al. 2012). However, mangroves have suffered severe impacts around the world, and it is estimated that about 50% of its total area has already been damaged, either by the complete depletion of their arboreal vegetation, or conversion into human activities (e.g., industries, ports, urban areas and other infrastructure constructions – Spalding et al. 2010). These changes, generally, impact the local biota, resulting in a cascade of events that begin with cellular, chemical and biological effects which may endanger entire populations and/or seriously threaten the exploration of local fish resources (Seriani et al. 2013).

Brazil is a country marked by significant regional differences regarding human impacts, in which one can find severely compromised areas and at the same time regions that stand out for being pristine, maintaining its environmental quality (Pinheiro et al. 2008). For instance, the different estuarine systems of the State of São Paulo can go from the most pristine to the most degraded and with the highest population density in the country, especially the Central Coast, which includes nine municipalities that make up the Metropolitan Region of Baixada Santista – RMBS (Bertioga, Guarujá, Cubatão, Santos, São Vicente, Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém and Peruíbe). According to reports issued by the São Paulo State Environmental Protection Agency - CETESB (2001, 2007), both the water and sediment from the Santos – São Vicente estuary present, historically, significant contamination by harmful substances to organisms, such as heavy metals and polyaromatic hydrocarbons (PAHs). In contrast, the South Coast of São Paulo has municipalities characterized by their great environmental conservation (e.g., Cananéia, Iguape and Peruíbe), low population density and fishing activity (Semensatto-Jr et al. 2007; Collaço et al. 2015a,

Mendonça 2015). The south coast of the state has also several conservation units such as the Environmental Protection Area Cananéia-Iguape-Peruíbe (EPA-CIP) and the Juréia-Itatins Mosaic Conservation Units (known as 'Juréia'), the latter which houses a small traditional extractive community (Souza and Barrela 2001; Vieira and Baptista 2014).

The uçá-crab (*Ucides cordatus*) is a key species, endemic from the Western Atlantic mangroves (from Florida - USA to Santa Catarina - Brazil), which represents a fishing resource widely used throughout the Brazilian coast (Diele et al. 2005; Pinheiro et al. 2005). Like other macroinvertebrates, the uçá-crab stands out as an important bio-indicator species because of its low mobility and growth rate (Pinheiro et al. 2005, 2012), which favors the accumulation of metals and other xenobiotics (Chapman et al. 1998; Nudi et al. 2007, 2010), validating the analysis of local contamination levels (Pinheiro et al. 2012).

According to Adams et al. (1989), contaminants effects can be seen at various levels of biological organization, being them at the most basal (e.g., biochemical, genetic, and physiological) which have an advanced response to the most broad (e.g., in populations or communities). Thereby, contaminants in the environment can be quantified in animals by analyzing the effect of biomarkers on the pollutants (Moore et al. 1986; Bayne et al. 1988). These stressor indexes, consisting of simple and fast genotoxic response (MN %, micronucleus) and cytotoxic (NRRT, neutral red) testing can validate the history of environmental and biota contamination in São Paulo estuarine systems (Abessa et al. 2008; Cesar et al. 2006; Mahiques et al. 2013; Pinheiro et al. 2012, 2013). Therefore, these sublethal damage biomarkers are extremely suitable for environmental impact and conservation status assessments (Scarpato et al. 1990; Lowe et al. 1995; Kirschbaum et al. 2009; Pinheiro et al. 2013.)

The conservation status of central and south coast mangroves in the State of São Paulo (Brazil) were analyzed from *U. cordatus* crab blood tests, for assessing a cytotoxic (NRRT, neutral red retention time) and a genetic (MN %, micronucleous assay) biomarker. In addition, the possible seasonal effects (summer vs. winter) were analyzed on these two biomarkers to characterize their response plasticity, in order to improve protocols for future monitoring.

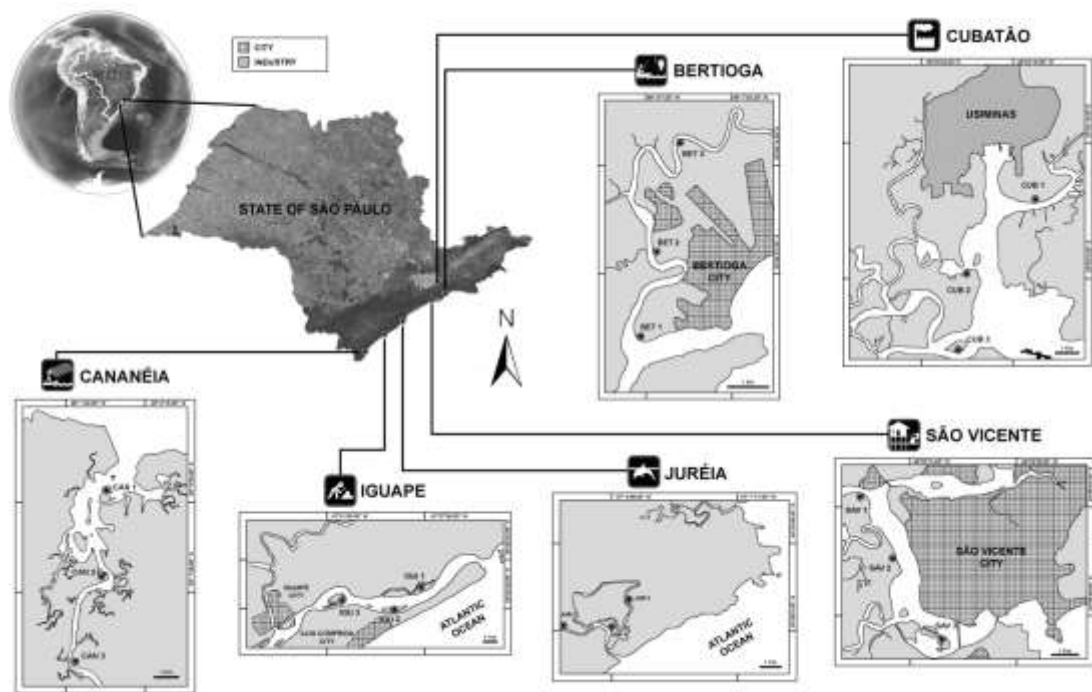
## Material and methods

### Mangrove areas and the capture of ucá-crab specimens

Six mangrove areas in the state of São Paulo were selected: at the Central Coast (Cubatão, São Vicente and Bertioga) and South Coast (Cananéia, Iguape and Juréia), being the first three characterized by the largest human impacts and environmental contamination, which lowers the impact in the other three, until a control area (Juréia) is reached, absent of these effects. Generally speaking, each mangrove area has its own history of environmental impact and contamination, showing presumably different levels (Figure 1), namely: Cananéia (**CAN**), located in the Cananéia-Iguape-Peruíbe estuary (CIP-E), has an intense artisanal/commercial fishing activity (Mendonça 2015, Collaço et al. 2015a, b); Iguape (**IGU**), in the same estuarine complex, with an old mining influence on the Ribeira de Iguape River banks, besides large banana plantations managed with pesticides, which are carried to this estuarine region (Mahiques et al. 2009, 2013); Juréia (**JUR**), a Juréia-Itatins Ecological Station (EEJI), which was considered as the control area due to the absence of polluting human activities and the restricted traditional community of fishermen living there (Souza and Barrela 2001, Pinheiro et al. 2013, Baptista and Vieira 2014); Cubatão (**CUB**), located in the Santos-São Vicente estuary (SSV-E), with an old history of contamination by various pollutants, coming from its imposing industrial complex (Martins et al. 2011, Pinheiro et al. 2012, 2013); São Vicente (**SAV**), close to Cubatão, also in the SSV-E, which holds significant anthropogenic impact caused mainly by irregular occupation of the estuarine margins (houses on stilts), poor sanitation and improper disposal of solid waste (Kirschbaum et al. 2009, Mello et al. 2013); and Bertioga (**BET**), a region with significant areas of mangroves, where one can find marinas focused on sport fishing and environmental tourism (Eichler et al. 2006).

Specimens of *Ucides cordatus* were collected in three sub-areas (replicas) of mangrove for each aforementioned area. Ten intact adult animals (with all their locomotor appendages) were collected by captured by hand (see Pinheiro and Fiscarelli 2001), in intermolt stage (Pinheiro and Fiscarelli 2001) and carapace width  $\geq 60$  mm (according to current law - IBAMA 2003). Two expeditions were carried out in 2015, one in the summer (January to March) and one in the winter (July to August), summing up 180 specimens/season and 360 specimens/total. Soon after the capture, the animals were taken back to the laboratory, where the excess mud was removed, and were submitted to biometric analysis, with size measurement (CW, carapace width) precision caliper (0.05mm) and wet weight (WW) using a precision scale (0.01g).

For increased reliability of the obtained data, the three mangrove sub-areas (replicas) were arranged in order of a salinity gradient, one innermost and the others in the middle and near the estuarine mouth. This procedure was adopted because of the changes the salinity and pH cause on mobility and availability of some pollutants, as well as their role as natural stressors on organisms (Jaramillo-Diaz et al. 2013; Gamain et al. 2016; Moreira et al. 2016; Piazza et al. 2016).



**Figure 1** – Location of the six mangrove areas sampled in the state of São Paulo (Brazil), represented by 18 subareas located in the central and south coasts (Source: Satellite images from Google Earth® redesigned by Gustavo Pinheiro).

### Micronucleus assay (MN)

A hemolymph sample (0.5 mL) was taken from each crab, using a hypodermic syringe (1 mL) set up with a 21-gauge needle (to avoid damage to the hemocytes – Nudi et al. 2010). Each microscope slide (n=2) got a drop of hemolymph, with a subsequent swab, according to the method already performed for this species by Pinheiro et al. (2013). The slides were air dried (20 min), subject to Carnoy solution (3:1 methanol/acetic acid) for cell fixation, and then dried again. Each slide was stained with Giemsa solution 2% ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH

6.8) for 15 min, and washed with deionized water. When dry, each blade received a cover slip of Entellan<sup>®</sup> (Merck<sup>®</sup>). In order to identify the number of micronucleated cells per 1,000 analyses (MN ‰), the slides were observed under a Zeiss<sup>®</sup> optical microscope (1,000x) with notes of the nuclear formations complying with the characteristics proposed by Countryman and Heddle (1976).

### **Neutral red retention time (NRRT)**

From each collected animal, 0.5 ml of hemolymph was extracted with a 1mL hypodermic syringe set up with a 21-gauge needle, previously prepared with 0.5 mL of a 3:2, anticoagulant /saline solution (respectively: 2.05g C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> + 0.8g Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> + 0.42g NaCl in 100 mL distilled water / 4.77g HEPES + 25.58g Na Cl + 4.36g MgSO<sub>4</sub> + 0.75g KCl + 1.92g CaCl<sub>2</sub> in 1L of distilled water, pH 7.36). The content of each of these syringes was transferred to 2ml microtubes and kept in 15-20 minutes rest. Subsequently, a 40µL aliquot of this preparation was trickled on the surface of the slides, which were previously treated with nitric acid (5%), washed with distilled water, dried and finally treated with Poly-L-lysine (1:10 distilled water). The slides were kept in a dark and humid chamber for 15 minutes for a better adhesion of the cells. In the 24 hours before the procedure, a neutral red stock solution was prepared (22.8 mg dye in 1 mL of DMSO), which was later used in the preparation of the working solution (10µL stock solution + 5 ml saline solution), which was trickled (40µL) on the hemocytes, and kept in the humid/dark chamber (15 min). The slides were analyzed under an optical microscope (400x) and in the first hour, they were re-examined every 15 minutes and, if necessary, during a second hour every 30 minutes as well. The neutral red retention time was noted for each individual, estimating the proportion of cells with lysosomal leakage into the cytosol, and other abnormalities regarding the size and color of the lysosomes that indicate cellular stress, as stated by Lowe et al. (1995).

### **Statistical analyses**

Each variable was subjected to a test of normality (W, Shapiro-Wilk test) and, after detected the non-normality of the data ( $p < 0.05$ ), subjected to a non-parametric test (U, Mann-Whitney test). Medians of each biomarker were compared between the six mangrove areas, the two weather seasons (summer vs. winter) and the two coastal regions of the state (Central



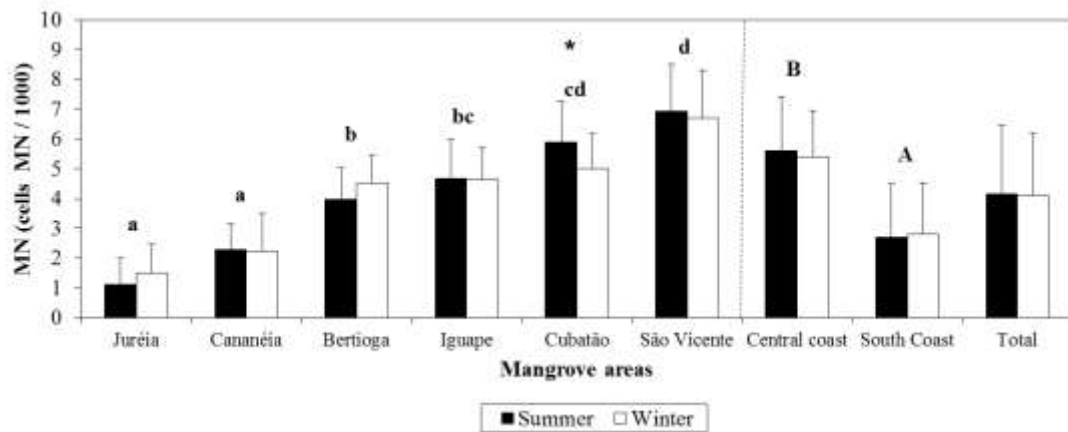
Coast vs. South Coast), comparing the medians afterwards by a Kruskal-Wallis test (KW), with a confidence interval set at 5%. All analyses were conducted using 'R', Version 2.5.0 (Ihaka and Gentleman 1996).

The association between the variables NRRT and MN‰ was assessed using Spearman's correlation coefficient, confirmed according to the 5% significance level. Afterwards, the empirical points of the relation NRRT vs. MN‰ were adjusted by the power function ( $Y=aX^b$ ), by analyzing the coefficient of determination ( $R^2$ ), for each time of year ( $n=18$ /each) and also for the data total ( $n=36$ ). To compare the seasonal equations of these relations, variables were initially ln-transformed, to its linearization ( $\ln NRRT = \ln a + b \ln MN‰$ ), with subsequent comparison among them by a parallel/coincident lines test (t test). Thus, the constants  $a$  (source index) and  $b$  (regression or declivity coefficient) were compared from the two seasonal equations.

## Results

### Micronucleous assay

The genotoxicity data were submitted to the normality test ( $W=0.971$ ,  $P < 0.0001$ ), confirming a non-normal distribution and a nonparametric test application for seasonal confrontation in each mangrove area. The average frequencies of micronucleated cells per 1,000 (MN‰) for each mangrove area are presented in Table 1. This biomarker showed an average about five times higher in São Vicente ( $6.8 \pm 1.6$  MN‰) when compared with Juréia ( $1.3 \pm 0.9$  MN‰). During the summer, genotoxicity (MN‰) between the mangrove areas showed the following descending order SAV > CUB > (IGU = BET) > CAN > JUR also maintained during the winter, with no significant difference between the analyzed periods ( $U=16232.5$ ;  $P=0.974$ ). Only in one mangrove area (Cubatão) it occurred a seasonal difference ( $P=0.015$ ), with a higher average in the summer ( $5.9 \pm 1.4$  MN‰) than in the winter ( $5 \pm 1.2$  MN‰) (Figure 2). The average genotoxicity on the Central Coast (CUB, SAV and BET) was  $5.5 \pm 1.7$  MN‰, about twice that on the South Coast (CAN, IGU and JUR), which was  $2.7 \pm 1.7$  MN‰ ( $U=4356.5$ ,  $P < 0.0001$ ).

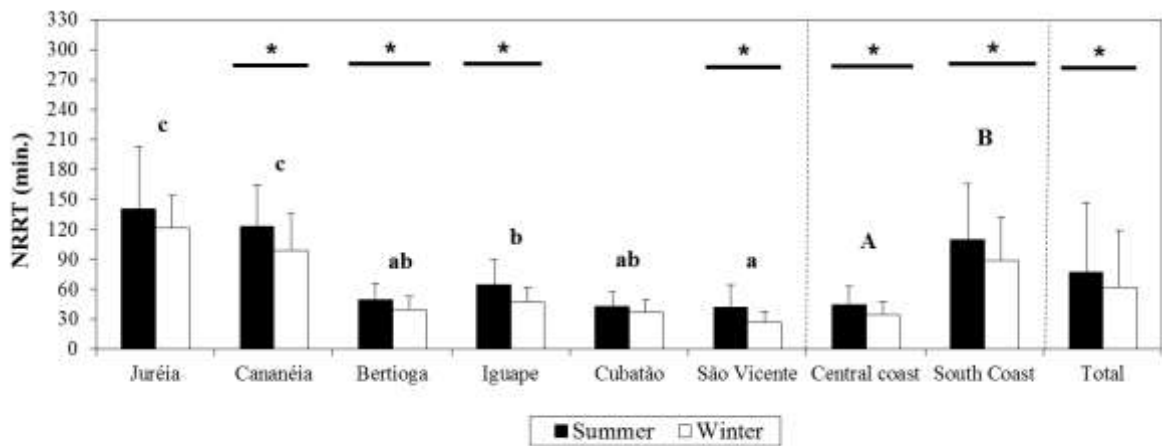


**Figure 2** – Micronucleus test values (MN%) for *Ucides cordatus* specimens captured in seasonal samples (summer and winter), obtained in six mangroves of the state of São Paulo, comprising three areas of the Central Coast (Cubatão, São Vicente and Bertioga) and three of the South Coast (Cananéia, Iguape and Juréia). Where: Bars = average; vertical lines = standard deviation; horizontal lines with an asterisk = seasonal statistical difference between medians; different lower case letters associated with the bars indicate statistical difference between the mangrove areas; different capital letters associated with the bars indicate statistical difference between the state of São Paulo coastal areas ( $P < 0.05$ ).

### Neutral red assay

The cytotoxicity data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test, being detected a non-normal distribution ( $W=0.839$ ,  $P < 0.0001$ ), with the application of a non-parametric test for seasonal comparison in each mangrove area. The record of neutral red retention time showed antagonistic values to MN%, inverting the positions of Juréia ( $130.6 \pm 50.9$  min) and São Vicente ( $34 \pm 19.5$  min), being the NRRT in Juréia about 3.8 times higher than in São Vicente (Table I). The NRRT (in minutes), between mangrove areas showed the following descending order  $JUR > CAN > (BET = CUB) > IGU > SAV$ , regardless of season. Four mangrove areas showed seasonal differences for NRRT: Cananéia ( $U=594$ ,  $P=0.028$ ), São Vicente ( $U=450$ ,  $P=0.007$ ), Bertioga ( $U=507$ ,  $P=0.023$ ) and Iguape ( $U=639$ ;  $P=0.004$ ) (Figure 3). There was also a seasonal statistical difference for NRRT when considering all the data obtained for the mangrove areas ( $U=19223.5$ ,  $P=0.002$ ), with a higher NRRT average in the summer ( $76.7 \pm 52.9$  min) than in the winter ( $61.5 \pm 42$  min), a significant trend observed in 67% of the studied areas. The NRRT average (in minutes), on the Central

Coast (CUB, SAV and BET) was  $39.3 \pm 17$  min, 2.5 times inferior than on the South Coast (CAN, IGU and JUR) which was  $98.9 \pm 50.9$  min ( $U=28731$ ;  $P < 0.0001$ ).



**Figure 3** – Neutral red retention time (NRRT) test values for *Ucides cordatus* specimens captured in season samples (summer and winter), obtained in six mangroves of the state of São Paulo, comprised of three areas on the Central Coast (Cubatão, São Vicente and Bertioga) and three on the South Coast (Cananéia, Iguape and Juréia). Where: Bars = averages; vertical lines = standard deviation; horizontal lines with an asterisk = seasonal statistical difference between the medians; different lower case letters associated with the bars indicate statistical difference between the mangrove areas ( $P < 0.05$ ); different capital letters associated with the bars indicate statistical difference between the state of São Paulo coast areas ( $P < 0.05$ ).

**Table 1** - Micronucleus test values (MN‰) and neutral red retention test (NRRT) for *Ucides cordatus* specimens captured in mangroves of the state of São Paulo, comprised of three areas on the Central Coast (Cubatão, São Vicente and Bertioga) and three on the South Coast (Cananéia, Iguape and Juréia), each one with three sampling subareas. Where: x, average; s, standard deviation; CV (%), coefficient of variation.

Area	N	MN% (micronucleated cells/1,000)				NRRT (minutes)			
		Mín	Máx	x ± s	CV (%)	Mín	Máx	x ± s	CV (%)
<b>Juréia</b>	60	0	3	1.30 ± 0.94	72.3	45	240	130.6 ± 50.9	38.9
<b>Cananéia</b>	60	0	5	2.25 ± 1.07	47.6	60	180	111.0 ± 40.7	36.7
<b>Bertioga</b>	60	2	6	4.23 ± 1.03	24.3	15	90	44.0 ± 16.1	36.5
<b>Iguape</b>	60	3	8	4.65 ± 1.18	25.4	15	120	55.3 ± 22.7	41.1
<b>Cubatão</b>	60	3	8	5.45 ± 1.35	24.8	15	60	39.8 ± 13.8	34.6
<b>São Vicente</b>	60	3	11	6.82 ± 1.58	23.2	15	90	34.0 ± 19.5	57.4
<b>Central Coast</b>	<b>180</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>5.50 ± 1.70</b>	<b>30.9</b>	<b>15</b>	<b>90</b>	<b>39.3 ± 17.0</b>	<b>43.4</b>
<b>South Coast</b>	<b>180</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>2.73 ± 1.77</b>	<b>64.8</b>	<b>15</b>	<b>240</b>	<b>98.9 ± 50.9</b>	<b>51.5</b>
<b>Total</b>	<b>360</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>4.12 ± 2.22</b>	<b>53.9</b>	<b>15</b>	<b>240</b>	<b>69.1 ± 38.2</b>	<b>55.3</b>

#### **Biomarkers Relations: NRRT vs. MN‰**

From all the points of the NRRT vs. MN‰ relation (n=360) 14 ordered pairs with null values in one of the responses (x or y) were discarded from the analysis, a feature commonly observed in the micronucleus test (MN), when absent of genotoxic effects. It is important to notice that this discharge did not lead to differences in seasonal representations, because of the similarity maintained between the summer (n=172) and the winter (n=174). For a better representation of the data, the average of ordered pairs was calculated by analyzed mangrove area, thus obtaining 18 pairs for each season (summer vs. winter).

The relation between the NRRT vs. MN‰ (n=360) data was curvilinear and antagonistic, resulting in a negative coefficient for the Spearman correlation ( $r = -0.66$ ;  $P < 0.001$ ). This negative Spearman association was also confirmed when the average of these variables was taken into consideration by mangrove area ( $r = -0.84$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 36$ ), and also for each weather season (winter:  $r = -0.91$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 18$ ; and summer:  $r = -0.86$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 18$ ).

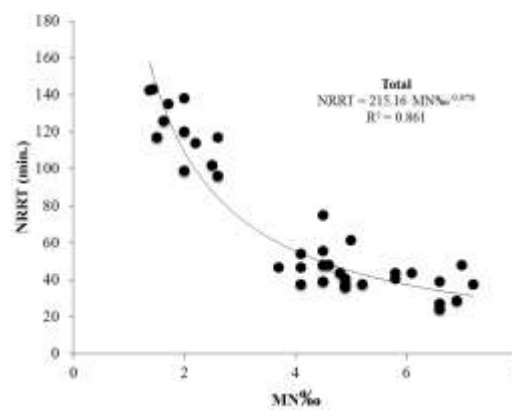
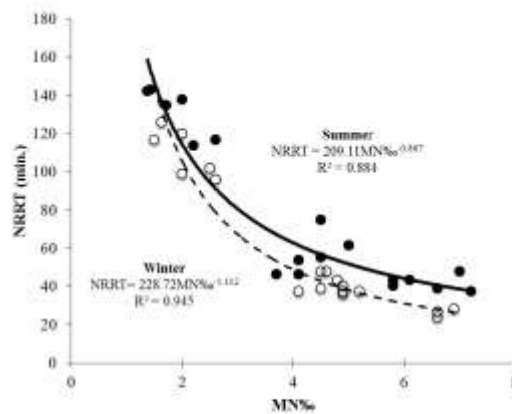
The points' adjustments by the power function were applied to each season (n=18/each) as well as the data total number (n=36), as shown in figure 4.

$$\text{Total: } NRRT = 215.16 \text{ MN}\%^{-0.978} \quad (R^2=0.861)$$

$$\text{Summer: } NRRT = 209.11 \text{ MN}\%^{-0.867} \quad (R^2=0.884)$$

$$\text{Winter: } NRRT = 228.72 \text{ MN}\%^{-1.11} \quad (R^2=0.945)$$

The linearized seasonal equations (Summer:  $\ln NRRT = 5.34 - 0.867 \ln MN\%$ ; and Winter:  $\ln NRRT = 5.43 - 1.11 \ln MN\%$ ) were contrasting both in relation to the source index (constant  $a$ :  $t=4.11$ ;  $P<0.0001$ ), but also to the regression index (constant  $b$ :  $t=2.33$ ,  $P=0.0265$ ). This fact shows two distinct equations, with clear seasonal effects on the relation between these two biomarkers.



**Figure 4** - Relation between NRRT (neutral red retention time, in minutes) by MN% (number of micronucleated cells per thousand analyses) in *Ucides cordatus*, with empirical points' adjustment via power function. Above, relation between the biomarkers for the analyzed periods of summer and winter; and below, the total relation between the biomarkers, disregarding their season.

## Discussion

Understanding the biological responses of individuals and their natural populations to xenobiotics is very important for environmental conservation because the synergistic effects of these substances can impact several biological levels (Bresler et al. 2003; Forbes et al. 2006). So, whenever possible, studies that address indicator species must take into account abiotic differences in different weather seasons, such as variations in temperature, water pH and dissolved oxygen levels (Azevedo and Braga 2011). The action and/or combination of these parameters create different situations of contamination due to the different entry routes of metals and xenobiotic substances in organisms. In Brazil two seasons predominate (summer and winter), defined primarily by their rain levels, comprised of rainy and dry seasons (Sant'Anna-Neto 2005). Several studies have detected significant seasonal differences on the responses between the biomarkers in a range of organisms such as fishes, shellfishes, plants and crustaceans (Orbea et al. 2002; Andrade et al. 2004; Koukouzika and Dimitriadis 2005; Seriani et al. 2013).

Micronuclei are structures that signal the damage to genetic material, being able to determine the genotoxic effect in estuarine environments (Pinheiro et al. 2013). In the present study, the data obtained for this biomarker indicate mangrove areas with a lower presence of clastogenic compounds (Hoshina et al. 2008). This fact was verified for the two mangrove areas with the best conservation status (Juréia and Cananéia), where the micronucleated cells averages were  $<1.5$  MN‰, contrasting with historically contaminated areas (Cubatão and São Vicente), where the average was five times higher ( $>6.1$  MN‰). Similar results had been reported for some fish species collected in the Santos-São Vicente estuary (e.g., the catfish *Cathorops spixii* and the fat snook *Centropomus parallelus*), which had more obvious and numerous nuclear changes than the animals collected in Cananéia's estuary (Kirschbaum et al. 2009, Azevedo et al. 2012). Thus, the results obtained by these authors demonstrate that the pollution levels in the region of Cananéia were not enough to produce such critical genetic damage, as in the present study.

This also affects the data obtained from the Central Coast of the state of São Paulo (Cubatão, São Vicente and Bertioga), which is characterized by a higher human density and industrialization (Martins et al. 2011; Pinheiro et al. 2013). In this region, the micronucleated cells average for *U. cordatus* ( $5.5 \pm 1.7$  MN‰) was 49.1% higher than in the South Coast ( $2.7 \pm 1.8$  MN‰), which, on the other hand, has antagonistic characteristics when compared to the

central section, including the presence of several conservation units (Cananéia, Iguape and Juréia).

Pinheiro et al. (2013) investigated the relation between the contamination by heavy metals and the genotoxic impact on *Ucides cordatus*, reporting a higher contamination in sediment and micronuclei average in Cubatão than in Juréia. Pinheiro and Toledo (2010) also reported a land crab in the mangrove area of São Vicente with a deformity in one of its chelipeds, with a genotoxicity average of  $11.5 \pm 2.0$  MN%. The mangroves in Cubatão and São Vicente are within the Santos-São Vicente estuary (SSV-E), receive sediments resulting of erosion brought by the water from the Serra do Mar, and are influenced by the significant change in salinity that occurs with the tides (Silva and Gomes 2012). Due to the present anthropogenic impacts, the natural sediment retention has been compromised, requiring constant dredging on the estuary main channel, to support the draft of ships that attend the port (Alfredini et al. 2013). This procedure removes and relocates sediments contaminated by chemicals, household waste and oil derivatives from the channel bottom, revolving contaminants that may be bioavailable in the water column, as well as contaminating adjacent areas (Cutroneo et al. 2015). Mangrove sediment is more susceptible to such contaminations, mainly due to the size of its particles, much thinner and prone to absorption of substances derived from oil burning and heavy metals (Saifullah et al. 2002; Pinto et al. 2015; Youssef et al. 2015).

These data follow the history of contamination of the studied mangroves because smaller retention times indicate greater stress (physiological damage) to the organism, with the opposite being able to exceed 120 minutes in areas of pristine mangroves (Duarte et al., 2016). Thus, the data obtained for *U. cordatus* support the lowest retention averages for Cubatão and São Vicente ( $39.8 \pm 13.8$  and  $34 \pm 9.5$  min, respectively), when confronted with the average obtained from animals from an ecological station - Juréia-Itatins ( $130.6 \pm 50.9$  minutes). Svendsen et al. (2004) draw attention to the sensitivity of this biomarker and the efficiency of their response to cytotoxic impact coming from different sources of contamination, being them inorganic (e.g., heavy metals) or organic (e.g., HPAs).

Seasonal changes in micronucleus frequencies are thoroughly documented in studies about estuarine species, like *Limnoperma fortunei* (Villela et al. 2007) and *Mytilus galloprovincialis* molluscs (Pavlica et al. 2008), and several fish species (*Mugil sp.*, *Netuna sp.*, *Centropomus parallelus* and *Oreochromis niloticus*), showing an increase of micronuclei average during the summer or rainy season (Andrade et al. 2004; Çavas and Ergene-Gozukara 2005; Kirschbaum et al. 2009; Fuzinato et al. 2013). These authors confirmed an elevated

genotoxicity during the summer, though, as in most areas of this study, significant seasonal differences were not noted. As well as in this study, seasonal statistical differences were not confirmed for genotoxicity. According to Alvares et al. (2013) Brazilian southeast-south regions, in the southern hemisphere, show two well defined seasons, one with high temperatures and higher precipitation levels, from October to March (summer); and the other with colder months and lower amount of rain from April to September (winter). In periods of high rainfall there is a tendency to increase the flow of waste and contaminated mud from leaching and, therefore, increasing toxic products with genotoxic and clastogenic effects (Polard et al. 2011). Other studies also relate an association between micronuclei frequency and precipitation, decreasing nuclear abnormalities in drier months, coinciding with flow reduction and less pollution of water bodies (Polard et al. 2011; Fuzinato et al. 2013). Areas that already suffer from discharges of domestic and industrial effluents have the effect of contaminants potentiated during rainy seasons, when they get xenobiotics brought by leaching, resulting in significant chemical changes and maximizing genotoxic effects (Omar et al. 2012).

Neutral red assay (NRRT) confirmed significant seasonal effects for 67% of the studied mangrove areas (Cananéia, Bertioga, Iguape and São Vicente), differing from the micronucleus test, where only 17% of the areas (Cubatão) showed significant seasonal differences. The NRRT data show a tendency of seasonal changes in mangrove areas belonging to large estuarine systems (Cananéia-Iguape-Peruíbe and Santos-São Vicente). This probably occurs because of the stressor effects being potentiated by multiple sources, added to the natural stress caused by the reduction of water volume during the dry season. To date, no data on the literature addressed the seasonal effects of NRRT on *Ucides cordatus*. However, for some species of *Mytilus* mussels (*M. edulis* and *M. galloprovincialis*), there is no consensus among the authors (Koukzika and Dimitriadis 2005; Hagger et al. 2010; Nahrgang et al. 2013), about the origin of the variation noted for retention times. The decrease in retention times during the winter may be related to the reproductive period of these bivalves (Harding et al. 2004; Hagger et al. 2010), which would not apply to uçá-crabs, that have their reproductive period associated to hot and rainy seasons (Pinheiro and Fiscarelli 2001; Dalabona et al. 2005). However, from November to January the phenomenon called "andada" (walk or march) by *U. cordatus* is intensified in the southeast south, for reproductive purposes, generating stress by competition between males over partners and, therefore, energy expenditure (Wunderlich et al. 2008; Sant'Anna et al. 2014). Still, changes in food availability or changes in environmental factors (e.g., temperature, salinity,



concentration of pollutants out of drought) can contribute to increased physiological stress and should be considered in seasonal analysis (Harding et al. 2004; Nahrgang et al. 2013; Catharino et al. 2015).

The presence of organic compounds and heavy metals in the environment can inhibit processes related to cellular activity, causing long term changes to the genetic material, as well as compromising the organism physiologically, metabolically and even related to the aquatic organisms' survival (Bianchi et al. 2011; Pinheiro et al. 2013). The lack of knowledge about the physiological limits of biomarkers has prevented their reliable use in organisms *in situ* (Hagger et al. 2010). Yet, the results obtained in this study are aligned to the history of contamination of each mangrove area, validating the use of these biomarkers for categorizing the conservation status of the species and the environment it is situated. Thus, uçá-crabs confirm their excellence as a bioindicator species of the conservation status of mangroves in the Western Atlantic, refining protocols, as well as the design of future management projects. Although this study represents only a small temporal sample of the life of this species in mangroves (longevity of 10 years, according to Pinheiro et al. 2005), it was possible to confirm that the NRRT is sufficiently sensitive to detect seasonal changes and pollution of mangrove areas. Thus, considering the significant amount of contamination sampled and the efficiency of the responses, we propose that the values presented in this study for MN‰ and NRRT should be validated as guides in monitoring mangroves. We also note that based on the precautionary principle, the analysis with these biomarkers should be conducted during the rainy season (summer), when the physiological stress and damages suffered by the animals are maximized, mainly due to their seasonal reproduction (Dalabona et al. 2005). It is important to note that the crabs used in this study were about five years old, a considerable period of residence and biological response to local environmental pressures, given that they dig the sediment, interact with the water and feed on vegetation (Amouroux and Tavares 2005; Christofolletti et al. 2013).

### **Acknowledgements**

To the *National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)* for granting doctoral scholarship to CAS (Proc. # 141627 / 2014-0). To the *Technical-Scientific Committee of the Forest Institute (COTEC / FF)* for permission and assistance on collecting within the Juréia-Itatins Ecological Station (COTEC # 005183/2015) and to *Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio)* for the license intended to the doctoral

research project to CAS (SISBIO # 47192-2) and definite collection permit for MAAP (SISBIO # 13581-1). To the CRUSTA members, Michel T. Angeloni, Nicholas Kriegler, Camila E. R. Pimenta and Márcio C. A. João for the support in field and laboratory activities. To the graphic designer Gustavo H. S. Pinheiro for making the map of the study areas.

## References

- Abessa DMS, Carr RS, Sousa ECPM, Rachid BRF, Zaroni LP, Gasparro MR, Pinto YA, Bicego MC, Hortellani MA, Sarkis JES, Muniz P (2008) Integrative ecotoxicological assessment of contaminated sediments in a complex tropical estuarine system. In Hofer TN (ed) Marine pollution: new research. Nova Science Publishers, New York, pp 125-159
- Adams SM, Shepard KL, Greeley Jr MS, Jimenez BD, Ryan MG, Shugart LR, McCarthy JF, Hinton DE (1989) The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar Environ Res* 28:459-464
- Alfredini P, Arasaki E, Pezzoli A, Fournier CP (2013) Impact of climate change on the Santos Harbor, São Paulo State (Brazil). *The International Journal on Marine Navigation and Safety Sea Transportation* 7(4):609-617
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G (2013) Koppen's climate change classification map for Brazil. *Meteorol Z* 22(6):711-728
- Amouroux JM, Tavares M (2005) Natural recovery of amazonian mangrove forest as revealed by brachyuran crab fauna: preliminary description. *Vie Milieu* 55:71-79
- Andrade VM, Silva J, Silva FR, Heuser VD, Dias JF, Yoneama ML, Freitas TRO (2004) Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two Southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 44(5):459-468
- Anouti FA (2014) Bioaccumulation of heavy metals within mangrove ecosystems. *J Biodivers Endanger Species* 2:1-2
- Azevedo JS, Braga ES, Ribeiro CAO (2012) Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on southeastern Brazilian coast. *Braz J Oceanogr* 60(3):323-330

- Baptista BWM, Vieira LGS (2014) A cultura como ferramenta de manutenção das raízes caiçaras da Juréia. *Revista Observatório da Diversidade Cultural* 1(1):78-89 (in portuguese)
- Bastami AA, Khoei KJ, Esmailian M (2012) Bioaccumulation of heavy metals in sediment and crab, *Portunus pelagicus* from Persian Gulf, Iran. *Middle East J Sci Res* 12(6):886-892
- Bayne BL, Clarke KR, Gray JS (1988) Special-Biological effects of pollutants: Results of a practical workshop. *Mar Ecol Prog Ser* 46:1- 278
- Bianchi J, Espindola ELG, Marin-Morales MA (2011) Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotox Environ Safe* 74(4):826-833
- Bresler V, Abelson A, Fishelson L, Feldstein T, Rosenfeld M, Mokady O (2003) Marine molluscs in environmental monitoring. *Helgoland Mar Res* 57:157-165
- Catharino MGM, Vasconcellos MBA, Kirschbaum AA, Gasparro MR, Sousa ECPM, Minei CC, Moreira EG (2015) Passive biomonitoring study and effect biomarker in oysters *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819: Mollusca, Bivalvia) in Santos and Cananéia Estuaries in São Paulo State, Brazil. *J Radioanal Nucl Chem* 303:2297–2302
- Çavas T, Ergene-Gozukara S (2005) Micronucleus test in fish cells: a bioassay for *in situ* monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ Mol Mutagen* 46:64-70
- Cesar A, Pereira CDS, Santos AR, Abessa DMS, Fernández N, Choueri RB, DelValls TA (2006) Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente Estuarine System - Brazil. *Braz J Oceanogr* 54(1):55-63
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2001) Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. Relatório do Programa de Controle de Poluição. São Paulo (SP), 137p + 46 pranchas. (in portuguese)
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2007) Relação de áreas contaminadas - Relação por municípios. [http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/texto\\_areas\\_cont\\_nov\\_08.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_08.pdf). Acess: 02/08/2015. (in portuguese)

Chapman PM, Wang F, Janssen C, Persoone G, Allen HE (1998) Ecotoxicology of metal in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment and remediation. *Can J Fish Aquat Sci* 55:2221–2243

Christofolletti RA, Hattori GY, Pinheiro MAA (2013) Food selection by a mangrove crab: temporal changes in fasted animals. *Hydrobiologia* 702:63-72

Collaço FL, Sartor SM, Barbieri E (2015a) Cultivo de bijupirá (*Rachycentron canadum*) em Cananeia, SP, Brasil. Avaliação da viabilidade utilizando geoprocessamento. *Journal of Integrated Coastal Zone Management* 15(2):277-289 (in portuguese)

Collaço FL, Sartor SM, Barbieri E (2015b) Uso do geoprocessamento para definição de áreas de cultivo de ostras na região estuarina de Cananéia, São Paulo, Brasil. *Journal of Integrated Coastal Zone Management* 15(2):193-207 (in portuguese)

Countryman PI, Heddle JA (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41:321-332

Cutroneo L, Castellano M, Carbone C, Consani S, Gaino F, Tucci S, Magri S, Povero P, Bertolotto RM, Canepa G, Capello M (2015) Evaluation of the boundary condition influence on PAH concentrations in the water column during the sediment dredging of a port. *Mar Pollut Bull* 101:583-593

Dalabona G, Loyola e Silva J, Pinheiro MAA (2005) Size at morphological maturity of *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae) in the Laranjeiras Bay, Southern Brazil. *Braz Arch Biol Technol* 48(1):139-145

Defew LH, Mair JM, Guzman HM (2005) An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay, Pacific Panama. *Mar Pollut Bull* 50:547-552

Diele K, Koch V, Saint-Paul U (2005) Population structure, catch composition and CPUE of the artisanally harvested mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in the Caeté estuary, North Brazil: indications for overfishing? *Aquat Living Resour* 18:169-178

Duarte LFA, Souza CA, Nobre CR, Pereira CD, Pinheiro MAA (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

Eichler PPB, Eichler BB, David CJ, Miranda LB, Sousa ECPM (2006) The estuary ecosystem of Bertioga, São Paulo, Brazil. *J Coastal Res* 39:1110-1113

Faridah-Hanum I, Latiff A, Hakeem KR, Ozturk M (2014) *Mangrove Ecosystems of Asia: Status, Challenges and Management Strategies*. Springer, New York

Forbes VE, Palmqvist A, Bach L (2006) The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem* 25:272-280

Fuzinato CF, Flohr L, Melegari SP, Matias WG (2013) Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. *Ecotox Environ Safe* 98:103-109

Gamain P, Gonzalez P, Cachot J, Pardon P, Tapie N, Gourves PY, Budzinski H, Morin B (2016) Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Environ Res* 113:31-38

Hagger JA, Lowe D, Dissanayake A, Jones MB, Galloway TS (2010) The influence on biomarker responses in *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology* 19:953-962

Harding JM, Couturier CYR, Parsons GJ, Ross NW (2004) Evaluation of the neutral red retention assay as a stress response indicator in cultivated mussels (*Mytilus* spp.) in relation to seasonal and environmental conditions. *J Shellfish Res* 23(3): 745-751

Hoshina MM, Sarkis JES, Bonetti J, Bonetti C (2008) Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mut Res* 656:44-48

Hosseini M, Nabavi SMB, Bastami AA, Parsa Y (2012) Mercury concentration in tissues of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) and sediments from Persian Gulf coasts, Iran. *World Appl Sci J* 18(3):322-327

IBAMA – Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (2003) Portaria n° 52, de 30 de setembro de 2003. Dispõe da avaliação e ordenamento do caranguejo-

uçá (*Ucides cordatus*) das regiões Sudeste e Sul do Brasil. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de outubro de 2003, nº 191, Seção 1: p.123. (in portuguese)

Ihaka R, Gentleman R (1996) R: a language for data analysis and graphics. J Comp Graph Stat 5(3):299-314

Jaramillo-Díaz M, Socowsky R, Pardo LM, Monserrat JM, Barra R (2013) Biochemical responses and physiological status in the crab *Hemigrapsus crenulatus* (Crustacea, Varunidae) from high anthropogenically-impacted estuary (Lenga, south-central Chile). Mar Environ Res 83:73-81

Kirschbaum AA, Seriani R, Pereira CDS, Assunção A, Abessa DMS, Rotundo MM, Ranzani-Paiva MJT (2009) Cytogenetic biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. Genet Mol Biol 32(1):151-154

Koukouzika N, Dimitriadis VK (2005) Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece Coast: Lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress. Ecotoxicology 14(4): 449-463

Lacerda LD, Campos RC, Santelli RE (2013) Metals in water, sediments, and biota of an offshore oil exploration area in the Potiguar Basin, Northeastern Brazil. Environ Monit Assess 185(5):4427-4447

Lowe DM, Fossato VU, Depledge MH (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

Mahiques MM, Burone L, Figueira RCL, Lavenére-Wanderley AAO, Capellari B, Rogacheski CE, Barroso CP, Santos LAS, Cordero LM, Cussioli MC (2009) Anthropogenic influences in a lagoonal environment: a multiproxy approach at the Valo Grande Mouth, Cananéia-Iguape System (SE, Brazil). Braz J Oceanogr 57(4):325-337

Mahiques MM, Figueira RCL, Salaroli AB, Alves DPV, Gonçalves C (2013) 150 years of anthropogenic metal input in a biosphere reserve: The case study of the Cananéia–Iguape coastal system, southeastern Brazil. Environ Earth Sci 4(68):1073-1087

- Martins CC, Bicego MC, Mahiques MM, Figueira RCL, Tessler MG, Montone RC (2011) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil): Sources and depositional history. *Mar Pollut Bull* 63:452-458
- Mello K, Toppa RH, Abessa DMS, Castro M (2013) Dinâmica de expansão urbanazonacosteirabrasileira: o caso do município de São Vicente, São Paulo, Brasil. *Journal of Integrated Coastal Zone Management* 13(4):539-551 (in portuguese)
- Mendonça JT (2015) Characteristics of small-scale fishing on the south coast of São Paulo (Brazil). *Bol Inst Pesca* 41(3):479-492 (in portuguese)
- Moore MN, Lowe DM, Livingstone DR, Dixon DR (1986) Molecular and cellular indices of pollutant effects and their use in environmental impact assessment. *Water Sci Technol* 18:223-228
- Moreira A, Figueira E, Amadeu MVM, Soares RF (2016) Salinity influences the biochemical response of *Crassostrea angulate* to Arsenic. *Environ Pollut* 214:756-766
- Nahrgang J, Brooks SJ, Evenset A, Camus L, Jonsson M, Smith TJ, Lukina J, Frantzen M, Giarratano E, Renaud PE (2013) Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamyis landica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) – Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquat Toxicol* 127:21-35
- Nudi AH, Wagener ALR, Francioni E, Scofield AL, Sette CB, Veiga A (2007). Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. *Environ Int* 33:315-327
- Nudi AH, Wagener ALR, Francioni E, Sette CB, Sartori AV, Scofield AL (2010) Biomarkers of PAH exposure in crabs *Ucides cordatus*: laboratory assay and field study. *Environ Res* 110:137-145
- Omar WA, Zaghloul KH, Abdel-Khalek AA, Abo-Hegab S (2012) Genotoxic effects of metal in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutat Res* (746):7-14

Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Solé M, Porte C, Cajaraville MP (2002) Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBS in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat Toxicol* 58: 75-98

Pavlica M, Podrug M, Štambuk A, Cvtejko P, Klobučar GIV (2008) Seasonal variability in micronuclei induction in haemocytes of mussels along the Eastern Adriatic Coast. *Polish J Environ Stud* 17(5):765-771

Piazza V, Gambardella C, Canpea S, Costa E, Faimali M, Garaventa F (2016) Temperature and salinity effects on cadmium toxicity on lethal and sublethal responses of *Amphibalanus amphitrite* nauplii. *Ecotox Environ Safe* 123:8-17

Pinheiro MAA, Costa TM, Gadig OBF, Buchman FSC (2008) Os ecossistemas costeiros e sua biodiversidade na Baixada Santista. In: Oliveira AJFC, Pinheiro MAA, Fontes RFC (Eds.) *Panorama Ambiental da Baixada Santista*, Universidade Estadual Paulista – Campus Experimental do Litoral Paulista, São Vicente (SP), pp 7-26 (in portuguese)

Pinheiro MAA, Duarte LFA, Toledo TR, Adam ML, Torres RA (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 MAA, Fiscarelli AG (2001) Manual de apoio à fiscalização do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*). Itajaí: CEPESUL/IBAMA. 43p. (in portuguese)

Pinheiro MAA, Fiscarelli AG, Hattori GY (2005) Growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). *J Crustacean Biol* 25(2):293-301

Pinheiro MAA, Silva PPG, Duarte LFA, Almeida AA, Zanotto FP (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 MAA, Toledo TR (2010) Malformation in the crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), in São Vicente, State of São Paulo, Brazil. *Revista CEPESUL – Biodiversidade e Conservação Marinha* 1(1):61-65



- Pinto AB, Pagnocca FC, Pinheiro MAA, Fontes RFC, Oliveira AJFC (2015) Heavy metals and TPH effects on microbial abundance and diversity in two estuarine areas of the southern-central coast of São Paulo State, Brazil. *Mar Pollut Bull* 96(1-2):410-417
- Polard T, Jean S, Merlina G, Laplanche C, Pinelli E, Gauthier L (2011) Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:144-149
- Saifullah SM, Khan SH, Ismail S (2002) Distribution of nickel in a polluted mangrove habitat of the Indus delta. *Mar Pollut Bull* 44(6):551-576
- Sant'Anna BS, Borges RP, Hattori GY, Pinheiro MAA (2014) Reproduction and management of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura, Ucididae) at Iguape, São Paulo, Brazil. *An Acad Bras Cienc* 86(3):63-73
- Sant'Anna Neto JL (2005) The ten commandments of the southeast Brazilian climatology. *Rev Bras Clim* 1(1): 43-60 (in portuguese)
- Scarpato R, Migliore L, Alfinito-Cognetti G, Barale R (1990) Induction of micronucleus in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Mar Pollut Bull* 21(2):74-80
- Schaeffer-Novelli, Y. (1995) Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. *Caribbean Ecological Research*.
- Schaeffer-Novelli Y, Soriano-Sierra E J, Vale CC, Bernini E, Rovai AS, Pinheiro MAA, Schmidt AJ, Almeida R, Coelho-Jr C, Menghini RP, Martinez DI, Abuchahla GMO, 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
- Semensatto-Jr DL, Araújo GCL, Funo RHF, Dias-Brito D (2007) Metais e não-metais em sedimentos de um manguezal não poluídos, Ilha do Cardoso, Cananéia (SP). *Rev Pesq Geo* 34(2): 25-31 (in portuguese)
- Seriani R, Abessa DMS, Pereira CDS, Kirschbaum AA, Assunção A, Ranzani-Paiva MJT (2013) Influence of seasonality and pollution on the hematological parameters of the estuarine fish *Centropomus parallelus*. *Braz J Oceanogr* 61(2):105-111

- Silva CAR, Lacerda LD, Rezende CE (1990) Metals Reservoir in a Red Mangrove. *Biotropica* 22(4): 339-345
- Silva OR, Gomes MBM (2012) Impactos nas atividades portuárias no sistema estuarino de Santos. *Revista Metropolitana de Sustentabilidade* 2(2):64-81 (in portuguese)
- Souza MR, Barreia W (2001) The popular knowledge about fish at a “caçara” community of Juréia-Itatins Ecological Station-SP. *Bol Inst Pesca* 27(2):123-130 (in portuguese)
- Spalding M, Kainuma M, Collins L (2010) Mangrove and people. In: Spalding M, Kainuma M, Collins L (eds) *World Atlas of Mangroves*. Earthscan, Washington (DC), pp 23-43
- Svendsen C, Spurgeon DJ, Hankard PK, Weeks JM (2004) A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotox Environ Safe* 57:20-29
- Udechukwu BE, Ismail A, Zulkifli SZ, Omar H (2014) Distribution, mobility, and pollution assessment of Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, and Fe in intertidal surface sediments of Sg. Puloh mangrove estuary, Malaysia. *Environ Sci Pollut R* 22(6):4242-4255
- Villela IV, Oliveira IM, Silveira JC, Dias JF, Henriques JAP, Silva J (2007) Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperma fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutat Res* 628:76-86
- Wunderlich AC, Pinheiro MAA, Rodrigues AMT (2008) Biology of the mangrove uçá-crab, *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura), in Babitonga Bay, Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Zool* 25(2):188-198
- Youssef M, El-Sorogy A, Kahtany KA, Otiaby NA (2015) Environmental assessment of coastal surface sediments at Tarut Island, Arabian Gulf (Saudi Arabia). *Mar Pollut*

# Capítulo 2

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

Será submetido como artigo científico original à  
*Environmental Monitoring and Assessment*

## Resumo

Em vista do atual panorama de contaminação dos ambientes costeiros, a quantificação de danos celulares e de defesas antioxidantes na biota podem ser usadas como biomarcadores de contaminação. Foram coletados machos adultos de *Ucides cordatus*, em seis áreas de manguezal do Estado de São Paulo (Brazil), com distinto registro histórico quanto a contaminação, em duas estações climáticas (verão e inverno). Quanto a citogenotoxicidade foi verificado incremento da média de micronúcleos (MN%) em áreas mais impactadas, bem como diminuição do tempo de retenção de vermelho neutro pelos lisossomos (NRRT, em minutos). Em contraste, as áreas consideradas mais prístinas, apresentaram  $MN\% < 3$  e  $NRRT < 100$  min., sem efeito climático, indicando que nestas áreas os processos degenerativos pelo contato com xenobióticos são menores. Foram realizados, também, testes fisiológicos (MT, metalotioneínas; LPO, lipoperoxidação), em três tecidos com diferentes funções: respiratória (BA, brânquia anterior); osmoregulatória (BP, brânquia posterior); e detoxificador (HP, hepatopancreático). No verão a concentração MT nos tecidos foi mais elevada ( $HP > BP > BA$ ), com destaque evidente para área de manguezal menos poluída. Já as médias de LPO foram mais pronunciadas no inverno, com as maiores concentrações também no hepatopâncreas. Por análise multivariada foi confirmado a adequação de uso deste conjunto de biomarcadores durante a estiagem (inverno), quando ocorre minimização de fenômenos biológicos nesta espécie de caranguejo (p. ex., ausência de reprodução). Além disso, foi confirmada sensibilidade de todos os biomarcadores à poluição das áreas de manguezal em estudo, sendo NRRT e MT os mais sensíveis à sazonalidade.

**Palavras-chave:** bioindicador, lipoperoxidação, metalotioneína, micronúcleo, sazonalidade, vermelho neutro.

## 1 Introdução

Os manguezais são complexos ecossistemas costeiros de transição entre os ambientes terrestre, marinho e de água doce, extremamente relevantes como habitat para diversas espécies de moluscos, crustáceos, peixes, aves e mamíferos, que os usam como sítios de alimentação, reprodução e proteção (Schaeffer-Novelli 1995). Entretanto, apesar de deterem importância econômica, ecológica e pela produtividade que geram para toda a rede trófica aquática, os manguezais têm sofrido impacto direto pela ocupação antrópica desordenada dos ambientes costeiros. Assim, estima-se que caso seja mantido o ritmo atual de destruição deste ecótono, seus importantes serviços sistêmicos desaparecerão em cerca de 100 anos (Duke et al. 2007).

No litoral brasileiro, o assoreamento dos rios (por desmatamento da mata ciliar), dragagem (para aprofundamento de áreas portuárias), instalações urbanas e industriais (geradoras de fontes poluentes difusas) e a supressão vegetal (para uso por outras atividades antrópicas), resultaram em fragmentação e degradação dos manguezais, causando sua extinção local ou tornando-os vulneráveis, principalmente aqueles das regiões Norte e Sudeste do país. Segundo Udechukwu et al. (2014), os diferentes processos de ocupação de áreas costeiras têm gerado poluição por resíduos tóxicos de natureza diversa, a maioria deles bioacumuláveis e persistentes na biota, como aqueles resultantes do despejo de efluentes líquidos, descarte inadequado de resíduos sólidos, uso indiscriminado de fertilizantes/pesticidas em campos agrícolas, entre outros.

Os manguezais atuam como filtros biológicos à água e barreira geoquímica, retendo partículas, poluentes e outras impurezas. Estão localizados em zonas de progradação sedimentar, onde assentam partículas finas, particularmente as que compõem as frações siltico-argilosas e de areia muito fina (Souza-Junior et al. 2007). Além de sua característica textural, os sedimentos de manguezal são anóxicos, com elevado teor de matéria orgânica, favorecendo retenção à complexa mistura de compostos orgânicos do petróleo (p. ex., hidrocarbonetos), metais pesados e outros contaminantes, pelas reações de sulfato redução bacteriana (Saifullah et al. 2012). A ação desses xenobióticos nos organismos pode ser aguda, como ocorre em seguida a acidentes ambientais, com toxicidade em curto prazo, normalmente causando imobilidade, ou mesmo a morte do organismo (Azevedo & Chasin 2003), diferente da toxicidade crônica, onde o contaminante perdura por longo prazo, abrangendo parte ou todo o ciclo de vida de um organismo (Costa et al. 2008). Esse tipo de exposição prolongada às concentrações sub-letais, permite a sobrevivência dos organismos expostos, mas promove

alterações negativas às suas funções biológicas mais basais (p. ex., sobre a reprodução e crescimento, segundo McGeer et al. (2000) e Amiard-Triquet et al. (2011).

Em função da expressiva dinâmica hídrica e das propriedades físico-químicas que caracterizam os sistemas estuarinos, podem ocorrer alterações significativas na etologia, uso das vias de entrada e impacto causado pelas substâncias xenobióticas nos organismos (Rainbow 2007; Smedley & Kinniburgh 2012; Freitas et al. 2016). Sendo assim, segundo Azevedo & Braga (2012), a resposta dos biomarcadores pode diferir com a espécie bioindicadora (aspecto endógeno), como também por variações peculiares às diferentes estações climáticas ou períodos sazonais (aspecto exógeno), entre elas as variações hídricas (p. ex., temperatura, pH, oxigênio dissolvido e composição química). Segundo a classificação climática de Köppen (Alvares et al. 2014), no Brasil preponderam duas estações (verão-primavera e outono-inverno), bem demarcadas pelos níveis térmicos e de pluviosidade, sendo que na região Sudeste a época chuvosa (quente) ocorre de outubro a março, enquanto a época de estiagem (fria) é registrada de abril a setembro. Segundo Pavlica et al. (2008), estudos que investiguem a resposta da sazonalidade sobre biomarcadores de efeito são de grande relevância, principalmente para que seja conhecido melhor o comportamento dos mecanismos de defesa (detoxificação) dos organismos afetados. Dessa maneira, é importante a avaliação de períodos caracterizados pelo aumento da lixiviação de áreas terrestre pelas chuvas, assim como sua diminuição (ou ausência), fatores que alterarão a composição e disponibilidade do complexo de poluentes com efeitos genotóxicos e clastogênicos (Polard et al. 2011).

Neste contexto, diversas espécies de animais aquáticos, como os macroinvertebrados, têm apresentado respostas quantificáveis à ação isolada ou sinérgica de contaminantes, gerando danos subletais em diversos níveis biológicos, sendo empregados como bioindicadores do estado de contaminação e qualidade ambiental (Ahearn et al. 2014). O caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) é uma espécie de crustáceo terrestre, endêmica de manguezais, com destaque econômico e ecológico nas áreas em que ocorre (Fiscarelli & Pinheiro 2002; Nordhaus et al. 2009), se destacando como espécie-testemunho da qualidade ambiental de manguezais em diferentes níveis de contaminação por xenobióticos (Pinheiro et al. 2012, 2013; Duarte et al. 2016; Ortega et al. 2016). Este caranguejo é um dos maiores macrocrustáceos de manguezal (Pinheiro & Hattori 2006; Pinheiro & Fiscarelli 2009), construindo suas galerias no sedimento inundado pelas marés (Nordhaus et al. 2009), onde estocam folhas e propágulos de mangue que usam como alimento (Christofolletti et al. 2013). Entre outros serviços ecossistêmicos, promovem bioturbação do sedimento e a incorporação de matéria orgânica (Araújo-Jr et al. 2016). Pelo exposto, sua estreita relação com os

diferentes compartimentos ambientais (água, sedimento e vegetação), possibilita distintas vias de entrada para as substâncias xenobióticas (Pinheiro et al. 2012). O caranguejo-uçá apresenta características biológicas consideradas ideais a uma espécie bioindicadora, como possuir um ciclo de vida longo (Pinheiro et al. 2005), ser de captura relativamente fácil (Pinheiro & Fiscarelli 2001), reduzida vagilidade por viverem em galerias (Diele & Smith 2007) e por sua resiliência a poluentes (Harris & Santos 2000). Tais características fazem dessa espécie um excelente modelo biológico para o estudo da resposta de biomarcadores, podendo representar diferentes níveis de contaminação, seja por contaminantes isolados ou em conjunto, bem como em longo prazo, representando adequadamente a contaminação de manguezais em sua área geográfica de ocorrência no Atlântico Ocidental.

Apesar de seu uso recente como ferramenta de monitoramento ambiental, a espécie já conta com registros de malformações (Pinheiro & Toledo 2010), anomalias genéticas detectáveis por alta frequência de micronúcleos (Pinheiro et al. 2013, Duarte et al. 2016), acúmulo de metais na musculatura, brânquias e hepatopâncreas (Pinheiro et al. 2012, Araújo-Júnior et al. 2016), assim como na massa de ovos de suas fêmeas (Almeida et al. 2016). À vista de que os exemplares dessa espécie estão constantemente expostos às diversas fontes de contaminantes, este trabalho teve como objetivos: (1) utilizar o caranguejo-uçá como espécie-testemunho de qualidade ambiental para seis áreas de manguezal do litoral paulista, pela aplicação de um pacote de biomarcadores de genotoxicidade (MN%, frequência de células micronucleadas; NRRT, tempo de retenção do vermelho neutro em minutos) e fisiológicos (MT, metalotioneína; LPO, lipoperoxidação), utilizando a hemolinfa e tecidos de *Ucides cordatus*; e (2) verificar possíveis diferenças na resposta de cada um dos biomarcadores anteriormente citados, nas duas estações climáticas contrastantes (época chuvosa e de estiagem), em áreas de manguezal com diferentes níveis e históricos de contaminação.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Áreas de manguezal estudadas e seu estado de conservação**

O litoral do Estado de São Paulo (Sudeste do Brasil), tem cerca de 450 km de extensão (Alfredini et al. 2013), podendo ser dividido, didaticamente, em três grandes extensões litorâneas (litoral norte, central e sul – Duarte et al. 2016). A diversidade do histórico de ocupação humana e de atividades antrópicas nestas áreas costeiras pode ser empregada como

informação basal aos diferentes impactos e tipos de poluentes verificados nos manguezais. Entre os diferentes impactos estão assentamentos urbanos irregulares ou mal planejados; instalação de indústrias com falhas nos projetos de segurança ambiental; exploração pesqueira e mineral mal planejadas; todas resultando na degradação dos ecossistemas e da qualidade de vida da população local (Schaeffer-Novelli 1989; Silva & Gomes 2012).

No presente estudo, assim como considerado por Duarte et al. (2016) e Souza & Pinheiro (submetido), foram avaliadas áreas de manguezal do litoral centro paulista (que totalizam 8.858 ha), confrontando-as com aquelas do litoral sul (15.193 ha), que representam 99% das áreas de manguezal do Estado de São Paulo. Assim, 06 (seis) áreas de manguezal foram estabelecidas ao longo do litoral paulista (Figura 1): no Litoral Centro (Bertioga, BET; Cubatão, CUB; e São Vicente, SAV) e Litoral Sul (Iguape, IGU; Cananéia, CAN; e Juréia, JUR). Cada uma dessas áreas compreenderam três subáreas amostrais (réplicas), seguindo um gradiente de salinidade, sendo uma delas mais interna e as demais em posição intermediária e próxima à foz estuarina. Tal procedimento foi adotado na seleção das áreas devido às alterações que a salinidade e o pH promovem na mobilidade e disponibilidade de alguns poluentes, assim como seu papel como estressor natural dos organismos (Jaramillo-Díaz et al. 2013; Gamain et al. 2016; Moreira et al. 2016; Piazza et al. 2016; Pinheiro et al. – no prelo).

Cada uma das seis áreas de manguezal enfrentam diferentes tipos de impactos de origem antrópica, assim como diferentes níveis de contaminação e diversificação das fontes de poluentes. Assim, seguimos a revisão bibliográfica de Duarte et al. (2016), efetuada para cada município onde se encontram as áreas de manguezal estudadas, reunindo parâmetros relacionados à demografia (p. ex., IDH, índice de desenvolvimento humano; densidade demográfica; e rede de esgoto tratado), bem como uma caracterização do registro histórico de poluentes acima dos níveis permitidos para a água (Environment Canada 1999b) e sedimento (Environment Canada 1999a; FDEP 1994). Segundo tal revisão, as áreas selecionadas no Litoral Centro (Cubatão, São Vicente e Bertioga) possuem maior diversidade/concentração de contaminantes no ambiente e expressivo impacto antrópico, enquanto nas áreas do Litoral Sul (Cananéia, Iguape e Juréia) estes impactos e a diversidade/concentração de contaminantes são mínimos (ou inexistentes). Na porção central do litoral, o Estuário de **Bertioga (BET)** ocupa uma região com ampla área de manguezal, representada por florestas de mangue exuberantes, ocupado em pequenas áreas, por marinas destinadas à pesca esportiva e turismo ambiental (Eichler et al. 2006). De modo geral, os manguezais de Bertioga estão relativamente livres do forte impacto antropogênico oriundo do Estuário de Santos-São Vicente (ESSV), localizado a oeste, do qual este município faz parte (Gianesella et al. 2000). Apesar disso, Tramonte et al.

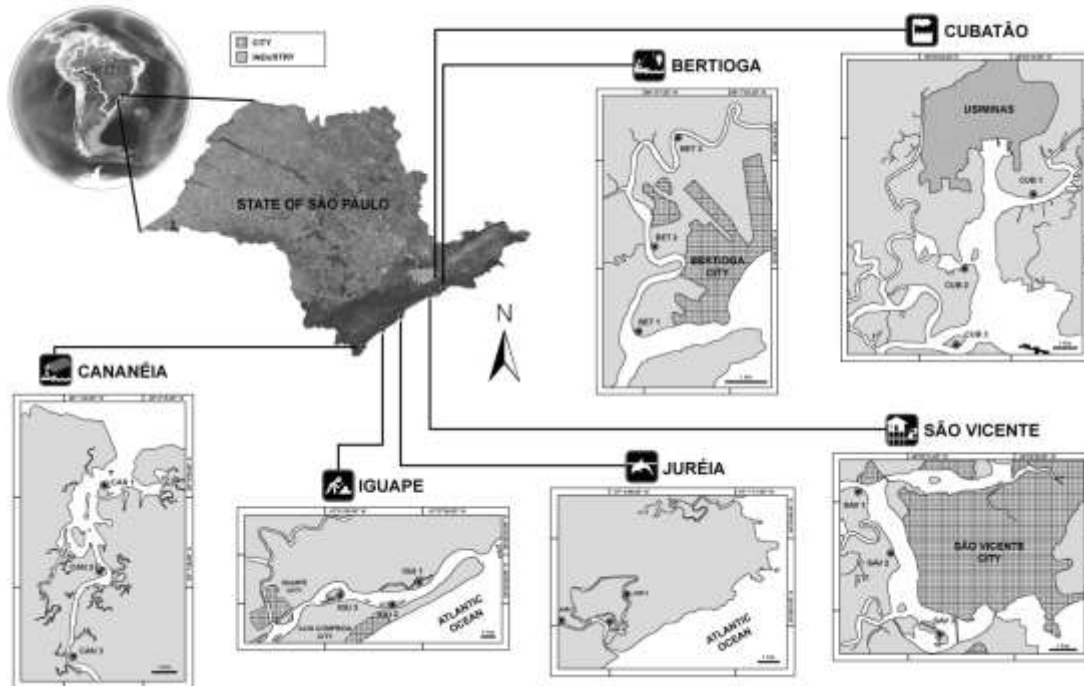
(2016) registraram reduzidas concentrações no teor disponível de Cr, Cu, Ni, Pb e Zn no sedimento, indicando seu potencial estado de acumulação. O ESSV está inserido no centro da Região Metropolitana da Baixada Santista, que compreende nove municípios, onde 4% da população do Estado de São Paulo encontra-se distribuída em seus 2.149.930 km<sup>2</sup> (IBGE 2012). Neste estuário consta o Município de **Cubatão (CUB)**, com amplo histórico de contaminação por vários poluentes, oriundos de seu imponente complexo industrial (Martins et al. 2011; Pinheiro et al. 2012, 2013). Segundo Hypolito et al. (2016), os contaminantes gerados por este complexo industrial, aliado ao provenientes do Sistema Portuário de Santos, neste mesmo estuário, são os maiores responsáveis pela degradação dos manguezais da região, seja pelo lançamento de efluentes sem tratamento, disposição inadequada de resíduos tóxicos e derramamentos acidentais de substâncias xenobióticas. O Município de **São Vicente (SAV)**, que compartilha o mesmo estuário de Cubatão, já detém expressivo impacto antropogênico, causado, principalmente, pela supressão dos manguezais e ocupação irregular das margens estuarinas por palafitas, além de apresentar um saneamento básico deficiente e descarte incorreto de resíduos sólidos (Kirschbaum et al. 2009, Mello et al. 2013).

No Litoral Sul as áreas de manguezal apresentam melhor estado de conservação, o que é explicado pelo menor adensamento populacional humano, bem como pela existência de diversas unidades de conservação estaduais e federais (p. ex., Parque Estadual Ilha do Cardoso – PEIC; Área de Proteção Ambiental Cananéia-Iguape-Peruíbe – APA-CIP, etc.). Há nesta região, um dos mais importantes complexos estuarinos do Brasil, que se estende desde o sul do Estado de São Paulo até o centro do Estado do Paraná, compondo o Complexo Lagamar. O Lagamar Paulista compreende quatro municípios (Cananéia, Iguape, Pariqueira-Açu e Ilha Comprida), todos localizados dentro da única área de proteção ambiental (APA-CIP). Localizado ao norte deste complexo, encontra-se o Município de **Iguape (IGU)**, com antiga influência de mineração às margens do Rio Ribeira de Iguape, além de grandes plantações de banana que são manejadas com agrotóxicos (organofosforados e clorados), certamente carregados para esta região estuarina (Mahiques et al. 2009, 2013). Já **Cananéia (CAN)**, localizada no Estuário Cananéia-Iguape-Peruíbe (ECIP), possui intensa atividade pesqueira artesanal/comercial (Mendonça 2015; Collaço et al. 2015a,b), sendo o caranguejo-uçá um importante produto pesqueiro para as comunidades ribeirinhas que ali vivem (Duarte et al. 2014). Criada em 2006, a Estação Ecológica Juréia-Itatins (EEJI), aqui denominada **Juréia (JUR)**, possui uma área de 80 mil hectares, sendo uma das mais importantes reservas de biodiversidade da Mata Atlântica no Estado de São Paulo. Por este motivo, foi considerada área controle no presente estudo, em função da reduzida atividade antrópica poluidora e



restrita comunidade tradicional pescadores que ali vivem (Souza & Barrela 2001; Pinheiro et al. 2013; Baptista & Vieira 2014).

Os exemplares de *Ucides cordatus* foram coletados em três subáreas amostrais de manguezal (réplicas), para cada área previamente citada. Coletaram-se por braceamento, machos adultos íntegros (presença de todos os apêndices locomotores), em estágio de intermuda (Pinheiro & Fiscarelli 2001) e largura da carapaça  $\geq 60$  mm (conforme legislação vigente – IBAMA 2003), evitando a ação de diferentes influências metabólicas sobre os biomarcadores. Foram realizadas duas expedições em 2015, no verão/época chuvosa (janeiro-março) e outra no inverno/época de estiagem (julho-agosto). Logo após a captura, os animais foram transportados até o laboratório, onde foram lavados e submetidos à biometria.



**Figura 1** – Seis áreas de manguezal, com suas três subáreas (réplicas), estudadas no litoral do Estado de São Paulo (Brasil), totalizando 18 subáreas amostrais (Fonte: Imagens de satélite do Google Earth®, redesenhadas por Gustavo Pinheiro).

## 2.2 Biomarcadores aplicados a *Ucides cordatus*

### 2.2.1 Genotoxicidade: ensaio micronúcleo (MN‰)

Uma amostra de hemolinfa (0,5 mL) foi retirada de cada caranguejo, com seringa hipodérmica (1 mL) munida de agulha de 21-gauge (evitando danos aos hemócitos – Nudi et al. 2010). Cada lâmina de microscopia (n=2) recebeu uma gota de hemolinfa, com posterior realização de um esfregaço, conforme método já realizado para esta espécie por Pinheiro et al. (2013). As lâminas foram secas naturalmente ao ar (20 min.), submetidas à solução de Carnoy (3:1 metanol/ácido acético) para fixação das células, e novamente secas. Cada lâmina foi corada com solução Giemsa 2% ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,8) por 15 min., e lavada com água deionizada. Após secas, cada lâmina recebeu uma lamínula com Entellan<sup>®</sup> (Merck<sup>®</sup>). A fim de se identificar o número de células micronucleadas por 1.000 analisadas (MN‰) as lâminas foram observadas em microscópio óptico Zeiss<sup>®</sup> (1.000x), com anotação das formações nucleares obedecendo às características propostas por Countryman & Heddle (1976).

### 2.2.2 Citotoxicidade: ensaio do tempo de retenção de vermelho neutro (NRRT)

De cada animal coletado, extraiu-se 0,5 mL de hemolinfa, com seringa hipodérmica de 1 mL e agulha de 21-gauge, anteriormente preparadas com 0,5mL de uma solução 3:2, anticoagulante/solução fisiológica (respectivamente: 2,05g  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 0,8\text{g Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 0,42\text{g NaCl}$  em 100 mL de água destilada / 4,77g HEPES + 25,58g NaCl + 4,36g  $\text{MgSO}_4 + 0,75\text{g KCl} + 1,92\text{g CaCl}_2$  em 1L de água destilada, pH de 7,36). O conteúdo de cada uma dessas seringas foi transferido para microtubos de 2mL, e mantidos em descanso (15-20 min.). Posteriormente, uma alíquota de 40µL desse preparado foi gotejada na superfície das lâminas, previamente descontaminadas com ácido nítrico (5%), lavadas com água destilada, secas, e finalmente tratadas com Poly-L-lisina (1:10 água destilada). As lâminas foram mantidas em câmara úmida e escura (15 min.) para melhor aderência das células. Nas 24 horas que antecederam o procedimento, foi preparada uma solução estoque de vermelho neutro (22,8 mg de corante em 1mL de DMSO), que, posteriormente, foi utilizada na preparação da solução trabalho (10 µL solução estoque + 5mL solução fisiológica), que foi gotejada (40 µL) sobre os hemócitos, e mantidas na câmara úmida/escuro (15 min.). As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico (400x), na primeira hora a cada 15 minutos,

com reexame, caso necessário, durante uma segunda hora a cada 30 minutos. Foi anotado o tempo de retenção do vermelho neutro para cada indivíduo, estimando-se a proporção de células com extravasamento lisossomal para o citosol, além de possíveis anormalidades indicativas de estresse celular, relacionadas ao tamanho e cor dos lisossomos (Lowe et al. 1995).

### **2.2.3 Medição da peroxidação lipídica (LPO)**

Foram utilizados porções de hepatopâncreas e brânquias (anterior e posterior) de cinco animais/subárea. Utilizou-se o protocolo adaptado de Hermes-Lima et al. (1995) e Jiang et al. (1991, 1992), nomeado Método FOX Modificado ou Ensaio de Laranja de Xilenol. As amostras foram pesadas e diluídas com metanol (1:9) e homogeneizadas em gelo. **Etapa 1:** os microtubos foram centrifugados a 5.000 rpm (5 min.) e o sobrenadante recuperado e utilizado na seguinte ordem: 90µL de FeSO<sub>4</sub> (1mM) + 35µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25mM) + 35µL de laranja de xilenol (1mM) + 175µL de água milliQ + 15µL da amostra. A solução foi incubada por uma hora à temperatura ambiente, com a placa de ELISA coberta para evitar a luz. A primeira leitura foi efetuada a 580nm. **Etapa 2:** Foi preparada uma solução de Cumene Hidroperóxido (CHP): 45µL de solução estoque de CHP + 1mL de metanol 100%, obtendo-se uma solução de 250mM. Foram pipetados 10µL da solução obtida anteriormente + 2,5mL de água MilliQ, resultando numa solução de 1mM. Em seguida, 1mL da solução obtida no passo anterior, foi adicionada a 4,714mL de água MilliQ, obtendo-se uma solução de 0,175mM. Foram adicionados 10µL da solução de CHP (0,175mM) à microplaca preparada na Etapa 1, aguardando-se 15 minutos até a estabilização da reação. Foi realizada nova leitura de absorbância em espectrofotômetro a 580nm. A diferença da absorbância após a adição de CHP foi determinada, com divisão dos valores da absorbância da amostra sem CHP por aqueles de absorbância com a solução de CHP, expressando os hidroperóxidos em equivalentes de CHP por grama de peso seco de tecido.

### **2.2.4 Estimativa da concentração de metalotioneínas (MT)**

A metalotioneína foi medida conforme protocolo descrito por Viarengo et al. (1997). As brânquias (anterior e posterior) e hepatopâncreas de cada caranguejo foram removidos e homogeneizados na proporção de 3:1 (volume: massa de tecido), em solução tampão pH 8,6

(sacarose 0,5M + Tris-HCl 20 mM + PMSF 100 mM +  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01%). O tecido homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm, com 100 $\mu$ L do sobrenadante tratado com etanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e 8 $\mu$ L de clorofórmio. Uma nova centrifugação foi realizada, a 8.000 rpm (10 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ ), e ao sobrenadante foi adicionado HCl a 37% e etanol puro. Em seguida, as amostras foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por uma hora, com posterior centrifugação de cada tubo tratado com solução de etanol-clorofórmio. Os pellets foram ressuspensos com 30 $\mu$ L NaCl (250mM) e 30 $\mu$ L de solução de EDTA (4mM). As amostras (20 $\mu$ L) foram transferidas para poços de microplaca transparentes, aos quais foram adicionados 280 $\mu$ L de solução trabalho de DTNB (1200mM), com leitura realizada por espectrofotometria (412nm). A concentração de metalotioneína foi estimada pela concentração de glutathiona reduzida (GSH) (Viarengo et al. 1997) e quantificada em espectrofotômetro usando o reagente de Ellman (NaCl 2 M, 5.50-ditio-bis- [2- ácido nitrobenzóico] de 0,43M e 0,2 M tampão de fosfato, pH 8,0) a 412nm.

### 2.2.5 Fator de condição (FC)

Esse índice foi calculado individualmente para cada animal ( $FC_i$ ) pela expressão  $FC_i = PE_i / LC_i^b$ , a partir da relação do peso úmido ( $PE_i$ ) pela largura cefalotorácica ( $LC_i$ ), variáveis biométricas registradas por uma balança digital (0,01g) e paquímetro de precisão (0,05mm), respectivamente. Para a estimativa da constante de crescimento em peso (coeficiente “b”), os dados da relação PE vs. LC foram ajustados a uma única equação ( $PE = a \cdot LC^b$ ), a partir dos indivíduos coletados. Para cada estação climática foi calculada a média aritmética do fator de condição (FC), que foram confrontadas por um teste t de Student. Os valores de fator de condição e cálculo dos valores médios para cada área em estudo, seguiram os mesmos procedimentos indicados por Pinheiro & Fiscarelli (2009) e Noori et al. (2015).

### 2.2.6 Análises estatísticas

A tabulação dos dados em planilhas foi efetuada com o programa *Microsoft Excel*<sup>®</sup> 2010, enquanto as análises estatísticas e gráficos foram efetuadas com o *R v. 3.3.1* (Ihaka & Gentleman 1996) e *Past v. 3.4* (Hammer et al. 2001).

O teste de Shapiro-Wilk foi empregado para verificar a normalidade dos dados. Os dados obtidos, quando paramétricos, foram comparados pelo Teste t Student (micronúcleo,

fator de condição, LPO), e no caso de serem não-paramétricos, foram confrontados pelo Teste de Mann-Whitney (NRRT e MT), para a verificação de diferenças sazonais ao nível de 5% de significância. A associação entre as variáveis NRRT e MN% foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Spearman, confirmada segundo o nível de significância de 5%. Em seguida, os pontos empíricos da relação NRRT vs. MN% foram ajustados pela função potência ( $Y=aX^b$ ), por análise do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), para cada época do ano (n=18/cada) e também para o total dos dados (n=36).

Os dados também foram submetidos a uma ANOVA fatorial de três vias (A, área amostral; S, sazonalidade; e T, tecido), para avaliação da significância dos efeitos nas diferentes fontes de variação, bem como em suas interações de primeira e segunda ordem. Os resultados foram representados pelas médias ( $\pm$  desvio padrão) para cada uma das seis áreas de manguezal em estudo, nas duas estações climáticas (verão e inverno). Em todos os casos o contraste das médias foram efetuado com o teste “a posteriori” de Tukey.

Também foi empregada uma análise multifatorial (PCA), compreendendo o uso de uma matriz com as médias de todos os biomarcadores utilizados, para reconhecimento de possíveis padrões. Como as variáveis apresentam unidades distintas, com diferente amplitude de variação, tiveram seus dados submetidos à função *decostand* do pacote *Vegan* (Oksanen et al. 2016), em ambiente *R*, que padroniza os dados entre “0” e “1” pelos valores mínimo e máximo de cada variável da matriz, respectivamente (Legendre & Gallagher 2001; Anderson et al. 2006).

### 3. Resultados

Os animais utilizados nas análises (n=360) apresentaram largura de carapaça (LC) variando de 62,3 a 94,2mm (média  $\pm$  desvio padrão: 76,9 $\pm$ 5,8 mm) e peso úmido total (PE) variando de 98,20 a 345,1g (207,14  $\pm$  42,8g). Durante o inverno a média de LC foi superior à de verão (LC<sub>Inv</sub>: 77,49  $\pm$  5,79 mm; e LC<sub>Ver</sub>: 76,19  $\pm$  5,67 mm; t=-1,769; p=0,07), ocorrendo o mesmo para a variável PE (PE<sub>Inv</sub>: 216,34  $\pm$  42,13g; e PE<sub>Ver</sub>: 197,88  $\pm$  41,53g; t=-3,734; p=0,00021). Os animais de Bertioga apresentaram maior média de peso (230,27  $\pm$  35,92g) em relação ao das demais áreas de manguezal (F=3,29; p=0,007), ocorrendo o mesmo em relação ao tamanho dos exemplares desta área (79,1  $\pm$  5,2mm) (F=1,987; p=0,083). Fato similar ocorreu durante o período de seca (inverno), quando os animais de Bertioga foram maiores (79,9 $\pm$ 4,9mm) (F=4,459; p=0,001) e mais pesados (239,5  $\pm$  37,8g) (F=4,655; p=0,001) em relação àqueles das demais áreas. A média do fator de condição (FC) no período de chuvas

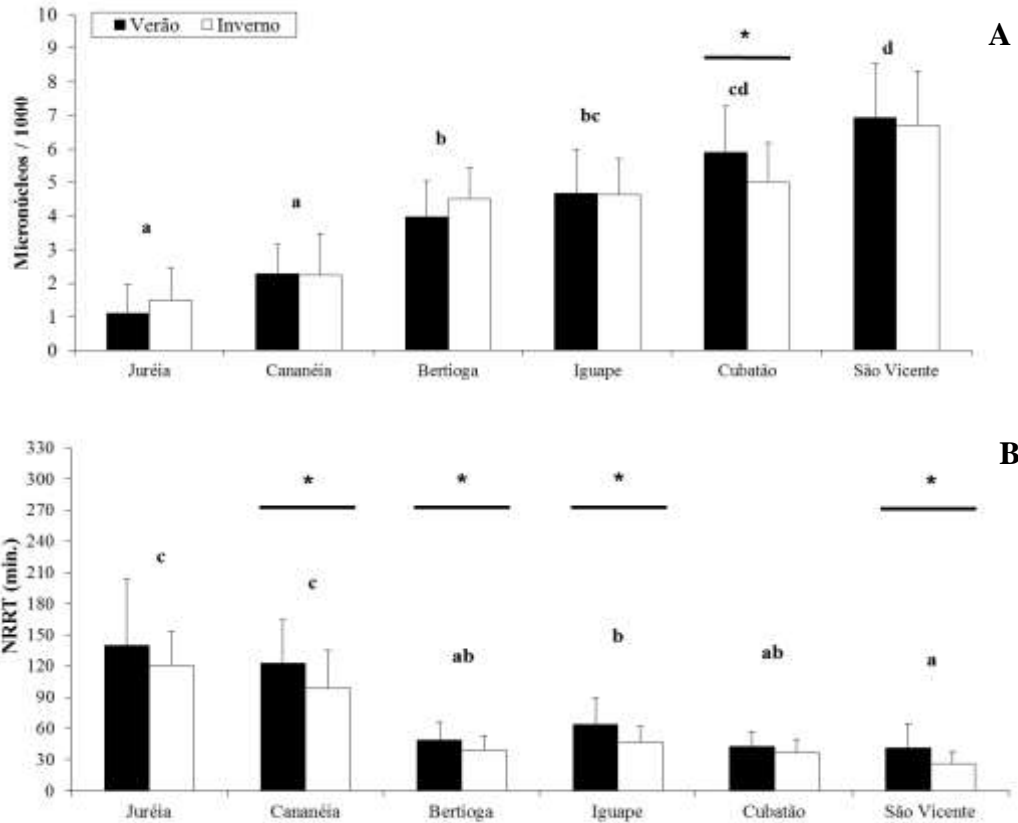
(verão) foi de  $4,6 \cdot 10^{-4} \pm 0,18 \cdot 10^{-4}$ , bem próxima dos valores para o período de seca (inverno) ( $4,8 \cdot 10^{-4} \pm 0,15 \cdot 10^{-4}$ ), diferindo estatisticamente ( $F=33,81$ ,  $p<0,0001$ )

Os dados de genotoxicidade (MN‰) foram submetidos ao teste de normalidade ( $W=0,971$ ;  $P<0,0001$ ), indicando a aplicação de um teste não-paramétrico para o confronto sazonal. Durante o verão, a genotoxicidade (MN‰) (ou frequência de micronúcleos) foi maior que no inverno, e as áreas de manguezal apresentaram a seguinte ordem hierárquica, **SAV**( $6,9 \pm 1,6$ ) = **CUB**( $5,9 \pm 1,4$ ) > [ **IGU**( $4,7 \pm 1,3$ ) = **BET**( $3,9 \pm 1,1$ ) ] > **CAN**( $2,3 \pm 0,9$ ) = **JUR**( $1,1 \pm 0,9$ ), que foi mantida durante o inverno, não tendo ocorrido diferença significativa entre as estações climáticas analisadas ( $U=16232,5$ ;  $P=0,974$ ) (Figura 2A). A citotoxicidade, representada pelo tempo de retenção de vermelho neutro (NRRT, em minutos), foi maior no verão para todas as áreas, apresentando maiores médias para a Juréia e Cananéia, independente da época climática em análise (Figura 2B). Seguiu-se a seguinte ordem hierárquica (em minutos), **JUR** > **CAN** > (**BET** = **CUB**) > **IGU** > **SAV**, com diferenças sazonais registradas somente para Cananéia ( $U=594$ ;  $P=0,028$ ), São Vicente ( $U=450$ ;  $P=0,007$ ), Bertioga ( $U=507$ ;  $P=0,023$ ) e Iguape ( $U=639$ ;  $P=0,004$ ).

De modo geral a relação NRRT vs. MN‰ para o total de dados foi curvilínea, evidenciando o antagonismo das variáveis, resultando em um coeficiente negativo para a correlação de Spearman ( $r=-0,66$ ;  $P<0,001$ ;  $n=36$ ). Esta associação negativa também foi confirmada quando as médias dessas variáveis foram consideradas por área de manguezal ( $r=-0,84$ ;  $P<0,001$ ;  $n=36$ ), assim como para cada estação climática (inverno:  $r=-0,91$ ;  $P<0,001$ ;  $n=18$ ; e verão:  $r=-0,86$ ;  $P<0,001$ ;  $n=18$ ) (Figura 3).

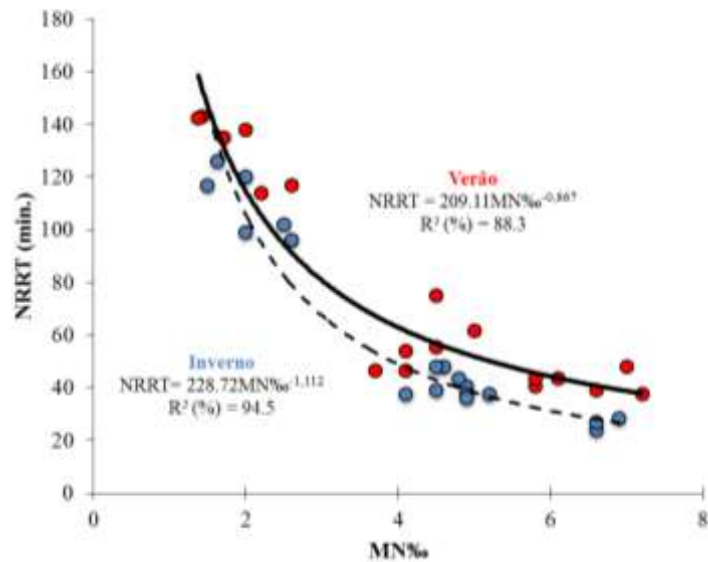
Foram realizadas medições para cada parâmetro fisiológico (LPO, lipoperoxidação; e MT, metalotioneína), relativas aos três tecidos dos exemplares de *U. cordatus*, com suas diferentes funções (brânquia anterior = respiratória; brânquia posterior = osmorregulatória; e hepatopâncreas = detoxificação), capturados nas seis áreas de manguezal em estudo. Todos os tecidos analisados apresentaram maior concentração de metalotioneína (MT) no período chuvoso (verão) (brânquia anterior:  $0,183 \pm 0,040$   $\mu\text{mol GSH mg proteína}^{-1}$ ; brânquia posterior:  $0,214 \pm 0,042$   $\mu\text{mol GSH mg proteína}^{-1}$ ; e hepatopâncreas:  $0,480 \pm 0,084$   $\mu\text{mol GSH mg proteína}^{-1}$ ), quando confrontados ao período de estiagem (inverno) (brânquia anterior:  $0,156 \pm 0,033$   $\mu\text{mol GSH mg proteína}^{-1}$ ; brânquia posterior:  $0,166 \pm 0,022$   $\mu\text{mol GSH mg proteína}^{-1}$ ; e hepatopâncreas:  $0,333 \pm 0,017$   $\mu\text{mol GSH mg proteína}^{-1}$ ). Importante salientar, que os coeficientes de variação foram distintos, com a maior variação de concentração de metalotioneína nas brânquias anteriores (21,9% e 21,2%, no verão e inverno respectivamente), seguido pelas brânquias posteriores (19,6% e 13,3%), e por fim, o menor

coeficiente de variação para o hepatopâncreas no período do inverno (5,1%), enquanto no verão foi de 17,5%.



**Figura 2.** Respostas biológicas de *Ucides cordatus* coletados em manguezais do litoral do Estado de São Paulo (Sudeste do Brasil), em duas estações climáticas (verão e inverno). (A) Genotoxicidade, frequência de células micronucleadas; (B) Citotoxicidade, vermelho neutro em minutos. Onde: Barra, média aritmética; linha vertical, desvio padrão; linha horizontal com asterisco, diferença estatística sazonal entre as medianas de cada área; letras minúsculas associadas às barras indicam diferença estatística entre as medianas registradas para as áreas de manguezal (Kruskal-Wallis,  $P < 0,05$ ).

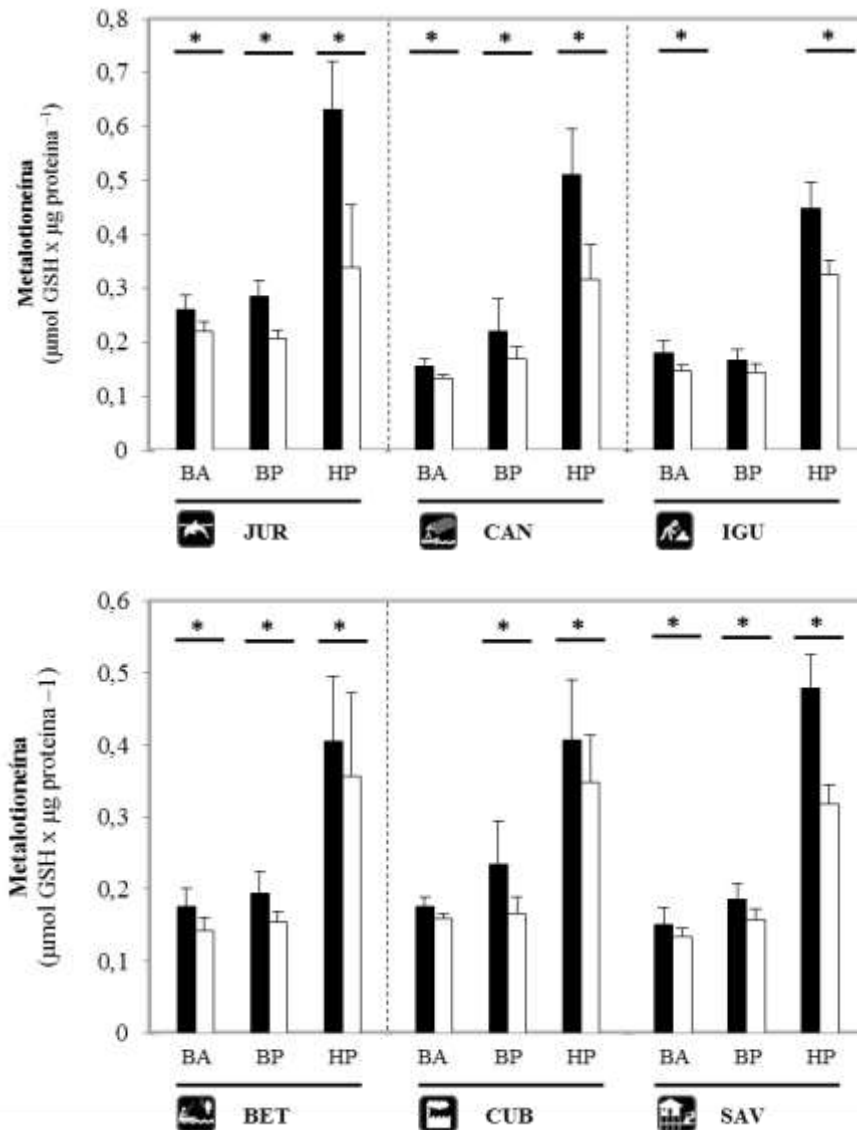
Os dados totais para cada tecido foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo revelada a não-normalidade dos dados ( $0,878 \leq W \leq 0,947$ ;  $0,0001 \leq W \leq 0,0003$ ). Assim, quando as concentrações das amostras de cada tecido foram comparadas sazonalmente pelo teste de Mann-Whitney (p. ex., concentração da brânquia anterior: verão vs. inverno), não houve diferença estatística sazonal apenas para o tecido branquial (brânquias posteriores, em Iguape; e brânquias anteriores, em Cubatão) (Figura 4).



**Figura 3.** Relação entre NRRT x MN% para os períodos analisados de verão (n=18) e inverno (n=18), em *Ucides cordatus*, com ajuste dos pontos empíricos via função potência.

Para os níveis de lipoperoxidação (LPOs), houve uma inversão do que foi registrado para os níveis de concentração de metalotioneínas (MTs), com os maiores valores de LPOs registrados no período de estiagem (inverno). Para as duas estações climáticas, o hepatopâncreas apresentou maiores níveis de lipoperoxidação. Os dados totais para cada tecido foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo revelada a normalidade independente do tecido considerado ( $0,971 \leq W \leq 0,97$ ,  $P=0,505$ ;  $0,445 \leq W \leq 0,565$ ,  $P=0,506$ ). Quando as médias foram comparadas sazonalmente para cada tecido nas áreas de estudo, apenas houve confirmação de diferença estatística no tecido branquial dos animais da Juréia (brânquia anterior:  $t = -1,42$ ;  $P < 0,0001$ ; e brânquia posterior:  $t = -0,88$ ;  $P = 0,013$ ) e São Vicente (brânquia anterior:  $t = -1,67$ ;  $P = 0,032$ ; e posterior:  $t = -1,46$ ;  $P = 0,015$ ), bem como para Cananéia (hepatopâncreas:  $t = 1,15$ ;  $P = 0,007$ ) (Figura 5).





**Figura 4.** Níveis de concentração de metalotioneínas em três tecidos do caranguejo *Ucides cordatus*, capturados em diferentes áreas de manguezal, em duas estações climáticas (chuvosa = verão; e estiagem = inverno). Onde: BA, brânquia anterior; BP, brânquia posterior; HP, hepatopâncreas; JUR, Juréia; CAN, Cananéia; IGU, Iguape; BET, Bertioga; CUB, Cubatão; SAV, São Vicente; GSH, Glutathiona reduzida. Barra preta = verão (período chuvoso); e barra branca = inverno (período de estiagem). Os valores representados pelas barras indicam as concentrações médias, as linhas verticais indicam o desvio padrão da média, e as linhas horizontais com asteriscos a diferença estatística sazonal entre as medianas de cada área de manguezal (Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ).

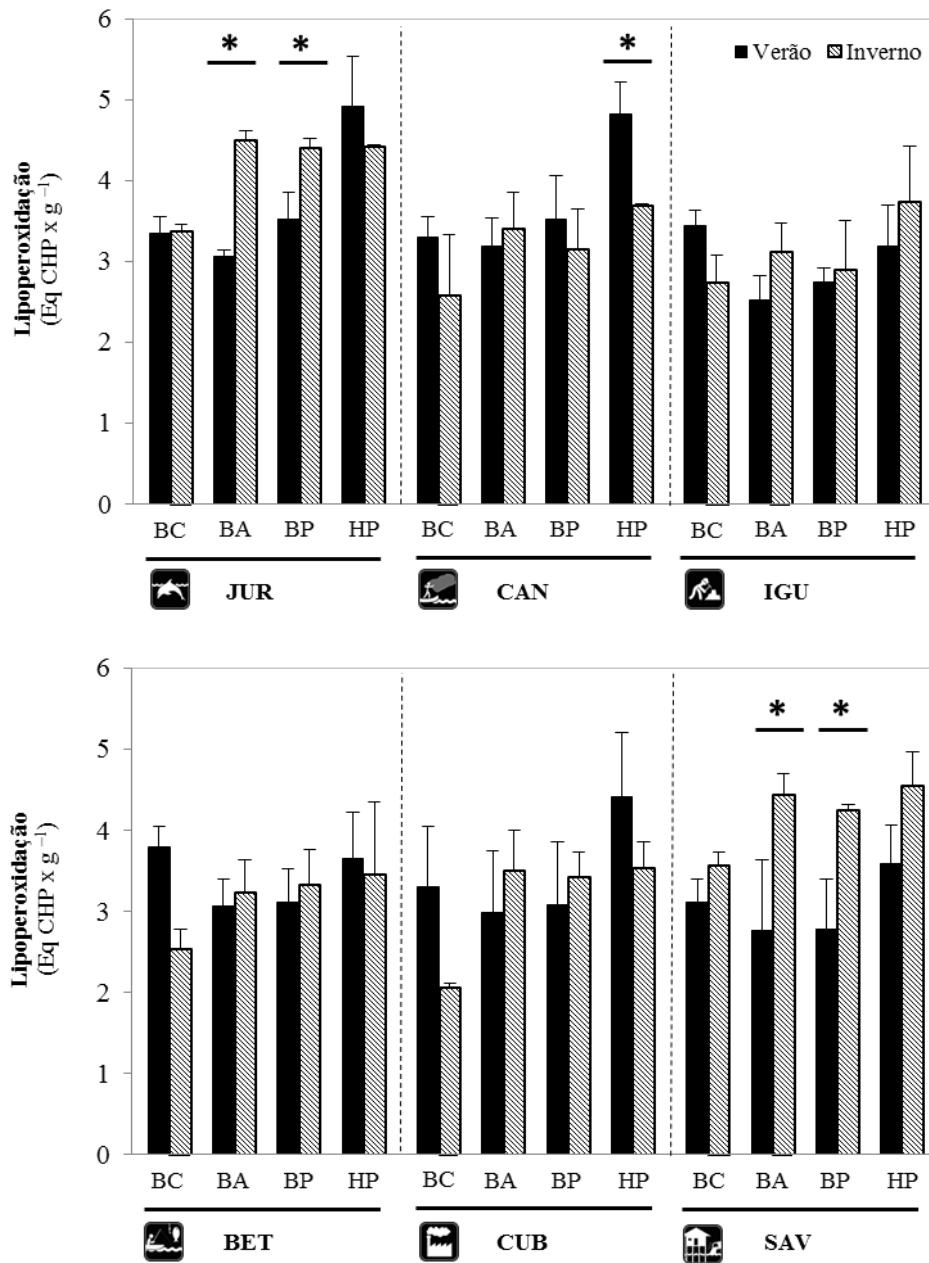
Os resultados da ANOVA fatorial de três vias foram separados para cada tratamento fisiológico utilizado (MT, metalotioneína; e LPO, lipoperoxidação). Para MT foi revelado um efeito de variação significativo para todas as fontes de variação em estudo: sazonalidade (código *S*:  $F=202,85$ ;  $P < 0,0000$ ); área de amostragem (código *A*:  $F=28,17$ ;  $P < 0,0000$ ); e tecido do caranguejo (código *T*:  $F=836,45$ ;  $P < 0,0000$ ). O mesmo ocorreu para as interações de primeira ordem (*S*x*A*:  $F=7,56$ ;  $P=0,000009$ ; *S*x*T*:  $F=49,12$ ,  $P < 0,0000$ ; e *A*x*T*:  $F=2,00$ ;

$P=0,045$ ), e na interação de segunda ordem ( $SxAxT$ :  $F=5,08$ ,  $P=0,000014$ ) (Figura 6). Igualmente, para os níveis de lipoperoxidação (LPO), também ocorreu um efeito de variação significativo para todas as fontes de variação: Sazonalidade ( $F=12,51$ ;  $P=0,00071$ ); Área de amostragem ( $F=10,70$ ;  $P<0,0000$ ); e Tecido do caranguejo ( $F=22,08$ ;  $P<0,0000$ ). Já para as seguintes interações de primeira ordem houve significância estatística apenas para as interações que envolveram a sazonalidade ( $SxA$ :  $F=7,26$ ;  $P=0,00001$ ; e  $SxT$ :  $F=9,04$ ;  $P=0,0003$ ), mas não para a interação entre as áreas pelos tecidos ( $AxT$ :  $F=0,401$ ;  $P=0,942$ ), o mesmo ocorrendo para a interação de segunda ordem ( $SxAxT$ :  $F=0,999$ ;  $P=0,452$ ) (Figura 7).

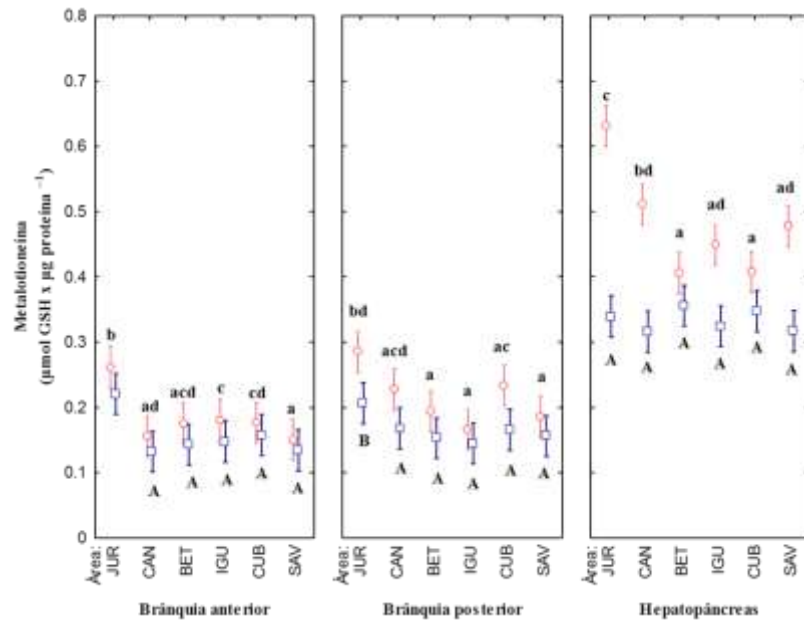
Foram realizadas duas análises multivariadas (PCA, Análise de Componentes Principais), referentes às duas estações climáticas (verão e inverno), empregando a matriz de variáveis transformadas (função *decostand*): micronúcleo, vermelho neutro, fator de condição, metalotioneína e lipoperoxidação. Na PCA de verão, as duas primeiras dimensões explicaram 75,22% da variância dos agrupamentos (PC 1: 43,27%; e PC 2: 31,95%) (Figura 8). Tais resultados foram similares àqueles obtidos para a PCA de Inverno, onde as duas primeiras dimensões explicaram 71,85% da variância dos agrupamentos (PC 1: 47,24%; e PC 2: 24,61%) (Figura 9).

Os resultados da figura 8 evidenciam o maior distanciamento da Juréia em relação às demais áreas de manguezal, ocupando os quadrantes à direita, com sua posição justificada pelos vetores MT (todos os tecidos), destando a sobreposição de dois vetores (MTBA e NRRT). Já as outras áreas se agruparam nos quadrantes à esquerda, com maior proximidade entre Cubatão e Cananéia, explicadas pelos valores de LPO (BA, BP e HP). As áreas de Bertiooga, São Vicente e Iguape foram agrupadas pelos valores de MN% e fator de condição.

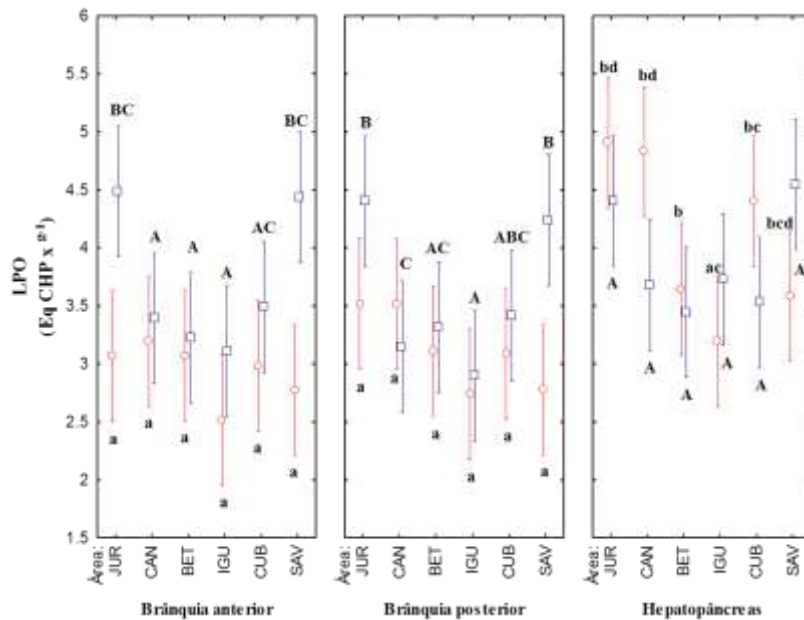
A mesma análise para o período de estiagem (inverno) (Fig. 9) também evidencia a distancia entre a Juréia das demais áreas de manguezal, sendo explicada pelos vetores de LPO e metalotioneína (todos os tecidos), com MTBA novamente sobreposto com NRRT. Todas as demais áreas localizaram-se nos quadrantes esquerdos, tendo como suporte as variáveis MN e FC.



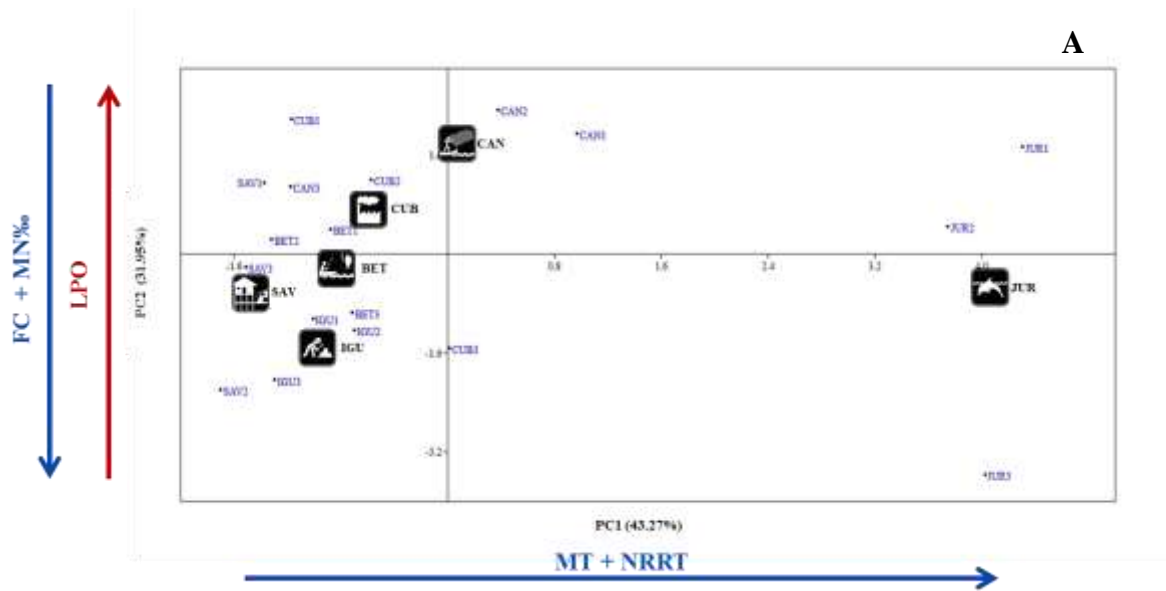
**Figura 5.** Lipoperoxidação (LPO) nas brânquias (anterior e posterior) e hepatopâncreas nos exemplares coletados do caranguejo-uçá nas áreas de manguezal em estudo. Onde: BC, branco; BA, brânquia anterior; BP, brânquia posterior; HP, hepatopâncreas; JUR, Juréia; CAN, Cananéia; IGU, Iguape; BET, Bertioga; CUB, Cubatão; SAV, São Vicente; CHP, Cumene Hidroperóxido. Os valores representados pelas barras indicam as concentrações médias, as linhas verticais indicam o desvio padrão da média, e as linhas horizontais com asteriscos a diferença estatística sazonal entre as medianas de cada área de manguezal ( $P < 0,05$ ).



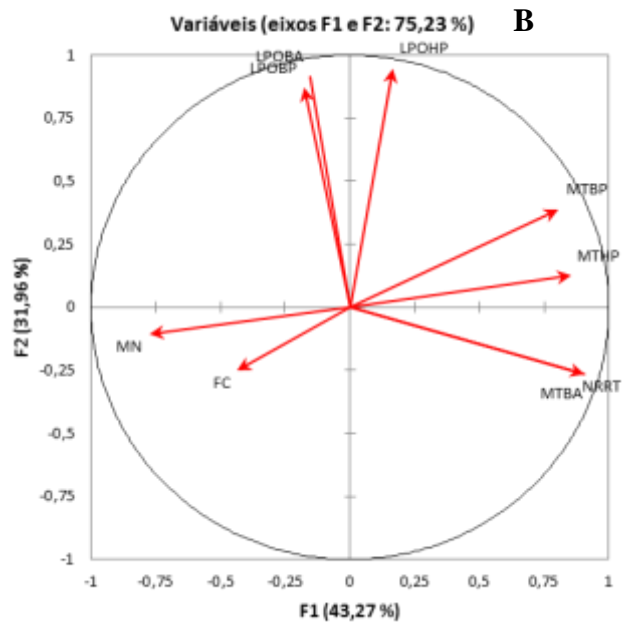
**Figura 6.** Representação gráfica da interação de segunda ordem SxAxT para os dados de concentração de metalotioneínas nos tecidos retirados de exemplares de *Ucides cordatus*. Onde: JUR, Juréia; CAN, Cananéia; BET, Bertioga; IGU, Iguape; CUB, Cubatão e SAV, São Vicente; GSH, Glutaciona reduzida. Linhas verticais indicam intervalo de confiança 95%, marcador quadrado/azul, indica a média dos dados de inverno; marcador vermelho/bola indica a média dos dados de verão. Médias acompanhadas de uma mesma letra não mostram diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ); letras minúsculas indicam dados observados no verão, enquanto letras maiúsculas representam dados obtidos durante o inverno.

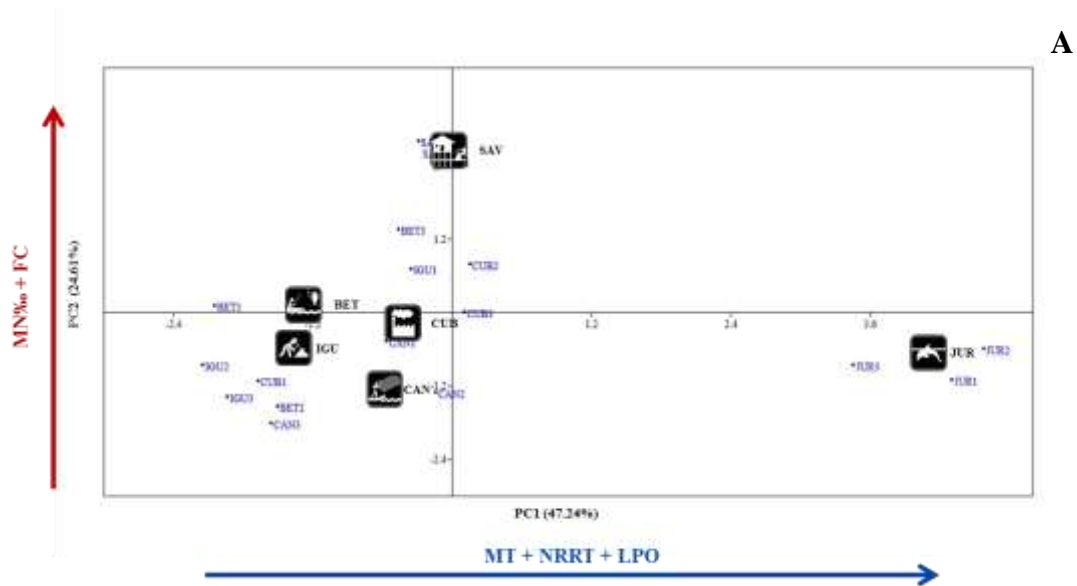


**Figura 7.** Representação gráfica da interação de segunda ordem SxAxT para os dados de níveis de lipoperoxidação nos tecidos retirados de exemplares de *Ucides cordatus*. Onde: JUR, Juréia; CAN, Cananéia; BET, Bertioga; IGU, Iguape; CUB, Cubatão e SAV, São Vicente; CHP, Cumene Hidroperóxido. Linhas verticais indicam intervalo de confiança 95%, marcador quadrado/azul, indica a média dos dados de inverno; marcador vermelho/bola indica a média dos dados de verão. Médias acompanhadas de uma mesma letra não mostram diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ); letras minúsculas indicam dados observados no verão, enquanto letras maiúsculas representam dados obtidos durante o inverno.

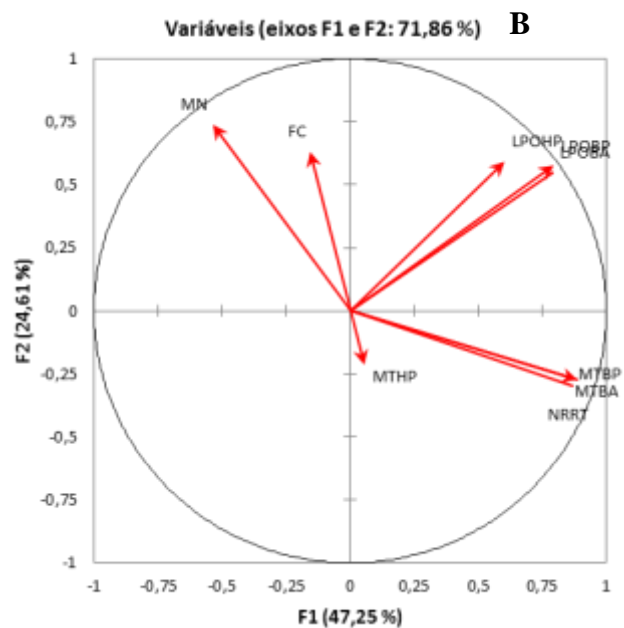


**Figura 8.** Análise de Componentes Principais (PCA) para o período de verão (chuvoso), realizada com as médias dos biomarcadores avaliados para o caranguejo *Ucides cordatus* (MN, micronúcleo; NRRT, vermelho neutro; FC, fator de condição; LPO, lipoperoxidação; e MT, metalotioneína. Com LPO e MT expressos por tecido analisado: BA, brânquia anterior; BP, brânquia posterior; e HP, hepatopâncreas). Onde: **(A)** distâncias de similaridade entre as três réplicas das áreas de manguezal estudadas, com cada ícone localizado no centróide entre as subáreas de cada área de manguezal (BET, Bertioga; CAN, Cananéia; CUB, Cubatão; IGU, Iguape; JUR, Juréia; SAV, São Vicente); e **(B)** posição dos vetores dos biomarcadores em função do primeiro e segundo componente principal (F1 e F2, respectivamente).





**Figura 9.** Análise de Componentes Principais (PCA) para o período de inverno (estiagem), realizada com as médias dos biomarcadores avaliados para o caranguejo *Ucides cordatus* (MN, micronúcleo; NRRT, vermelho neutro; FC, fator de condição; LPO, lipoperoxidação; e MT, metalotioneína. Com LPO e MT expressos por tecido analisado: BA, brânquia anterior; BP, brânquia posterior; e HP, hepatopâncreas). Onde: (A) distâncias de similaridade entre as três réplicas das áreas de manguezal estudadas, com cada ícone localizado no centróide entre as subáreas de cada área de manguezal (BET, Bertioga; CAN, Cananéia; CUB, Cubatão; IGU, Iguape; JUR, Juréia; SAV, São Vicente); e (B) posição dos vetores dos biomarcadores em função do primeiro e segundo componente principal (F1 e F2, respectivamente).



#### 4. Discussão

O emprego de um conjunto de biomarcadores tem como objetivo principal a detecção precoce de alterações em processos bioquímicos e moleculares, que podem modificar funções metabólicas dos organismos expostos permanentemente à uma miríade de poluentes (Rainbow 2007). Neste cenário, são comuns os danos subletais, que não levam à imobilidade imediata ou óbito, mas trazem consequências em longo prazo: (1) ao nível individual (p. ex., pela modificação na permeabilidade de membranas celulares, alteração ou inibição de enzimas que participam de processos reguladores, alterações ou quebras de DNA, entre outros); (2) ao nível populacional (p. ex., pelas alterações no recrutamento de juvenis, reprodução, migração e mortalidade); e (3) até níveis de comunidades (p. ex., com alterações na cadeia alimentar e diversidade de espécies) (Connell & Miller 1984; Adams et al. 1989; McGeer et al. 2000; Amiard-Triquet et al. 2011).

Recentemente, os mecanismos fisiológicos e bioquímicos de detoxificação têm sido estudados em populações de *Ucides cordatus* provenientes de áreas impactadas (Harris & Santos 2000; Pedale et al. 2012; Ortega et al. 2016). Nos crustáceos decápodos, grupo que inclui os caranguejos, há relação estreita entre as vias de contato das espécies com os compartimentos ambientais e seu estado de contaminação, embora pouco se saiba, ainda, sobre muitos dos mecanismos de entrada dos contaminantes, seja pela ingestão de alimento contaminado ou apenas por seu contato com o sedimento (Harris & Santos 2000; Díaz-Jaramillo et al. 2013; Vilhena et al. 2013). Todavia, é reconhecido o papel das proteínas de baixo peso molecular, como as metalotioneínas, que são sintetizadas na presença de alguns metais pesados, sendo registradas em teores mais elevados nos organismos que têm suas células estimuladas por maiores concentrações de Cu, Cd, Zn e Hg (Viarengo 1989). Essas proteínas podem se ligar a esses metais e imobilizá-los no organismo, seguindo duas vias: (1) excreção direta, através da ação de lisossomos com sequestro por vacúolos específicos (Ahearn et al. 2004); ou (2) síntese de grânulos amorfos temporários, que são transportados para áreas específicas de detoxificação como o epitélio do intestino ou a glândula do intestino médio – o hepatopâncreas (Hopkin & Nott 1979; Corrêa-Junior et al. 2000).

O contato prolongado com xenobióticos pode causar agressões ao organismo, que desencadeia alterações às membranas celulares, como por exemplo, em sua permeabilidade, trazendo redução da seletividade, lesões fisiológicas e ao DNA. 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). Quando há

a exaustão ou o enfraquecimento por exposição permanente deste sistema de detoxificação, os danos fisiológicos se instalam, causando erosão genética, comprometendo a resiliência dos organismos em responder às pressões do meio (Bijlsma & Loeschcke 2012).

Os micronúcleos são fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que no momento da divisão celular, afetados por agentes clastogênicos, não são incorporados devidamente à célula-filha (Heddle et al. 1983). O uso da frequência de micronúcleos como uma evidência de efeito genotóxico, que denuncia a presença de compostos de efeito clastogênico no ambiente, tem sido utilizado com sucesso para *Ucides cordatus*, que tem se mostrado uma espécie sensível geneticamente (Pinheiro & Toledo 2010; Pinheiro et al. 2013; Duarte et al. 2016). No presente estudo destacaram-se o contraste entre áreas historicamente contaminadas (São Vicente e Cubatão) em relação àquelas com menor impacto antrópico (Cananéia e Juréia). Animais provenientes de áreas com maior adensamento populacional, com problemas de urbanidade e industrialização (Cubatão, São Vicente e Bertioga) apresentaram animais com uma frequência de células micronucleadas cerca de 49% superior àqueles provenientes de áreas mais ao sul, que se encontram em unidades de conservação (Cananéia, Iguape e Juréia). Apesar de terem sido registrados os maiores valores no período chuvoso (verão), não houve diferença sazonal significativa, revelando que, neste caso, a contaminação local é mais preponderante no efeito genotóxico. Pinheiro et al. (2013), Pinheiro & Toledo (2010) e Duarte et al. (2016) relacionaram a presença da contaminação ambiental local ao aumento da genotoxicidade, bem como alterações morfológicas em *Ucides cordatus*. Importante destacar a existência de relatos anteriores confirmando o incremento da média de micronúcleos durante o verão, para algumas espécies de peixes estuarinos, particularmente da classe Actinopterygii (Andrade et al. 2004; Çavas & Ergene-Gozukara 2005; Kirschbaum et al. 2009; Fuzinato et al. 2013).

O ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro trata dos danos fisiológicos à membrana lisossômica, que ocorrem pelo ataque constante de radicais livres, prejudicando sua permeabilidade e causando alterações à sua estrutura (Lowe et al. 1995). No caso da citotoxicidade, os animais provenientes de uma estação ecológica (Juréia), por ser um ambiente prístino, apresentam melhores índices (130,6±50,9 min.) do que aqueles que vivem em locais submetidos a constante pressão, como os caranguejos de Cubatão e São Vicente gerando os menores tempos de retenção do vermelho neutro (39,8±13,8 e 34,0±19,5 min., respectivamente). A contaminação ambiental tem influência sobre as membranas celulares, e segundo Ortega et al. (2016), os animais expostos cronicamente desenvolvem mecanismos de defesa, que incluem o acúmulo intracelular de metais como o cádmio, e o aumento do estresse



oxidativo lipídico. Vale ressaltar que Duarte et al. (2016) alcançaram resultados similares para o tempo de retenção do vermelho neutro, em que células de caranguejos da Juréia e Cananéia, que mantiveram sua performance celular e integridade lisossomal em até duas horas após a exposição inicial ao corante. Sabe-se da plasticidade do ensaio vermelho neutro em responder efetivamente a impactos citotóxicos frente à contaminações de diversas origens (orgânicas ou inorgânicas) (Svendsen et al. 2004). Assim, observou-se, também, uma diferença sazonal significativa em 67% das áreas de manguezal estudadas (Cananéia, Bertioga, Iguape e São Vicente), evidenciando uma tendência de alteração sazonal em áreas de manguezal pertencentes a grandes sistemas estuarinos (Estuário de Cananéia-Iguape-Peruíbe, CIP; e Estuário de Santos-São Vicente, STS-SV). Provavelmente isto ocorra devido à potencialização dos efeitos de estressores de várias origens, somados ao estresse natural causado pela redução do volume hídrico durante a estiagem. Estes resultados se coadunam com o histórico de contaminação de cada área de manguezal, sendo evidenciada, inclusive, uma correlação negativa significativa entre genotoxicidade e citotoxicidade, além de mostrar resultados similares quanto à indicação de áreas mais degradadas ou conservadas.

No presente estudo, os valores obtidos para o fator de condição foram muito semelhantes aos resultados encontrados por Pinheiro & Fiscarelli (2009) e Pinheiro et al. (2005) para *Ucides cordatus*, bem como para o caranguejo de água-doce *Dilocarcinus pagei*, estudado por Pinheiro & Taddei (2005). No caso de *U. cordatus*, Pinheiro & Fiscarelli (2009) observaram um decréscimo do fator de condição nos meses mais frios e secos (inverno), pela proximidade do processo de muda, quando o animal cessa sua alimentação; ao contrário, ocorre elevação dos valores deste parâmetro de dezembro a março (verão), período em que a espécie investe na reprodução (maturação gonadal e exteriorização da massa ovígera). Os dados obtidos no presente estudo corroboram aqueles de Duarte et al. (2016) para o inverno, que mencionam o reduzido valor explicativo deste parâmetro, sendo que o presente estudo revela que tal aspecto independe da estação climática (verão ou inverno), quando utilizado em conjunto com outros biomarcadores.

Estudos com invertebrados demonstram que as metalotioneínas (MTs) têm fundamental papel na detoxificação imediata do excedente de metais (essenciais e não essenciais) com os quais o organismo tem contato, tendo uma atuação crítica à homeostase celular (Legras et al. 2000, Amiard et al. 2006). Além disso, as MTs também têm propriedades anti-oxidativas (Viarengo et al. 1999), sendo sua concentração influenciada por fatores biológicos e ambientais, como processos fisiológicos e mudanças de salinidade (Ivankovic et al. 2005). Importante mencionar que *U. cordatus* é uma espécie sujeita a uma

ampla variação da salinidade, particularmente considerando a proximidade da foz estuarina e penetração da cunha salina no estuário. O caranguejo-uçá é conhecido como uma espécie hipo-hiper-reguladora, que possui um eficiente sistema osmorregulador, fornecendo equilíbrio homeostático à concentração de sais em sua hemolinfa, mesmo em salinidades variando entre 2 e 33, que alteram a afinidade e velocidade da entrada de substâncias químicas (Martinez et al. 1998; Leite & Zanotto 2013). Além disso, Amiard et al. (2006) ressaltam que, por conta da variabilidade de possíveis indutores à produção das metalotioneínas, é relevante comparar populações cronicamente expostas à contaminantes metálicos (p. ex., de São Vicente e Cubatão), em função dos registros históricos de contaminação ambiental (César et al. 2006; Abessa & Ambrozevicius 2008; Carmo et al. 2011), com populações oriundas de manguezais onde a contaminação é reduzida (ou ausente), como a Juréia (Pinheiro et al. 2013; Duarte et al. 2016). No presente estudo, assim como naquele desenvolvido por Ortega et al. (2016), os níveis de concentração de metalotioneína para *Ucides cordatus* foram mais elevados para a Estação Ecológica da Juréia em todos os tecidos, em comparação com as demais áreas, independente da época do ano (chuvosa ou seca). Apesar de tais resultados fugirem ao padrão esperado, que seria registrar maiores concentrações de metalotioneínas em animais que vivem em áreas contaminadas por metais, o mesmo já foi relatado, anteriormente, para os caranguejos *Pachygrapsus marmoratus* e *Carcinus maenas* (Pedersen & Lundebye 1996; Pedersen & Bjerregaard 2000; Legras et al. 2000). Concordamos com a hipótese levantada em Ortega et al. (2016) para este fato, que encontra explicação em modificações fisiológicas desta espécie quando proveniente de áreas poluídas e sob constante pressão, permitindo sua sobrevivência sem um aumento desnecessário na síntese de metalotioneínas, que causaria elevação do estresse fisiológico, o que, em tese, não ocorreria em caranguejos oriundos de manguezais não impactados por metais. Segundo Amiard et al. (2006), em ambientes poluídos, os animais são expostos à uma gama de diferentes metais e compostos químicos, sendo crucial à sua sobrevivência uma adaptação à exposição crônica, daí as discrepâncias entre resultados na literatura para análises ambientais inter e intra-específicas. A despeito deste fato, as concentrações de metalotioneínas foram significativamente mais elevadas ( $p < 0,05$ ) em todas as áreas de manguezal estudadas durante o verão (época chuvosa). Entretanto, esta sazonalidade evidenciada na produção de metalotioneínas, é dependente da síntese desta proteína, que pode apresentar flutuações naturais como verificado por Bocchetti & Regoli (2006) em uma espécie de mexilhão (*Mytillus galloprovincialis*). Maiores concentrações de metalotioneínas no verão, principalmente associadas às glândulas digestivas, já foram descritas para outros organismos utilizados como testemunho de qualidade

ambiental, principalmente espécies de moluscos (Viarengo et al. 1997; Bocchetti & Regoli 2006; Lavradas et al. 2016). Em geral, nossos resultados confirmam resultados obtidos em estudos anteriores, os quais indicam que a temperatura e o período reprodutivo podem proporcionar flutuações sazonais das defesas antioxidantes (Orbea et al. 2002; Lavradas et al. 2016). Sabe-se que o caranguejo-uçá tem seu período reprodutivo associado aos meses de elevação térmica e do fotoperíodo, assim como mais chuvosos (Pinheiro & Fiscarelli 2001; Dalabona et al. 2005), o que explicaria a elevação desta proteína utilizada como biomarcador neste período. Além disso, Engel & Brouwer (1993) sugerem que flutuações naturais dos níveis de metalotioneínas em crustáceos podem ocorrer, devido, principalmente, à sua participação no sistema regulador de Cu/Zn –MT em cada fase de muda, decaindo na fase de pré-ecdise. A presença de poluentes, neste caso, poderia potencializar a modulação das oscilações sazonais de antioxidantes, induzindo diferentes respostas a partir de locais poluídos e não poluídos (Bocchetti & Regoli 2006). Assim, é de extrema importância a compreensão da função e variabilidade natural das metalotioneínas em crustáceos, para que possa ser validado como um indicador de qualidade ambiental (Engel & Brower 1983).

Outro aspecto relevante foram os valores registrados em todas as áreas de amostragem do presente estudo, que independente da estação climática demonstraram a seguinte ordem decrescente para a concentração de metalotioneína nos órgãos, com diferenças entre eles: hepatopâncreas > brânquia posterior > brânquia anterior. Os tecidos que apresentam envolvimento direto na captação, armazenamento e excreção, têm maior capacidade para a síntese de metalotioneínas (Amiard et al. 2006). Desta forma, é compreensível uma maior concentração de metalotioneínas no hepatopâncreas de *Ucides cordatus* do que nas brânquias, por se tratar do principal órgão de detoxificação em crustáceos. O mesmo foi observado para esta espécie por Ortega et al. (2016), independente do estado de poluição do manguezal; para o portunídeo *Carcinus maenas* por Pedersen et al. (1997); e para a lagosta *Nephrops norvegicus* por Canli et al. (1997). Quanto à diferença de concentrações entre as brânquias, os resultados indicaram a brânquia posterior, de função osmorregulatória (Martinez et al. 1999), como o segundo tecido de maior concentração de MTs e, portanto, com relevante papel na detoxificação deste animal hiper-hiporegulador. Análises de organelas e vacúolos no citoplasma das células de brânquias posteriores de *U. cordatus* sugerem seu importante papel no sequestro e imobilização de metais tóxicos ao organismo, como verificado para o cádmio por Ortega et al. (2014, 2016).

A lipoperoxidação (LPO) se caracteriza como evidência da injúria causada pelos radicais livres aos sistemas biológicos (Zwart et al. 1999), trazendo consequências em longo

prazo para os organismos. Assim, a peroxidação de lipídios nas células é um processo que altera a permeabilidade das membranas celulares, a oxidação de proteínas, bem como pode acarretar em alterações nos ácidos nucleicos, induzindo às lesões genômicas (Halliwell & Guttridge 2007). Neste trabalho, foram observados maiores valores de peroxidação lipídica durante o inverno, sem que ocorresse um padrão definido no confronto entre áreas de manguezal com distintos níveis de poluição. Durante o inverno as brânquias anteriores apresentaram maiores valores do que aqueles registrados nas brânquias posteriores e, ademais, o hepatopâncreas foi caracterizado pelos maiores níveis de LPOs, independente da estação climática. Nas brânquias anteriores, que têm como função prioritária a respiração (Martinez et al. 1999), a elevada concentração de oxigênio pode produzir radicais livres, elevando o processo de peroxidação lipídica (Wang et al. 2013). Além disso, por ser um órgão sensível, apresentando contato primário com a água, está mais suscetível às alterações neste meio (Maciel et al. 2010). No caso do hepatopâncreas, por ter como uma de suas funções a detoxificação, valores mais pronunciados eram esperados, o que foi confirmado para *U. cordatus* (Ortega et al. 2016) e *Lithodes santola* (Schvezov et al. 2015). Estudos anteriormente realizados com crustáceos e peixes indicaram que o estresse oxidativo também pode ser induzido por baixas temperaturas (Niyogi et al. 2001; Wang et al. 2006; Qiu et al. 2011), uma vez que a atividade enzimática sofre prejuízos em tal situação.

Considerando que a sazonalidade impõe pressões sobre a biota (p. ex., por alterações térmicas e de pH da água), concomitantemente, ocorrem importantes alterações no comportamento e vias de entrada de substâncias xenobióticas nos organismos. Assim, foi realizada uma análise multi-níveis de impacto no caranguejo-uçá (fisiológico, celular, genético e populacional), adicionando um rol de testes sensíveis à contaminação local, que são relevantes ao entendimento sobre o estado de conservação dos manguezais avaliados. Os agrupamentos realizados pela PCA demonstram duas situações contrastantes quanto à associação das respostas dos biomarcadores com as áreas de manguezal estudadas em função da sazonalidade. Mais uma vez é importante ressaltar que a intensificação dos danos genéticos e reduzida integridade fisiológica podem ser resultado do efeito sinérgico entre os poluentes característicos de cada área de manguezal, considerando seu histórico de contaminação (Gutberlet 1996). O histórico de contaminação das áreas de manguezal do litoral centro e sul do Estado de São Paulo é bem evidente, sendo mais contaminado na região central e prístino na região sul (Duarte et al. 2016), possibilitando uma ótima avaliação por PCA usando os vetores dos biomarcadores em uso na análise multi-nível.

Os resultados desta análise multivariada indicam que o hepatopâncreas foi o melhor tecido bioindicador de contaminação ambiental, devido à sua sensibilidade quando se trata de metalotioneínas e lipoperoxidação. Além disso, sob a mesma análise, recomendamos o uso deste conjunto de biomarcadores durante o período de estiagem (inverno) quando as respostas aos impactos são minoradas, já que não há a interferência de outras fontes estressoras, como o período reprodutivo desta espécie, que ocorre nos meses de verão. Segundo Lavradas et al. (2016) os esforços reprodutivos podem gerar Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), já que há um aumento da atividade metabólica e, portanto, maior suscetibilidade a certos fatores abióticos, como a hipertermia, estresse hiposmótico, entre outros.

Os danos às membranas celulares, causado pelos radicais livres acarretam alterações estruturais e de permeabilidade, resultando em apoptose celular. A peroxidação lipídica está associada ao envelhecimento e às neoplasias malignas, assim como podem ter relação à toxicidade promovida pelos poluentes (Ferreira & Matsubara 1997). A variação da concentração de LPOs e MTs, observada no presente estudo, pode não ser explicada somente pela concentração de metais e substâncias xenobióticas presentes nos manguezais, devendo ser consideradas com precaução, a luz do conhecimento da variabilidade natural destes biomarcadores para o caranguejo-uçá (*U. cordatus*). Neste sentido, as informações obtidas fornecem subsídios ao monitoramento ambiental, abrindo a possibilidade de refinar e fortalecer seu uso em pacotes tecnológicos de classificação do status de conservação de áreas de manguezal.

## 5. Conclusão

- O trabalho permitiu a validação deste pacote de biomarcadores (teste micronúcleo, ensaio vermelho neutro, metalotioneína e lipoperoxidação), bem como do caranguejo *Ucides cordatus* como espécie-testemunho de qualidade ambiental de manguezais com diferentes quadros de contaminação ambiental;
- As técnicas de vermelho neutro e da estimativa de concentração de metalotioneínas demonstraram sensibilidade sazonal, tendo resultados expressivos;
- Dentre os órgãos utilizados, o hepatopâncreas foi o mais sensível e responsivo às técnicas utilizadas, enquanto não houve diferença quanto ao uso da brânquia anterior (respiratória) ou posterior (osmorregulatória);

- Este trabalho informa sobre o melhor aproveitamento deste pacote de biomarcadores durante o inverno (estiagem), quando há menor interferência de fontes estressoras diversas, como a reprodução da espécie, que é sazonal (verão).

## 6. Bibliografia

- Abessa, D.M.S. & Ambrozevicius, A.P. (2008) *Poluição aquática e tratamento de esgotos*, Cap.04, 41–54p. In:Oliveira, A.J.F.C., Pinheiro, M.A.A., Fontes, R.F.C. (Orgs.). *Panorama Ambiental da Baixada Santista*. Universidade Estadual Paulista –Campus Experimental do Litoral Paulista, 1ªEdição, ISBN 978-85-61498- 02-3, SãoVicente (SP), 127p.
- Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley Jr, M.S., Jimenez, B.D., Ryon, M.G., Shugart, L.R., McCarthy, J.F. (1989) The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research*, 28, 459-464.
- Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A. (2014) Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 174, 439-452.
- Alfredini, P., Arasaki, E., Pezzoli, A., Fournier, C. P. (2013) Impact of climate changes on the Santos Harbor, São Paulo State (Brazil). *The International Journal on Marine Navigation and Safety of Sea Transportation*, 7(4), 609-617.
- Almeida, E.V., Kutter, V.T., Marques, E.D., Silva-Filho, E.V. (2016) First assessment of trace metal concentration in mangrove crab eggs and other tissues, SE Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, doi:10.1007/s10661-016-5413-1
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G (2013) Koppen's climate change classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711-728.
- Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (2011) (eds.). *Tolerance to Environmental Contaminants*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, S. (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76, 160-202.

- Anderson, M.J., Ellingsen, K.E., McArdle, B.H. (2006) Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology Letters*, 9, 683-693.
- Andrade, V.M., Silva, J., Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L., Freitas, T.R.O. (2004) Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two Southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(5), 459-468.
- Araújo-Jr, 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 in *Ucides cordatus* crab in the fractionation and bioavailability of trace metals in tropical semiarid mangroves. *Marine Pollution Bulletin*, 111(1-2), 194-202.
- Azevedo, F.A. & Chasin, A.A.M. (2003) *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. São Carlos: Rima. 322 p.
- Azevedo, J.S., Braga, E.S., Ribeiro, C.A.O. (2012) Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on southeastern Brazilian coast. *Brazilian Journal of Oceanography*, 60(3), 323-330.
- Baptista, B.W.M. & Vieira, L.G.S. (2014) A cultura como ferramenta de manutenção das raízes caiçaras da Juréia. *Revista Observatório da Diversidade Cultural*, 1(1), 78-89.
- Bijlsma, R. & Loeschcke, V. (2012) Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evolutionary Applications*, 5(2), 117-129.
- Bocchetti, R. & Regoli, F. (2006) Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere*, 61, 913-921.
- Canli, M., Stagg, R.M., Rodger, G. (1997) The induction of metallothionein in tissues of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to cadmium, copper and zinc: the relationships between metallothionein and the metals. *Environmental Pollution*, 96(3), 343-350.
- Carmo, C.A., Abessa, D.M., Neto, J.G.M. (2011) Metais em águas, sedimentos e peixes coletados no estuário de São Vicente-SP, Brasil. *O Mundo da Saúde*, 35(1), 64-70.

- Çavas, T. & Ergene-Gozukara, S. (2005) Micronucleus test in fish cells: a bioassay for *in situ* monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 64-70.
- Cesar, A., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Abessa, D.M.S., Fernández, N., Choueri, R.B., Delvalls, T.A. (2006) Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente Estuarine System-Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 54(1), 55-63.
- 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.
- Collaço, F.L., Sartor, S.M., Barbieri, E. (2015a) Cultivo de bijupirá (*Rachycentron canadum*) em Cananeia, SP, Brasil. Avaliação da viabilidade utilizando geoprocessamento. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 15(2), 277-289.
- Collaço, F.L., Sartor, S.M., Barbieri, E. (2015b) Uso do geoprocessamento para definição de áreas de cultivo de ostras na região estuarina de Cananéia, São Paulo, Brasil. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 15(2), 193-207.
- Connell, D.W. & Miller, G.J. (1984) *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. John Wiley & Sons: New York, 444.
- Corrêa-Junior, J.D., Allodi, S., Amado-Filho, G.M., Farina, M. (2000) Zinc accumulation in phosphate granules of *Ucides cordatus* hepatopancreas. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 217-221.
- Costa, C.R., Olivi, P., Botta, C.M.R., Espindola, E.L.G. (2008) Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods. *Química Nova*, 31(7), 1820-1830.
- Countryman, P.I. & Heddle, J.A. (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, 41, 321-332.
- Dalabona, G., Loyola e Silva, J., Pinheiro, M.A.A. (2005) Size at morphological maturity of *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae) in the Laranjeiras Bay, Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(1), 139-145.
- Díaz-Jaramillo, M., Socowsky, R., Pardo, L.M., Monserrat, J.M., Barra, R. (2013) Biochemical responses and physiological status in the crab *Hemigrapsus crenulatus*



(Crustacea, Varunidae) from high anthropogenically-impacted estuary (Lenga, south-central Chile). *Marine Environmental Research*, 83, 73-81.

Diele, K. & Smith, D.J.B. (2007) Effects of substrata and conspecific odour on the metamorphosis of mangrove crab megalopae, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 348, 174-182.

Duarte, L.F.A., Duran, R.S., Mendonça, J.T., Pinheiro, M.A.A. (2014) The fishery for the 'uçá'- crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) in a mangrove area in Cananéia, State of São Paulo, Brazil. I. Fishery performance, exploitation patterns and factors affecting the catches. *Brazilian Journal of Oceanography*, 62(3), 187-199.

Duarte, L.F.A., Souza, C.A., Nobre, C.R., Pereira, C.D.S., Pinheiro, M.A.A. (2016) Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove áreas from the western atlantic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 176-187.

Duke, N.C., Meynecke, J.O., Dittmann, S., Ellison, A.M., Anger, K., Berger, U., Cannicci, S., Diele, K., Ewel, K.C., Field, C.D., Koedman, N., Lee, S.Y., Marchand, C., Nordhaus, I., Dahdouh-Guebas, F. (2007) A world without mangroves? *Science*, 317, 41-43.

Eichler, P.P.B., Eichler, B.B., David, C.J., Miranda, L.B., Sousa, E.C.P.M. (2006) The estuary ecosystem of Bertioga, São Paulo, Brazil. *Journal of Coastal Research*, 39, 1110-1113.

Engel, D.W. & Brouwer, M. (1993) Crustaceans as models for metal metabolism: I. Effects of the molt cycle on blue crab metal metabolism and metallothionein. *Marine Environmental Research*, 35, 1-5.

Environment Canada (1999a) Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Summary Tables. (<http://www.ec.gc.ca>).

Environment Canada (1999b) Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Summary Tables. (<http://www.ec.gc.ca>).

FDEP (1994) Approach to the assessment of sediment quality in Florida coastal waters. Vol.1 Development and evaluation of sediment quality assessment guidelines. Prepared for Florida Department of Environmental Protection, Office of Water Policy, Tallahassee, FL, by MacDonald Environmental Sciences Ltd., Ladysmith, British Columbia.

- Ferreira, A.L.A. & Matsubara, L.S. (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43(1), 61-8.
- Fiscarelli, A.G. & Pinheiro, M.A.A. (2002) Perfil socioeconômico e conhecimento etnobiológico do catador de caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) nos manguezais de Iguape (24°41'S), SP, Brasil. *Actualidades Biológicas*, 24(77), 129-142.
- Fuzinato, C.F., Flohr, L., Melegari, S.P., Matias, W.G. (2013) Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 103-109.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B. (2016) Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 113, 31-38.
- Gianesella, S.M.F., Saldanha-Correa, F., Teixeira, C. (2000) Tidal effects on nutrients and phytoplankton distribution in Bertioga Channel, Sao Paulo, Brazil. *Aquatic Ecosystem Health and Managements*, 3, 533-544.
- Gutberlet, J. (1996) *Cubatão: Desenvolvimento, Exclusão Social e Degradação Ambiental*. Editora da Universidade de São Paulo, FAPESP. 244p.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*. 4ª edição, Oxford, UK: Clarendon Press.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1-9.
- Harris, R.R. & Santos, M.C.F. (2000) Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology*, 137, 691-703.
- Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W., Salamone, M.F. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 123, 61-118.

- 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 Biology & Medicine*, 19, 271-280.
- Hopkin, S.P. & Nott, J.A. (1979) Some observations on the concentrically structured intracellular granules in the hepatopancreas of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 59(4), 867-877.
- Hypolito, R., Nascimento, S.C., Gamito, D.C., Sumi, E.M. (2016) Ionic behavior and its association with waste steel industry in mangrove estuarine system of Santos-Cubatão/SP. *Geociências*, 35(2), 172-182.
- IBGE (2012) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil. Censo Demográfico 2012. Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)> (Acessado em 29/08/2016).
- Ihaka, G. & Gentleman, R. (1996) R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5(3), 299-314.
- Ivankovic, D., Pavicic, J., Erk, M., Filipovic-Marijic, V., Raspor, B. (2005) Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: seasonal and spatial variability. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 1303-1313.
- Jaramillo-Díaz, M., Socowsky, R., Pardo, L.M., Monserrat, J.M., Barra, R. (2013) Biochemical responses and physiological status in the crab *Hemigrapsus crenulatus* (Crustacea, Varunidae) from high anthropogenically-impacted estuary (Lenga, south-central Chile). *Marine Environmental Research*, 83, 73-81.
- 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. *Analytical Biochemistry*, 202, 384-389.
- Jiang, Z.Y., Woolard, A.C.S., Wolff, S.P. (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and iodometric method. *Lipids*, 26, 853-856.
- Kirschbaum, A.A., Seriani, R., Pereira, C.D.S., Assunção, A., Abessa, D.M.S., Rotundo, M.M., Ranzani-Paiva, M.J.T. (2009) Cytogenetic biomarkers in fat snook *Centropomus*

*parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 32(1), 151-154.

Lavradas, R.T., Rocha, R.C.C., Bordon, I.C.A.C., Saint’Pierre, T.D., Godoy, J.M., Hauser-Davis, R.A. (2016) Differential metallothionein, reduced glutathione and metal levels in *Perna perna* mussels in two environmentally impacted tropical bays in southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 129, 75-84.

Legendre, P. & Gallagher, E.D. (2001) Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129, 271-280.

Legras, S., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Rainbow, C. (2000) Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *Journal of Experimental Marine Biology*, 246, 259-279.

Leite, V.P. & Zanotto, F.P. (2013) Calcium transport in gill cells of *Ucides cordatus*, a mangrove crab living in variable salinity environments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 166, 370-374.

Lima, E.S. & Abdalla, D.S.P. (2001) Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 293-303.

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 study. *Marine Ecology Progress Series*, 129, 189-196.

Maciel, F.E., Rosa, C.E., Santos, E.A., Monserrat, J.M., Nery, L.E.M. (2010) Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Canadian Journal of Zoology*, 82, 1871-1877.

Mahiques, M.M., Burone, L., Figueira, R.C.L., Lavenère-Wanderley, A.A.O., Capellari, B., Rogacheski, C.E., Barroso, C.P., Santos, L.A.S., Cordero, L.M., Cussioli, M.C. (2009) Anthropogenic influences in a lagoonal environment: a multiproxy approach at the Valo Grande Mouth, Cananéia-Iguape System (SE, Brazil). *Brazilian Journal of Oceanography*, 57(4), 325-337.

- Mahiques, M.M., Figueira, R.C.L., Salaroli, A.B., Alves, D.P.V., Gonçalves, C. (2013) 150 years of anthropogenic metal input in a biosphere reserve: The case study of the Cananéia–Iguape coastal system, southeastern Brazil. *Environmental Earth Science*, 4(68), 1073-1087.
- Martinez, C.B.R., Alvares, E.P., Harris, R.R., Santos, M.C.F. (1999) A morphological study on posterior gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. *Tissue & Cell*, 31, 380-389.
- Martinez, C.B.R., Harris, R.R., Santos, M.C.F. (1998) Transepithelial potential differences and sodium fluxes an isolated perfused gills of mangrove crab *Ucides cordatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120, 227-236.
- Martins, C.C., Bicego, M.C., Mahiques, M.M., Figueira, R.C.L., Tessler, M.G., Montone, R.C. (2011) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil): Sources and depositional history. *Marine Pollution Bulletin*, 63, 452-458.
- 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. Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, 50, 231-243.
- Mello, K., Toppa, R.H., Abessa, D.M.S., Castro, M. (2013) Dinâmica de expansão urbana na zona costeira brasileira: o caso do município de São Vicente, São Paulo, Brasil. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 13(4), 539-551.
- Mendonça, J.T. (2015) Characteristics of small-scale fishing on the south coast of São Paulo (Brazil). *Boletim do Instituto de Pesca*, 41(3), 479-492.
- Moreira, A., Figueira, E., Amadeu, M.V.M., Soares, R.F. (2016) Salinity influences the biochemical response of *Crassostrea angulate* to Arsenic. *Environmental Pollution*, 214, 756-766.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G. (2001) Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 52, 13–26.
- Noori, A., Moghaddam, P., Kamrani, E., Akbarzadeh, A., Neitali, B.K., Pinheiro, M.A.A. (2015) Condition factor and carapace width versus wet weight relationship in the blue swimming crab *Portunus segnis*. *Animal Biology*, 65(2), 87-89.

- 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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 379, 104-112.
- Nudi, A.H., Wagener, A.L.R., Francioni, E., Sette, C.B., Sartori, A.V., Scofield, A.L. (2010) Biomarkers of PAH exposure in crabs *Ucides cordatus*: laboratory assay and field study. *Environmental Research*, 110, 137-145.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'hara, R.B., Stimpson, G.L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Szoecs, E., Wagner, H. 2016. Vegan: Community Ecology Package – Version 2.4-1. <[cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf](http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf)> (Acessado em 07/10/2016).
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Sole, M., Porte, C., Cajaraville, M.P. (2002) Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology*, 58, 75-98.
- Ortega, P., Custódio, M.R., Zanotto, F.P. (2014) Characterization of cadmium plasma membrane transport in gills of a mangrove crab *Ucides cordatus*. *Aquatic Toxicology*, 157, 21-29.
- Ortega, P., Vitorino, H.A., Moreira, R.G., Pinheiro, M.A.A., Almeida, A.A., Custódio, M.R., Zanotto, F.P. (2016) Physiological differences in the crab *Ucides cordatus* from two populations inhabiting mangroves with different levels of cadmium contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, doi: 10.1002/etc.3537
- Pavlica, M., Podrug, M., Stambuk, A., Cvjetko, P., Klobucar, G.I.V. (2008) Seasonal variability in micronuclei induction in haemocytes of mussels along the Eastern Adriatic Coast. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17(5), 765-771.
- Pedale, A.B., Fujimoto, R.Y., Santos, R.F.B., Abrunhosa, F.A. (2012) Acute toxicity of sodium metabisulphite on mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda, Ucididae). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 84(4), 1009-1014.
- Pedersen, S.N. & Lundebye, A.K. (1996) Metallothionein and stress protein levels in shore crabs (*Carcinus maenas*) along a trace metal gradient in the Fal Estuary (UK). *Marine Environmental Research*, 42(1-4), 241-246.

- Pedersen, S.N., Lundebye, A.K., Depledge, M.H. (1997) Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquatic Toxicology*, 37, 183-200.
- Pedersen, T.V. & Bjerregaard, P. (2000) Cadmium influx and eflux across perfused gills of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Aquatic Toxicology*, 48, 223-231.
- Piazza, V., Gambardella, C., Canpea, S., Costa, E., Faimali, M., Garaventa, F. (2016) Temperature and salinity effects on cadmium toxicity on lethal and sublethal responses of *Amphibalanus amphitrite nauplii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 123, 8-17.
- Pinheiro, M.A.A. & Fiscarelli, A.G. (2001) *Manual de Apoio à Fiscalização do Caranguejo-Uçá (Ucides cordatus)*. IBAMA / CEPSUL. 43p.
- Pinheiro, M.A.A. & Fiscarelli, A.G. (2009) Length-weight relationship of the carapace and condition factor of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(2), 397-406.
- Pinheiro, M.A.A. & Hattori, G.Y. (2006) Relative growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) at Iguape, São Paulo Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(5), 813-823.
- Pinheiro, M.A.A. & Taddei, F.G. (2005) Relação peso/largura da carapaça e fator de condição em *Dilocarcinus pagei* Stimpson (Crustacea, Trichodactylidae), em São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(4), 825-829.
- Pinheiro, M.A.A. & Toledo, T.R. (2010) Malformation in the crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), in São Vicente, State of São Paulo, Brazil. *Revista CEPSUL Biodiversidade e Conservação Marinha*, 1(1), 61-65.
- 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 tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, 8273-8285.
- Pinheiro, M.A.A., Fiscarelli, A.G., Hattori, G.Y. (2005) Growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Journal of Crustacean Biology*, 25(2), 293-301.

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). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81, 114-121.

Pinheiro, M.A.A., Souza, C.A., Zanotto, F.P.; Torres, R.A., Pereira, C.D.S. (no prelo) The crab *Ucides cordatus* (Malacostraca, Decapoda, Brachyura), and other related taxa as environmental sentinels for assessments and monitoring of tropical mangroves from South America. In: *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Aquatic Models*, Royal Society of Chemistry, London.

Polard, T., Jean, S., Merlina, G., Laplanche, C., Pinelli, E., Gauthier, L. (2011) Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (74), 144-149.

Qiu, J., Wang, W.-N., Wang, L.-J., Liu, Y.-F., Wang, A.-L., (2011) Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology*, 154, 36-41.

Rainbow, P.S. (2007) Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. *Environmental International*, 33, 576-582.

Saifullah, S.M., Khan, S.H., Ismail, S. (2002) Distribution of nickel in a polluted mangrove habitat of the Indus delta. *Marine Pollution Bulletin*, 44(6), 551-576.

Schaeffer-Novelli, Y. (1989). *Perfil dos sistemas litorâneos brasileiros, com especial ênfase sobre o ecossistema manguezal*. São Paulo: Instituto de Oceanografia de SP.

Schaeffer-Novelli, Y. (1995) *Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar*. Caribbean Ecological Research, São Paulo, 64 p.

Schvezov, N., Lovrich, G.A., Florentín, O., Romero, M.C. (2015) Baseline defense system of commercial male king crab *Lithodes santolla* from the Beagle Channel. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 181, 18-26.

Silva, O.R. & Gomes, M.B.M. (2012) Impactos das atividades portuárias no sistema estuarino de Santos. *Revista Metropolitana de Sustentabilidade*, 2(2), 64-81.



Souza-Junior, V.S., Vidal-Torrado, P., Tessler, M.G., Pessenda, L.C.R., Ferreira, T. O., Otero, X.L., Macías, F. (2007) Evolução quaternária, distribuição de partículas nos solos e ambientes de sedimentação em manguezais do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 31, 753-769.

Souza, C.A. & Pinheiro, M.A.A. (submetido) Mangrove conservation monitoring by genocytotoxic biomarkers of the 'uçá'-crab (*Ucides cordatus*): the seasonal effect on micronucleus (MN) and neutral red (NRRT). *Environmental Science and Pollution Research*.

Souza, M.R. & Barrela, W. (2001) The popular knowledge about fish at a "caiçara" community of Juréia-Itatins Ecological Station-SP. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27(2), 123-130.

Svendsen, C., Spurgeon, D.J., Hankard, P.K., Weeks, J.M. (2004) A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 20-29.

Tramonte, K. M., Figueira, R.C.L., Ferreira, P.A.L., Majer, A.P., Batista, M.F., Ribeiro, A.P., Salaroli, A.B., Sartoretto, J.R., Mahiques, M.M. (2016) Evaluation of metals availability in sediments of the Bertioga Channel (Santos Estuarine Complex – SP – Brazil): A tool for chemical pollution monitoring. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, doi: 10.5894/rgci670.

Udechukwu, B.E., Ismail, A., Zulkifli, S.Z., Omar, H. (2014) Distribution, mobility, and pollution assessment of Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, and Fe in intertidal surface sediments of Sg. Puloh mangrove estuary, Malaysia. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4242-4255.

Viarengo, A. (1989) Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences*, 32(10), 754-759.

Viarengo, A. (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44, 69-84.

Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J. (1999) Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *American Journal of Physiology*, 277, 1612-1619.

- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R. (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44, 69-84.
- Vilhena, M.S.P., Costa, M.L., Berredo, J.F. (2013) Accumulation and transfer of Hg, As, Se, and other metals in the sediment-vegetation-human food chain in the coastal zone of the northern Brazilian state of Pará (Amazonia). *Environmental Geochemistry and Health*, 35(4), 477-494.
- Wang, J., Zhang, P., Shen, Q., Wang, Q., Liu, D., Li, J., Wang, L. (2013) The effects of cadmium exposure on the oxidative state and cell death in the gill of freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *PLoS One*, 8,1-9.
- Wang,W.-N.,Wang, A.-L., Liu, Y., Xiu, J., Liu, Z.-B., Sun, R.-Y. (2006) Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture*, 256, 624-630.
- Zwart, L.L., Meerman, J.N.H., Commandeur, J.M.N., Vermeulen, N.P.E. (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radicals and Medicine*, 26, 202-226.

# Capítulo 3

---

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

Em submissão como artigo original ao  
*Journal of Experimental Marine Biology and Ecology (JEMBE)*

## Resumo

Frente aos desafios crescentes que ocorrerão nos ecossistemas pelas alterações climáticas, torna-se de suma importância o conhecimento sobre a vulnerabilidade ou resiliência dos organismos. Espécies endêmicas de ecossistemas mais afetados por eventos climáticos extremos, como os tropicais, acabam por apresentar maior vulnerabilidade nesta situação. Entre os eventos extremos esperados constam as secas, tempestades intensas e aumento da temperatura da água do mar, mas pouco se conhece sobre os impactos que causarão às comunidades. Assim, realizou-se um experimento térmico, compreendendo teste agudo (horas) e crônico (dias), pela manutenção de espécimes de *Ucides cordatus* sob alta temperatura constante ( $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), 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 (vermelho neutro), porém sem maiores diferenças quanto aos níveis de lipoperoxidação no hepatopâncreas e brânquias. Os dados de estresse térmico produzidos são inéditos para a espécie, levantando a possibilidade de ampliação desse tipo de experimento, com aumento dos tempos de exposição e temperatura.

**Palavras-chave:** biomarcadores, Decapoda, mudanças climáticas, temperatura, *Ucides cordatus*.

## Introdução

O descarte incorreto de compostos tóxicos, a ocupação desenfreada das zonas costeiras, e o escoamento superficial de áreas em que ocorrem aplicações regulares de pesticidas e fertilizantes, podem causar grande impacto aos ambientes aquáticos, assim como causar prejuízos aos organismos que ali vivem (Peters et al., 1997; Tomita e Beyruth, 2005; Arenas-Sánchez et al., 2016). Aliado a esses estressores difusos, existem outras formas de pressão sobre os ecossistemas, como aqueles resultantes de elevação da temperatura global, intensificados pelo aumento da emissão de gases do efeito estufa (dióxido de carbono, metano e óxido nitroso). Tais características trazem consigo alterações dramáticas aos padrões de precipitação, elevação térmica superficial dos oceanos, aumento do nível do mar, derretimento de calotas polares, entre outros (IPCC, 2014). Neste sentido, projeções realizadas por Magrin et al. (2014) e IPCC (2014), evidenciam um aumento térmico expressivo na América do Sul até o final deste século, principalmente na água, em média de 2,5°C/ano, trazendo prejuízos à vários ambientes. Por sua vez, tais alterações térmicas aumentarão a frequência de eventos climáticos extremos, entre eles o aumento ou deslocamento temporal dos períodos de seca, inundações severas e incremento na intensidade de tempestades (IPCC, 2007).

Nas áreas costeiras são esperadas variações na salinidade da água (Lee et al., 2011), aumento da sedimentação em zonas litorâneas (alterando os padrões de deposição e progradação, citados por Ralston et al., 2013), além de mudanças na biodiversidade (com possível invasão de espécies de regiões adjacentes, segundo Molinos et al., 2015). Diante deste quadro de alterações abióticas e bióticas, chama a atenção à vulnerabilidade das áreas mais rasas, tais como os manguezais e restingas (IPCC, 2007). Apesar da reconhecida capacidade de adaptação e resiliência dos manguezais, seja pela agregação de sedimentos finos e variação da composição arbórea com a inundação pelas marés, traz inquietação o efeito da velocidade e intensidade da elevação nível médio relativo do mar (NMRM), principalmente por sua posição geográfica, em que é comum a presença de barreiras geográficas em direção à terra (Schaeffer Novelli et al., 1990, 2016).

Para a biota local, o aumento da temperatura da água pode trazer prejuízos à fisiologia e aos ciclos vitais dos organismos aquáticos, trazendo alterações em suas vias metabólicas e na expressão gênica, assim como mudanças nos períodos de acasalamento e desova de diversos animais ectotérmicos (Magrin et al., 2014). Reconhecidamente, alterações em

parâmetros abióticos da água (p. ex., temperatura, salinidade e pH), podem provocar estresse biológico, resultando em alterações fisiológicas e, a longo prazo e escala, no desaparecimento de algumas espécies, ou sua adaptação a este novo cenário ambiental (Trídico et al., 2010).

Os organismos aquáticos podem ser expostos a uma grande variedade de estressores ambientais (p. ex., radiação UV, contaminantes, variações térmicas, entre outros), resultando no estresse oxidativo de suas membranas celulares (Vinagre et al., 2012). As defesas antioxidantes nos crustáceos decápodos podem variar segundo seu nível de metabolismo aeróbico ao longo do dia, bem como com a radiação UV e a temperatura, conforme já relatado para *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) por Maciel et al. (2004). Segundo estes autores, variações no metabolismo aeróbico impõem variações na geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), gerando proteínas com potencial de peróxidos lipídicos (LPO) e proteínas oxidadas, ambas causando danos ao DNA (Halliwell & Gutteridge, 1999). Neste panorama, pouco se conhece sobre os sistemas de defesa e adaptação fisiológica de alguns crustáceos, mesmo aqueles de maior importância econômica ou ecológica, principalmente frente às mudanças térmicas associadas ao aquecimento global. Para algumas espécies endêmicas de manguezal, como o caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*), são esperadas alterações em seu adensamento e estrutura populacional, associadas à elevação do nível médio relativo do mar (NMRM) e das distintas feições arbóreas que pode gerar, caracterizando seu potencial bioindicador de mudanças climáticas (Nordhaus et al., 2009; Pinheiro e Almeida, 2015). Além disso, esta espécie destaca-se por sua importante atuação ecológica na bioturbação dos sedimentos (Araújo-Júnior et al., 2016), processamento de serapilheira (Christofoletti et al., 2013), alta tolerância às variações ambientais, assim como sensibilidade à diversos xenobióticos (Pinheiro et al., 2012, 2013). Por isso, tem sido utilizada como organismo modelo em ecotoxicologia (Dutra et al., 2009; Duarte et al., 2016).

Tendo em vista as mudanças climáticas e as previsões de aumento térmico à qual *Ucides cordatus* poderá estar sujeito nos manguezais, o objetivo deste trabalho foi avaliar, experimentalmente, alguns efeitos citotóxicos decorrentes do estresse térmico. Assim, foram registrados possíveis comprometimentos causados ao nível das membranas celulares da espécie, empregando, para isso, o teste do tempo de retenção do vermelho neutro (NRRT), assim como danos oxidativos ao tecido branquial e hepatopancreático, por análise dos níveis de lipoperoxidação (LPO).

## Material & Métodos

Foram coletados 60 exemplares de *U. cordatus* (Linnaeus, 1763) em manguezais de Cananéia, sul do Estado de São Paulo (SP), correspondendo a adultos íntegros (presença de todos os apêndices locomotores), em intermuda, com largura de carapaça (CW)  $\geq 60$  mm (conforme legislação vigente – IBAMA, 2003), obtidos por braceamento (Pinheiro e Fiscarelli, 2001). Logo após a captura, os animais foram transportados em caixas térmicas, onde foram mantidos imóveis para evitar o estresse por manuseio. Em laboratório, foram submetidos à biometria: CW (em milímetros), com uso de um paquímetro de precisão (0,05mm); e WW (peso úmido total, em gramas), registrado numa balança de precisão (0,01g).

Em seguida, cinco espécimes foram submetidos ao teste micronúcleo (MN%) e ensaio vermelho neutro (NRRT), para avaliação de sua condição primordial (ambiental), com subsequente dissecação para remoção do tecido branquial (anterior e posterior) e hepatopancreal, armazenados em eppendorfs (2mL) e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até as análises. Os animais restantes (n=55) foram distribuídos em 11 aquários contendo água salobra ( $15\pm 1$ ), oriunda do local de captura (5 cm de altura de coluna d'água), cada um deles contendo 05 espécimes. Nestes aquários foram colocados, também, cinco canos de PVC (15 cm de comprimento x 10 cm de diâmetro), para seu uso como galerias artificiais, minimizando um possível estresse por interações comportamentais. Assim permaneceram aclimatados durante 07 dias, em uma sala com controle térmico ( $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e de fotoperíodo (12:12 h claro:escuro), com oferecimento de folhas do mangue-vermelho – *Rhizophora mangle* L. – e monitoramento diário da salinidade e pH da água. O registro térmico (grupo controle) foi realizado com um termômetro digital de máxima e mínima, mantido por um sistema de ar-condicionado ligado a um termostato digital, evitando alterações térmicas expressivas. Os aquários foram sifonados diariamente para a retirada dos restos de alimento, matéria orgânica e fezes, evitando o comprometimento da qualidade da água pelos excretas nitrogenados. A água de reposição era adicionada somente quando atingia a temperatura em que os animais se encontravam dentro do aquário.

Foram realizados dois testes térmicos (agudo e crônico), conforme segue:

**Teste agudo:** Foram utilizados 15 animais dispostos em três caixas (05 exemplares cada), as quais foram dispostas em uma câmara climática (*BOD – Biochemical Oxygen Demand*), regulada para um valor térmico de  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , salinidade  $15\pm 1$  e fotoperíodo 12:12h. Foram

estabelecidos três intervalos temporais após o início do experimento (12, 24 e 36h), em cada um deles removidos cinco exemplares para coleta de hemolinfa e análise de dois biomarcadores fisiológicos: **1) teste do tempo de retenção do vermelho neutro (NRRT)**, obtido por coleta de amostra de hemolinfa e processamento conforme estabelecidos por Duarte *et al.* (2016); e **2) dosagem do nível de lipoperoxidação (LPO)** nos tecidos branquiais (anterior, com função primariamente respiratória; e posterior, com função principalmente osmorregulatória – vide Martinez *et al.*, 1999 e Ortega *et al.* 2014), bem como o hepatopancreal, empregando o protocolo FOX modificado ou ensaio de laranja de xilenol, adaptado de Hermes-Lima *et al.* (1995) e Jiang *et al.* (1991, 1992). O mesmo foi efetuado com cinco animais do grupo controle (condição de aclimatação), os quais eram que mantidos em aquários fora da câmara climática.

**Teste crônico:** Do mesmo modo, neste experimento outros 15 animais foram dispostos na câmara climática, também sob estresse térmico ( $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com manutenção da salinidade ( $15\pm 1$ ) e fotoperíodo similares (12:12h claro:escuro). Foram realizados os mesmos procedimentos do teste agudo, com a aplicação dos dois protocolos (NRRT e LPO), porém com intervalos de análise de 2, 5 e 7 dias a partir do início do experimento.

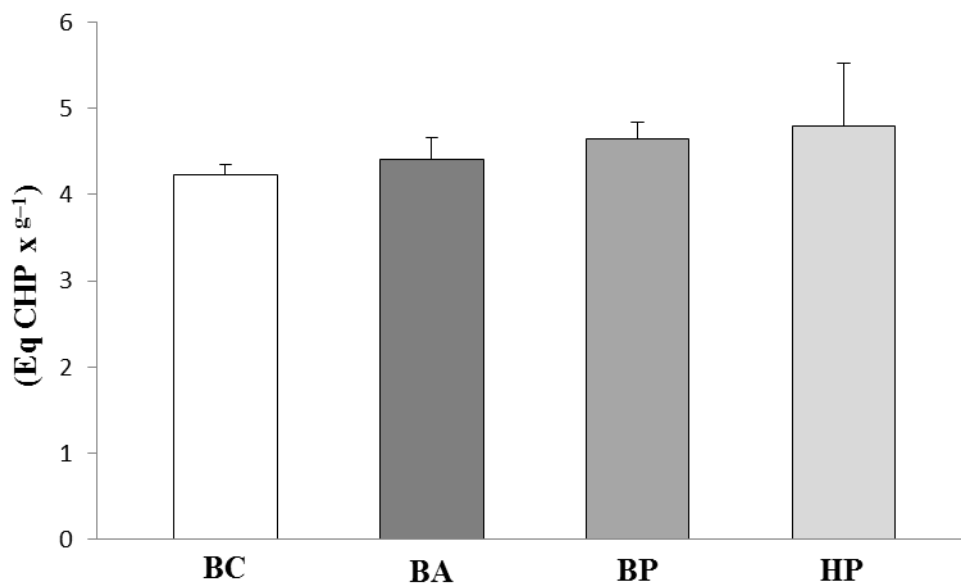
### **Análises estatísticas**

Cada uma das variáveis quantitativas foram submetidas a um teste de normalidade (W, Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (L, Levene). Quando constatada a não-normalidade dos dados ( $p < 0,05$ ), os dados foram submetidos a um teste não-paramétrico (U, Mann-Whitney), e do contrário, quando os dados apresentaram distribuição normal, estes foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), com confronto das médias “a posteriori” pelo teste de Tukey (Sokal & Rohlf, 2003). As médias foram comparadas e as diferenças confrontadas a um nível de significância de 5%.

### **Resultados**

A condição primordial (ambiental) dos cinco animais avaliados quanto aos testes micronúcleo (MN‰) e vermelho neutro (NRRT) geraram médias de  $1,6\pm 0,7$  MN‰ (SE: Erro

padrão da média) e  $120,0 \pm 53,6$  (SE: Erro padrão da média), respectivamente. Além disso, os tecidos destes animais foram submetidos à análise de lipoperoxidação (LPO) dos tecidos branquiais e hepatopancreático, sendo constatados valores médios variando de  $4,41 \pm 0,25$  a  $4,64 \pm 0,20$  nmol CHP/g para as brânquias anteriores e posteriores, respectivamente, muito similares ao do hepatopâncreas ( $4,79 \pm 0,73$  nmol CHP/g), com ausência de diferenças estatísticas entre as amostras ( $F=3,78$ ;  $P=0,053$ ) (Figura 1). Os animais utilizados nas análises apresentaram biometria variando de 62,9 a 87,7 mm CW ( $76,3 \pm 5,03$  mm, SD: desvio padrão) e peso úmido total de 119,25 a 267,46 g WW ( $190,10 \pm 31,88$  g, SD: desvio padrão).



**Figura 1.** Análise de lipoperoxidação (LPO) em tecidos de *Ucides cordatus* imediatamente após a coleta na natureza, para avaliação da situação primordial (ambiental) da amostra. Onde: barras = média; linhas verticais = desvio padrão; BC = branco; BA= brânquia anterior; BP = brânquia posterior, HP = hepatopâncreas.

Os animais foram observados diariamente durante o período experimental, visando avaliar possíveis alterações comportamentais em decorrência do aumento da temperatura. No entanto, em todos os grupos analisados, tanto no teste crônico como no agudo, não foram verificadas alterações comportamentais dos animais e, durante a realização de todo o experimento, houve apenas um óbito durante a fase de exposição crônica no grupo controle.

Os dados obtidos para o teste do vermelho neutro (NRRT) foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo constatada distribuição não normal, independente do

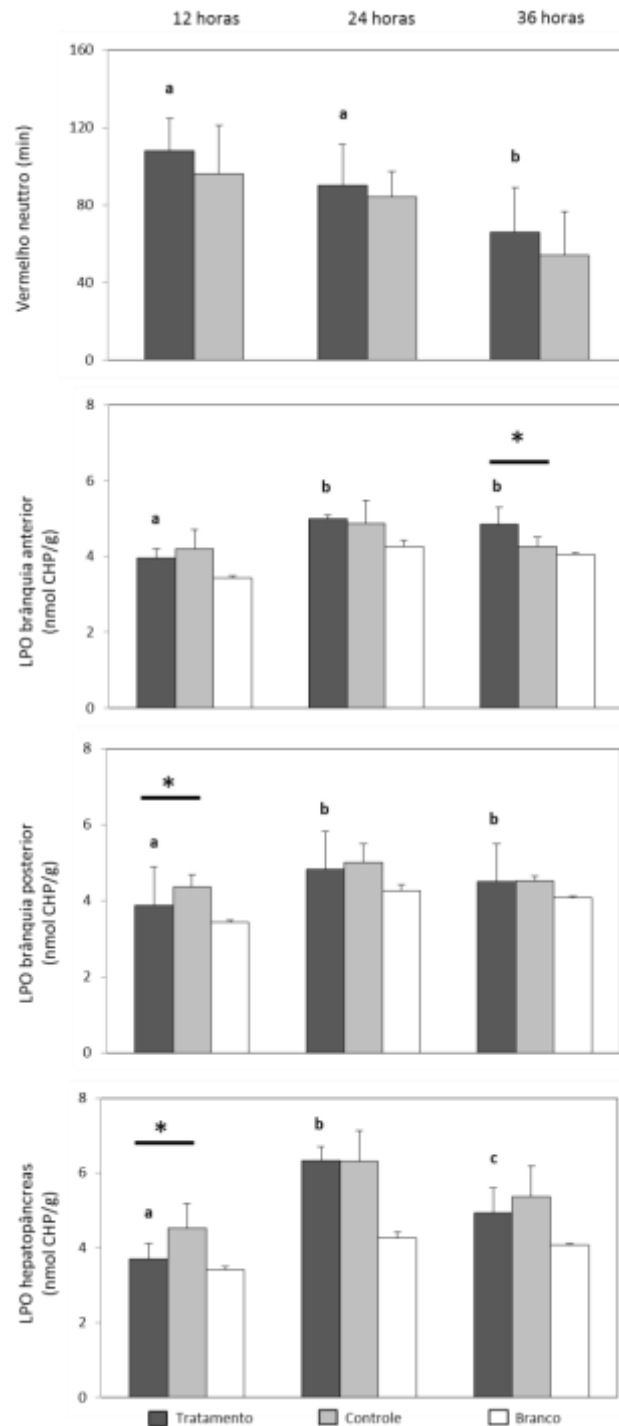


teste realizado: agudo ( $W=0,893$ ;  $P=0,003$ ) ou crônico ( $W=0,887$ ;  $P=0,005$ ). Observou-se um decréscimo do tempo médio de retenção do vermelho neutro, tanto no teste agudo quanto no crônico, não existindo diferença significativa entre os grupos controle e nos tratamentos comparados pareadamente ( $p>0,05$ ) (Figuras 2 e 3). Entretanto, os animais mantidos na BOD a  $30\pm 1^\circ\text{C}$  (tratamento) apresentaram maiores valores de tempo de retenção em minutos (Tabela I), do que os espécimes mantidos sob as condições externas ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) (controle).

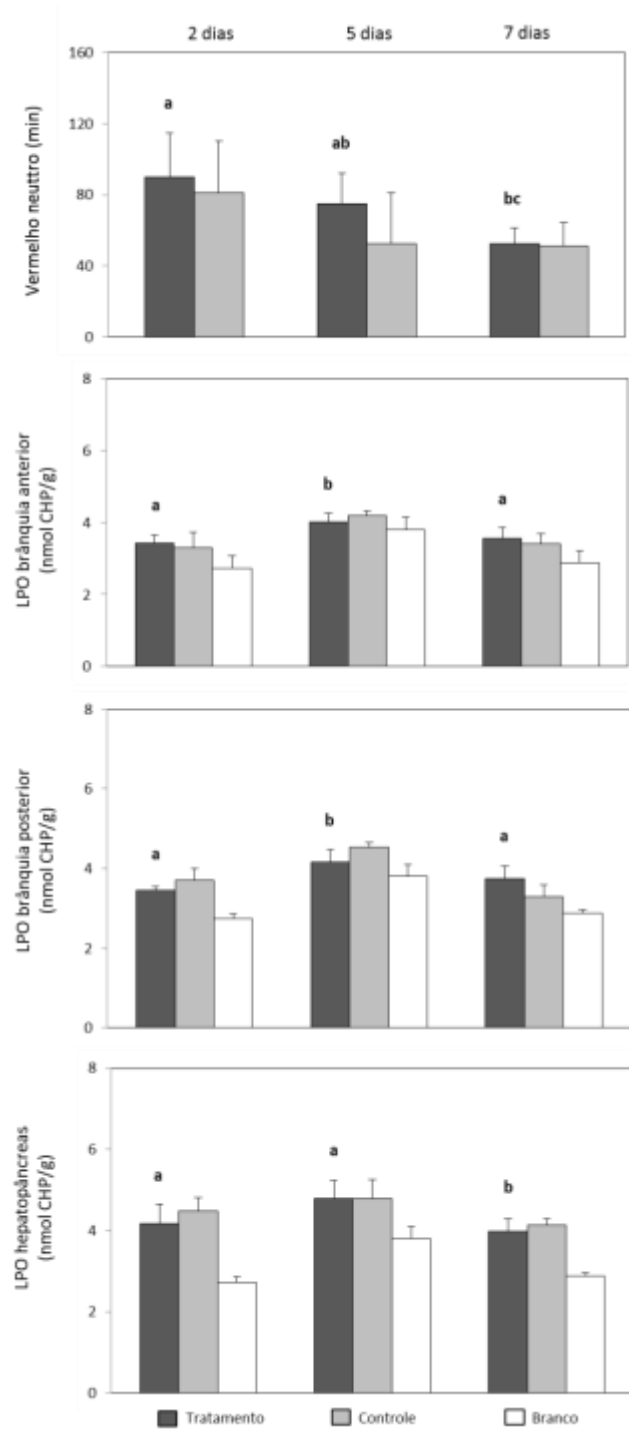
**Tabela I.** Resultados dos biomarcadores para exemplares de *Ucides cordatus* mantidos a  $30\pm 1^\circ\text{C}$  (tratamento) e temperatura ambiente  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  (controle), em um teste agudo (horas) e crônico (dias). Onde: x, média; s, desvio padrão; e células coloridas, representam diferença estatística quando na comparação dos exemplares do tratamento com os do grupo controle, por teste t de Student ( $p<0,05$ ).

Biomarcador	Tratamento / Controle (x ± s)					
	Teste agudo			Teste crônico		
	12 horas	24 horas	36 horas	2 dias	5 dias	7 dias
Vermelho neutro (minutos)	108,0 ± 16,4	90,0 ± 21,2	66,0 ± 22,7	90,0 ± 24,5	75,0 ± 17,3	52,5 ± 8,7
	96,0 ± 25,1	84,0 ± 13,4	54,0 ± 22,7	81,0 ± 29,2	52,5 ± 28,7	51,0 ± 13,4
LPO Brânquia anterior (nmol CHP/g)	3,9 ± 0,2	5,0 ± 0,1	4,9 ± 0,4	3,4 ± 0,2	4,0 ± 0,2	3,6 ± 0,3
	4,2 ± 0,5	4,9 ± 0,6	4,3 ± 0,2	3,3 ± 0,4	4,2 ± 0,1	3,4 ± 0,3
LPO Brânquia posterior (nmol CHP/g)	3,9 ± 0,1	4,8 ± 0,4	4,5 ± 0,2	3,4 ± 0,1	4,2 ± 0,3	3,7 ± 0,3
	4,4 ± 0,3	5,0 ± 0,5	4,5 ± 0,1	3,7 ± 0,3	4,5 ± 0,1	3,3 ± 0,3
LPO Hepatopâncreas (nmol CHP/g)	3,7 ± 0,4	6,3 ± 0,4	4,9 ± 0,7	4,2 ± 0,5	4,8 ± 0,4	3,9 ± 0,3
	4,5 ± 0,7	6,3 ± 0,8	5,4 ± 0,8	4,5 ± 0,3	4,8 ± 0,5	4,1 ± 0,2

Já para os níveis de lipoperoxidação (LPO) houve distinção da resposta entre os testes realizados, com diferença significativa apenas no teste agudo (Figura 2 e Tabela I). Assim, houve diferença estatística entre as médias dos níveis de lipoperoxidação a partir de 12 horas do início do experimento nas brânquias posteriores ( $t=-3,16$ ;  $P=0,013$ ), com o mesmo tempo ocorrendo no hepatopâncreas ( $t=-2,31$ ;  $P=0,05$ ), enquanto nas brânquias anteriores isso ocorreu somente após 36 horas ( $t=2,69$ ;  $P=0,027$ ) (Tabela I).



**Figura 2** - Valores dos testes de vermelho neutro (NRRT, em minutos) e níveis de lipoperoxidação (LPO, em nmol CHP/g), obtidos durante realização de teste térmico agudo (12, 24 e 36 horas) em exemplares de *Ucidès cordatus*. Onde: Barras = médias; linhas verticais = desvios-padrão; linhas horizontais com asterisco = diferença estatística a 5% entre as médias do tratamentos e o controle; letras minúsculas diferentes, associadas às barras indicam diferença estatística a 5% entre os tratamentos térmicos.



**Figura 3** - Valores obtidos durante realização de teste térmico crônico (2, 5 e 7 dias) em exemplares de *Ucides cordatus*. Onde: barras = médias; linhas verticais = desvios-padrão; linhas horizontais com asterisco = diferença estatística entre as médias de animais sob tratamento e controle; letras minúsculas diferentes associadas às barras indicam diferença estatística somente entre animais sob tratamento térmico ( $P < 0.05$ ).

## Discussão

Segundo o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC, 2007) os recentes modelos preveem um aumento de 0,2°C na temperatura global média a cada década, bem como um aumento máximo de 4°C até o ano de 2100. Essas alterações climáticas, consideradas drásticas por cientistas da área, implicam em grandes flutuações de temperatura e no aumento da frequência dos eventos térmicos extremos, trazendo prejuízos à biodiversidade e à economia (Trenberth et al., 2007). No Estado de São Paulo, em especial, a média térmica histórica em 50 anos (1960-2010) foi de 25,7°C, existindo percepção de eventos térmicos extremos maiores e recorrentes, conhecidos como ondas de calor, elevando esta média para 32,1°C em alguns períodos do ano (Pinto, 2010).

Em vista do crescimento dos eventos de aumento e variação extrema de temperatura envolvidos na mudança climática global, torna-se premente o entendimento dos efeitos da temperatura nos organismos, principalmente sobre as mudanças que afetarão o ambiente marinho (Sokolova & Lannig, 2008). A temperatura desempenha um papel direto na distribuição e sobrevivência dos invertebrados marinhos, que dependem deste fator ambiental para regular sua fisiologia interna, assim como, indiretamente, podem reagir a estressores ambientais, afetando sua relação com substâncias xenobióticas presentes no ambiente (Sokolova & Lannig, 2008). Segundo Hochaka & Somero (2002), a temperatura ambiente desempenha um papel fundamental na fisiologia dos animais ectotérmicos, regulando suas taxas de reações fisiológicas e bioquímicas, assim como a estabilidade de suas membranas.

Assim, o estudo das respostas fisiológicas frente ao aumento da temperatura se faz necessário para avaliar como as comunidades aquáticas podem responder às adversidades térmicas e, também, prever quais as alterações apresentadas por uma espécie frente às variações de temperatura, estabelecendo-se modelos de impacto ambiental. Segundo Branco (2014), um aumento moderado na temperatura já seria capaz de provocar alterações nas taxas metabólicas que irão determinar, por exemplo, a taxa de crescimento e de reprodução dos animais aquáticos.

Para a espécie *Ucides cordatus*, não há o registro de trabalhos que abordem a influência da temperatura sobre seus processos fisiológicos. Entretanto, Branco (1993) relata mortalidade e letargia de indivíduos adultos, quando a temperatura no manguezal em Santa Catarina atingiu 10,7°C, em um evento considerado extremo à época, nos anos de 1987/88. O caranguejo-uçá tem preferência por temperaturas mais altas, tendo a propensão de permanecer menos ativo dentro de sua galeria quando a temperatura é <15°C (Pinheiro e Hattori, 2003).

Apesar de não existir o registro de uma temperatura máxima letal para a espécie, sabe-se que este é um fator exógeno que pode afetar a fertilidade (Sastry, 1983) e o desenvolvimento larval (Gardner et al., 2004). Segundo Cottens et al. (2010) as larvas de *U. cordatus* suportam pouca variação térmica, e quando a água atinge 20°C, há um aumento da mortalidade larval e, redução expressiva de sua viabilidade. Contudo, temperaturas altas diminuem o tempo de desenvolvimento larval (Pinheiro et al., 1994), o que, segundo Anger et al. (1990), pode limitar o tempo de dispersão larval em maiores valores térmicos.

Segundo Somero (2010), os organismos possuem muitos mecanismos adaptativos para mitigar os efeitos deletérios provocados pelo estresse térmico. Runcie et al. (2012) relatam que a variação observada, por exemplo, em testes de estresse agudo e crônico, estão relacionados às alterações na homeostase do organismo, levando à ativação de mecanismos adaptativos. O estresse oxidativo, caracterizado pela produção e acúmulo de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila nas células, podem provocar danos às proteínas, lipídeos e DNA. A produção de espécies reativas de oxigênio é resultante do estresse oxidativo sofrido pelos organismos aquáticos quando expostos a agentes estressores relacionados às alterações ambientais, como variações térmicas, exposição à radiação ultravioleta e poluição (Lesser, 2006; Branco, 2014).

Vinagre et al. (2012) em análise do robalo *Dicentrarchus labrax*, destacam a importância de estudos iniciais, relativos à exposição de espécimes à temperatura média dos ambientes estuarinos, reforçando que os biomarcadores fisiológicos são extremamente sensíveis às variações térmicas cada vez mais frequentes no ambiente. Durante eventos de estresse térmico, os níveis de EROS (Espécies Reativas de Oxigênio) podem aumentar dramaticamente (Gerschman et al., 1954), podendo iniciar a peroxidação lipídica, que é um dos mecanismos mais comuns de dano celular (Halliwell & Gutteridge, 1999). Maciel et al. (2004) demonstraram variações diárias no metabolismo aeróbico das brânquias e hepatopâncreas do gastrópodo *Cranopsis granulata*, com níveis de lipoperoxidação distintos entre os tecidos. No presente trabalho eram esperados valores mais pronunciados de lipoperoxidação no tecido hepatopancreal, já que esta glândula do intestino médio é o principal órgão de detoxificação em caranguejos (Ahearn et al., 2004). Entretanto, alguns autores acreditam que como as brânquias têm contato primário com as substâncias xenobióticas no ambiente aquático, são tecidos ideais como indicadores bioquímicos e em estudos de sensibilidade à poluição ambiental (Kono e Friedorich, 1982). A detecção de lipoperoxidação é evidência da injúria causada pelos radicais livres nos sistemas biológicos (Maciel et al., 2008). Nesse sentido, apesar da lipoperoxidação ocorrer naturalmente nas

células, seja na renovação e/ou reparação das membranas internas, níveis excedentes podem acarretar danos permanentes à essas membranas, dificultando a ação de mecanismos de proteção do animal (Meneghini, 1987). Entretanto, os dados obtidos no experimento, bem como a ausência de um padrão nos níveis de lipoperoxidação, indicam a existência de processos oxidativos das membranas celulares, carecendo de melhor investigação, bem como cautela quando relacionados à temperatura.

Os danos subletais causados por fatores exógenos (p. ex., variação térmica), não matam imediatamente o animal, mas trazem consequências, como alterações no recrutamento de juvenis, gasto excessivo das reservas energéticas, diminuição da locomoção, alterações no comportamento/sucesso reprodutivo, mobilização do metabolismo/energia, entre outros (Mcgeer et al., 2000; Amiard-Triquet et al., 2011). O ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro (NRRT) trata dos danos fisiológicos à membrana lisossômica, que ocorrem pelo ataque constante de radicais livres, prejudicando sua permeabilidade e estrutura (Lowe et al., 1995). Este biomarcador citotóxico é reconhecido por sua plasticidade, bem como pela sensibilidade que conferem a organismos submetidos à contaminações ambientais. Hauton et al. (1998) ressaltam o potencial deste biomarcador como ferramenta de baixo custo, e de alta sensibilidade às perturbações produzidas por alterações de temperatura e salinidade. Neste mesmo estudo, esses autores relatam uma redução no tempo de retenção do vermelho neutro conforme o tempo de experimento, ainda que em uma espécie de ostra (*Ostrea edulis*), coincidindo com o ocorrido no presente estudo. Tal declínio do NRRT, talvez esteja relacionado com o estresse intrínseco à manipulação dos animais, por estarem em um habitat distinto do natural, um aspecto também observado para o mexilhão *Mytilus sp.* em condições de armazenamento (Harding et al., 2004).

Os biomarcadores fisiológicos constituem uma abordagem eficiente em estudos de avaliação de risco e impacto ambiental, pois se antecipam aos danos de escala ecológica mais elevada, como o desaparecimento de populações inteiras de animais. Assim, o uso dessa ferramenta torna-se fundamental para que possam ser tomadas medidas mitigadoras e de proteção ambiental frente às mudanças climáticas, especialmente aqueles costeiros que são influenciados pelo nível médio relativo do mar (NMRM) e fenômeno das marés, como é o caso dos manguezais e marismas (Schaeffer-Novelli et al., 2016).

## **Conclusão**

- As temperaturas aplicadas no experimento foram suficientes para a desestabilização das membranas celulares;
- Houve uma aclimatação 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 Fe<sup>2+</sup> 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, 3<sup>rd</sup> 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.