

O Camarão-Fantasma, *Callichirus corruptus* Hernáez, Miranda, Rio
& Pinheiro, 2022 (Crustacea: Decapoda: Callichiridae), como
Espécie Sentinela da Qualidade Ambiental em Praias Arenosas

JULIANO JOSÉ DA SILVA

SÃO VICENTE - SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

O Camarão-Fantasma, *Callichirus corruptus* Hernáez, Miranda, Rio
& Pinheiro, 2022 (Crustacea: Decapoda: Callichiridae), como
Espécie Sentinela da Qualidade Ambiental em Praias Arenosas

Discente: Juliano José da Silva

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Antonio Amaro Pinheiro

Coorientadora: Dra. Tailisi Hoppe Trevizani

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus do Litoral Paulista,
UNESP, para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade de Ambientes Costeiros

SÃO VICENTE - SP

2024

S586c	Silva, Juliano José O Camarão-Fantasma, <i>Callichirus corruptus</i> Hernáez, Miranda, Rio & Pinheiro, 2022 (Crustacea: Decapoda: Callichiridae), como Espécie Sentinela da Qualidade Ambiental em Praias Arenosas / Juliano José Silva. -- São Vicente, 2024 112 p. : il., tabs., fotos, mapas Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente Orientador: Marcelo Antonio Amaro Pinheiro Coorientadora: Tailisi Hoppe Trevizani 1. Biomarcadores. 2. Conservação. 3. Contaminação. 4. Micronúcleo. 5. Toxicidade. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

“É preciso exigir de cada um o que cada um pode dar”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a orientação do *Prof. Dr. Marcelo Antonio Amaro Pinheiro*, minha jornada no mestrado não seria possível sem sua orientação. Nesses dois anos e meio tive um crescimento acadêmico absurdo, e grande parte dele foi devido a participação efetiva do Marcelo, em todos os processos da minha formação. Agradeço o cuidado, o tempo e a dedicação para com essa dissertação. Serei eternamente grato por todo conhecimento compartilhado e todo suporte para a pesquisa fornecido nesse processo.

Agradeço a minha coorientadora *Dra. Tailisi Hoppe Trevizani* (Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo – IO/USP), que me ajudou em um momento crucial para o desenvolvimento da pesquisa. Sou muito grato pela disponibilidade em analisar as amostras de metais, por me ensinar durante esse processo, e pelas leituras e contribuições nos manuscritos. Dessa forma, agradeço, também, ao *Prof. Dr. Rubens Cesar Lopes Figueira*, docente do *Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO/USP)*, por ceder toda a infraestrutura do *Laboratório de Química Inorgânica Marinha (LaQIMar)*, com acesso aos equipamentos necessários para as análises quantitativas de metais.

Agradeço a minha família, que me apoiou (e me apoia) em toda minha trajetória acadêmica. Aos meus pais *José Antônio da Silva* e *Lúcia Fátima Moraes da Silva*, que sempre estiveram presentes, mesmo estando distantes. Nossas conversas de vídeos diárias sempre me alegram, além de terem podido me auxiliar financeiramente no começo dessa jornada e, principalmente, por me ensinarem a ser sempre resiliente e determinado... vocês são os maiores exemplos disso. Aos meus irmãos *Jhonatan* e *Michelle*, que sempre acreditaram no meu potencial, mesmo nos momentos que eu não acreditei, pelos churrascos, jogos e finais de semanas que tornaram esse processo mais fácil. Aos meus sobrinhos – *Alice*, *Cecília*, *Maria Clara* e *Vinícius* – que com sua doçura e leveza me lembram a todo momento, como é bom ter a alma de criança, mesmo me tornando adulto.

Ao *Laboratório de Biologia da Conservação de Crustáceos (LBC)*, do *Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos (CRUSTA)*, que me apoiou em todo o processo de coleta e das análises do projeto de mestrado. Vocês estiveram ao meu lado desde as coletas pilotos, para o ajuste de metodologia, até no auxílio com os procedimentos do laboratório. Obrigado a *Hanna*, *Fernanda*, *Isabela*, *Lígia*, *Maria Antônia* e *Nicholas*, por participarem desse período da minha vida. Em especial, agradeço aos meus queridos amigos *Elizabete*, *Esli* e *Márcio*, pois vocês

tornaram meus dias mais alegres, minhas idas ao laboratório mais felizes, ao que sou muito grato por ter vocês na minha vida. Vocês me ensinaram a ter paciência, confiar no meu potencial e, principalmente, dar o devido valor a uma amizade, pelos cuidados e grande carinho.

Aos meus queridos amigos de república – *Agatha, André e Tatiane* – por tornarem minha jornada mais leve. Sou extremamente grato a vocês! Obrigado por me acolherem e permanecerem na minha vida. Ao meu grande amigo *Bruno*, que sempre esteve do meu lado, que me apoiou todo esse tempo, que fez minha rotina mais feliz. Obrigado por todos os conselhos, afetos, sorrisos, e por serem a minha família em São Vicente.

Aos meus amigos – *Amanda, Bruna, Carol, Douglas Evelyn e Maria Fernanda* – por me acolherem e me fazer sentir parte da *UNESP* e de São Vicente. Obrigado a todas festas e bares, todas as conversas e conselhos, e todos os momentos que passamos juntos. Aos amigos – *Andressa, Eduardo, Leonardo, Manu e Vitor* – por também fazerem parte desse processo. A todos da comunidade da *UNESP IB/CLP*.

Agradeço a minha família de Uberlândia. Primeiramente à *República Mandelaje*, que sempre foi presente na minha vida acadêmica, sempre me proporcionando as melhores risadas e companhia. Em especial, agradeço ao *Breno e Lucas*, que se tornaram meus irmãos, a quem sou muito grato por acreditarem no meu potencial, por sempre levantarem minha moral, por participarem dos momentos mais felizes da minha vida. À *República Francanilha*, em especial ao *Rafael*, que me abrilhantou com uma amizade linda, repleta de referências históricas e da melhor conversa do mundo. Aos amigos da Administração, em especial o *Vitor*, por ser uma das pessoas mais carismáticas e confiantes do mundo, por deixar minha vida mais feliz. Aos amigos – *Barbara, Fernanda, Rachel e Rodrigo* – que me divertem muito todas as vezes que visito a cidade, e por sempre me colocarem como prioridade. A *Ana Luiza*, minha melhor amiga e a pessoa mais inteligente, esforçada e querida do mundo, a pessoa com o melhor astral e que sempre deixa meu dia mais feliz e alegre.

Por fim, e não menos importante, aos amigos de Franca. Ao *Gabriel e Leonardo*, que acompanharam minha vida e me apoiaram nesse processo. Ao *Grupo Gaivotas*, representado pelo *Carlos, Kamila, Lucas, Pedro e Vitor*, que sempre estiveram presentes nos momentos mais importantes da minha vida, em especial ao *Carlos Basali, Eduardo e Juliana*, que são meus melhores amigos, por acompanharem meu crescimento pessoal e acadêmico, e nunca me abandonarem durante esse processo, sempre me tirando risadas e confiando no meu potencial. Obrigado a todos vocês, pois são especiais demais para mim!

Lista de Abreviações

AF: Areia Fina;
AG: Areia Grande;
AM: Areia Média;
AMF: Areia Muito Fina;
AMG: Areia Muito Grossa;
As: Arsênio;
B: Fator de Bioacumulação;
CAO: Comprimento da Área Oval;
C: Cascalho;
CC: Comprimento da Carapaça;
Cd: Cádmio;
CM_{cam}: Concentração Metálica do Camarão;
CM_{sed}: Concentração Metálica do Sedimento;
Cr: Cromo;
CT: Comprimento Total;
Cu: Cobre;
G: Gônadas;
H: Hepatopâncreas;
Hg: Mercúrio;
HPAs: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos;
JUR: Juréia;
M: Musculatura;
MF%: Malformações Nucleares;
Mn: Manganês;
MN%: Micronúcleo;
Ni: Níquel;
NRRT: Tempo de Retenção de Vermelho Neutro;
Pb: Chumbo;

PCB: Policlorobifenilos;

Pe: Peso;

POCs: Pesticidas Organoclorados;

SA: Silte + Argila;

SP: São Paulo;

STRI: Estrato Superior do Sedimento;

STRII: Estrato Inferior do Sedimento;

STS: Santos;

TMG: Tamanho Médio do Grão;

Zn: Zinco.

Sumário

Resumo	10
Abstract	11
Introdução Geral e Descrição da Área de Estudo	12
Descrição da Área de Estudo	17
Referências Bibliográficas	19

Capítulo I – Contaminação por metais no Camarão-Fantasma *Callichirus corruptus* e nos sedimentos de duas praias arenosas do Estado de São Paulo, com diferentes níveis de antropização......

Resumo	24
1. Introdução	25
2. Objetivos e Hipóteses	29
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	29
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	29
2.3. <i>Hipóteses</i>	29
3. Materiais e Métodos	31
3.1. <i>Área de Estudo</i>	31
3.2. <i>Delineamento Amostral</i>	31
3.3. <i>Amostragem e Processamento dos Sedimentos</i>	31
3.4. <i>Amostragem de <i>Callichirus corruptus</i></i>	33
3.5. <i>Biometria de <i>Callichirus corruptus</i></i>	33
3.6. <i>Preparo das Amostras de Tecidos</i>	34
3.7. <i>Análise Quantitativa dos Elementos metálicos</i>	34
3.8. <i>Fator de Bioacumulação</i>	36
3.9. <i>Matriz de Associação</i>	36
3.10. <i>Análises Estatísticas</i>	37
4. Resultados	38
4.1. <i>Variáveis Abióticas: Granulometria, TMG e MO% dos Sedimentos</i>	38
4.2. <i>Variáveis Abióticas: PCA e Análise de Associação de Variáveis nos Sedimentos</i>	38
4.3. <i>Variáveis Abióticas: Concentração de Elementos Metálicos nos Sedimentos</i>	41
4.4. <i>Variáveis Bióticas: Biometria de <i>Callichirus corruptus</i></i>	42
4.5. <i>Variáveis Bióticas: Concentração de Metais nos Tecidos de <i>C. corruptus</i></i>	44
4.6. <i>Variáveis Bióticas: Fator de Bioacumulação</i>	47
5. Discussão	48
5.1. <i>Variáveis Abióticas: Granulometria, TMG, MO% e Metais no Sedimento.</i>	48
5.2. <i>Variáveis Abióticas: Concentração de Metais nos Sedimentos</i>	50

5.3 Variáveis Bióticas: Concentração de Metais em <i>C. corruptus</i>	52
5.4. Variáveis Bióticas: Fator de Bioacumulação de Metais em <i>C. corruptus</i>	56
6. Conclusões	58
7. Referências Bibliográficas	59

Capítulo II – O Uso de Biomarcadores de Efeito no Camarão-fantasma *Callichirus corruptus*, para Identificação do Estado de Conservação de Duas Praias Arenosas no Sudeste Brasileiro...... 68

Resumo	68
1. Introdução	69
2. Objetivos e Hipóteses	73
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	73
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	73
3. Materiais e Métodos	75
3.1 <i>Área de Estudo</i>	75
3.2 <i>Delineamento Amostral</i>	75
3.3. <i>Amostragem de Callichirus corruptus</i>	76
3.4. <i>Biometria de Callichirus corruptus</i>	76
3.5. <i>Preparação para as Análises Citogenotóxicas</i>	76
3.6. <i>Ensaio Micronúcleo (MN‰)</i>	77
3.7. <i>Anormalidades Nucleares (AN‰)</i>	78
3.8 <i>Ensaio de Tempo de Retenção de Vermelho Neutro (NRRT)</i>	80
3.9. <i>Matriz de Associação</i>	81
3.10. <i>Análises Estatísticas</i>	82
4. Resultados	84
4.1. <i>Ensaio de Tempo de Retenção de Vermelho Neutro (NRRT)</i>	84
4.2. <i>Ensaio de Anormalidades Nucleares (AN‰)</i>	85
4.3. <i>Ensaio de Micronúcleo (MN‰)</i>	87
4.4. <i>PCA e Análise de Associação: Biomarcadores e Metais no Sedimento</i>	88
4.4. <i>PCA e Análise de Associação: Biomarcadores e Metais nos Tecidos do Camarão</i>	90
5. Discussão	92
5.1. <i>Ensaio de Tempo de Retenção de Vermelho Neutro (NRRT)</i>	93
6.2. <i>Anormalidades Nucleares (AN‰)</i>	95
6.3. <i>Ensaio Micronúcleo (MN‰)</i>	97
6.3. <i>PCA e Análise de Associação: Biomarcadores e Metais no Sedimento</i>	99
6.4. <i>PCA e Análise de Associação: Biomarcadores e Metais nos Tecidos do Camarão</i>	100
6. Conclusões	102
7. Referências Bibliográficas	104
Considerações Finais	111

Resumo

As regiões costeiras apresentam elevado adensamento populacional humano, com a disposição final de vários poluentes, como os metais. Devido a esse perfil, a avaliação da citogenotoxicidade em organismos presentes nesses locais são extremamente relevantes, uma vez que possibilita avaliar o *status* de conservação desses ambientes. Para isso, o uso de biomarcadores de efeito tem sido amplamente utilizado para identificar a toxicidade gênica e fisiológica de animais, com intuito de fornecer respostas à contaminação ambiental. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os danos citogenotóxicos no camarão-fantasma (*Callichirus corruptus*), em relação à possível contaminação ambiental por metais, confrontando uma praia em ambiente prístino (*JUR*, Estação Ecológica Juréia-Itatins) a outra impactada antropicamente (*STS*, Santos). Foram quantificados 10 elementos metálicos (*As*, *Cd*, *Cr*, *Cu*, *Hg*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V* e *Zn*), associados ao sedimento arenoso e em três tecidos do camarão (gônadas, hepatopâncreas e musculatura). Os animais e os sedimentos foram coletados com o auxílio de uma bomba de sucção. O sedimento passou por análise granulométrica (sete frações) e do teor de matéria orgânica (*MO*%). Para as análises citotóxicas foram analisados 12 exemplares/setor praiaral, quantificando o tempo de funcionamento lisossomal (Ensaio *NRRT*), enquanto cinco animais/setor foram utilizados para avaliar a frequência de hemócitos micronucleados (*MN*) e com anormalidades nucleares (*AN*). O sedimento da Praia de Santos foi categorizado como areia muito fina (*TMG*, tamanho médio do grão = 0,096 mm), diferindo daquele da Praia da Juréia, categorizado como areia fina (*TMG* = 0,150 mm). A matéria orgânica no sedimento de *STS* (0,12%) foi quatro vezes superior ao de *JUR* (0,03%), existindo uma correlação negativa e significativa para a relação *MO* vs. *TMG* ($p = -0,67$ $p \leq 0,01$). Em relação aos metais, 88,9% apresentaram uma maior concentração nos sedimentos de *STS* em relação à *JUR* ($t \leq 7,84$; $p \leq 0,01$; $W = 0$; $p \leq 0,01$). Quanto ao acúmulo de metais nos tecidos de *C. corruptus*, o *As* foi o único que diferiu, com os camarões de *JUR* ($17,3 \pm 2,7$ $\mu\text{g/g}$) acumulando quase o dobro em relação àqueles de *STS* ($9,1 \pm 1,4$ $\mu\text{g/g}$) ($W=81$; $p<0,01$). A hierarquia de acúmulo de metais entre os tecidos foi $H > M > G$. O *NRRT* apresentou uma média 70% maior nos camarões da Juréia (100 ± 24 min), do que em Santos (59 ± 29 min) ($W = 11,4$; $p \leq 0,01$). As maiores frequências de *MN* e *AN* (total) ocorreram nos indivíduos de *STS* (12 ± 4 %; e 465 ± 60 %, respectivamente), correspondendo a cerca do dobro do que foi registrado na Juréia (*MN*: 5 ± 1 %; *AN*: 240 ± 46 %). A partir de análises de associação foi possível observar que *NRRT* apresentou uma correlação negativa e significativa com *MN*% e *AN*% ($r = -0,81$; $p \leq 0,01$). Em contrapartida, foi observado uma correlação positiva e significativa entre os metais do sedimento e os biomarcadores *MN*% e *AN*% ($r \geq 0,71$; $p \leq 0,01$). As maiores concentrações de metais nos sedimentos de *STS* está relacionada ao elevado adensamento populacional humano e diversos impactos antrópicos, como a presença do Porto de Santos. Os maiores teores de *MO*% no sedimento da Praia de Santos aumenta a adsorção de metais nesta matriz abiótica. Já o maior acúmulo de metais entre tecidos, ocorreu no hepatopâncreas, devido a sua bioquímica peculiar, que permite a maior adsorção de metais. Para os camarões de *JUR*, houve um maior tempo de retenção do vermelho neutro, confirmando a efetividade da preservação pela estação ecológica. No entanto, a relação entre a genotoxicidade e as concentrações metálicas no sedimento de *STS*, apontam elevado grau de antropização, trazendo impactos à frequência mutagênica de *C. corruptus*. Dessa forma, foi confirmado que as praias diferiram quanto ao seu grau de conservação (*STS*: antropizada; e *JUR*: preservada). Tais informações, aliadas aos biomarcadores de efeito, permitem o uso de *C. corruptus* como espécie sentinela ambiental, para categorizar o *status* de conservação de praias arenosas.

Palavras-chave: Biomarcadores, conservação, contaminação, micronúcleo, toxicidade.

Abstract

Coastal regions present high human population density, leading to the disposal of various pollutants, such as metals. Given this profile, assessing cytogenotoxicity in organisms within these areas is extremely relevant, as it allows for the evaluation of the conservation status of these environments. The use of effect biomarkers has been widely employed to identify genetic and physiological toxicity in animals, aiming to provide insights into environmental contamination. Thus, the objective of the present study was to evaluate cytogenotoxic damage in the ghost shrimp (*Callichirus corruptus*) in relation to potential environmental contamination by metals, comparing a pristine beach environment (*JUR*, Juréia-Itatins Ecological Station) with another anthropogenically impacted (*STS*, Santos). Ten metallic elements (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, V, and Zn) were quantified, both in the sandy sediment and in three shrimp tissues (gonads, hepatopancreas, and musculature). The animals and sediments were collected using a suction pump. The sediment underwent granulometric analysis (seven fractions) and organic matter content analysis (*OM%*). For the cytotoxic analyses, 12 specimens per beach sector were analyzed, quantifying lysosomal function time (*NRRT* assay), while five animals per sector were used to assess the frequency of micronucleated hemocytes (*MN*) and those with nuclear abnormalities (*NA*). The sediment from Santos Beach was categorized as very fine sand (*MGS*, mean grain size = 0.096 mm), differing from that of Juréia Beach, categorized as fine sand (*MGS* = 0.150 mm). The organic matter in the sediment of *STS* (0.12%) was four times higher than that of *JUR* (0.03%), with a negative and significant correlation observed between *OM* and *MGS* ($p = -0.67$, $p \leq 0.01$). Regarding metals, 88.9% showed higher concentrations in the sediments of *STS* compared to *JUR* ($t \leq 7.84$; $p \leq 0.01$; $W = 0$; $p \leq 0.01$). As for the accumulation of metals in the tissues of *C. corruptus*, arsenic was the only element that differed significantly, with shrimp from *JUR* ($17.3 \pm 2.7 \mu\text{g/g}$) accumulating almost twice as much compared to those from *STS* ($9.1 \pm 1.4 \mu\text{g/g}$) ($W = 81$; $p < 0.01$). The hierarchy of metal accumulation among the tissues was $H > M > G$. *NRRT* showed a 70% higher average in shrimp from Juréia ($100 \pm 24 \text{ min}$) than in Santos ($59 \pm 29 \text{ min}$) ($W = 11.4$; $p \leq 0.01$). The highest frequencies of *MN* and *NA* (total) occurred in individuals from *STS* ($12 \pm 4 \%$ and $465 \pm 60 \%$, respectively), corresponding to about double the frequencies recorded in Juréia (*MN*: $5 \pm 1 \%$; *NA*: $240 \pm 46 \%$). Association analyses revealed that *NRRT* showed a negative and significant correlation with *MN%* and *NA%* ($r = -0.81$; $p \leq 0.01$). Conversely, a positive and significant correlation was observed between metals in the sediment and the biomarkers *MN%* and *NA%* ($r \geq 0.71$; $p \leq 0.01$). The higher concentrations of metals in the sediments of *STS* are related to the high human population density and various anthropogenic impacts, such as the presence of the Port of Santos. The higher *OM%* levels in the sediment of Santos Beach increase the adsorption of metals in this abiotic matrix. The greatest accumulation of metals among tissues occurred in the hepatopancreas, due to its unique biochemistry, which allows for higher metal adsorption. The shrimp from *JUR* showed a longer neutral red retention time, confirming the effectiveness of the ecological station's preservation efforts. However, the relationship between genotoxicity and metal concentrations in the sediment of *STS* indicates a high degree of anthropization, impacting the mutagenic frequency of *C. corruptus*. Thus, it was confirmed that the beaches differed in their degree of conservation (*STS*: anthropized; and *JUR*: preserved). This information, combined with effect biomarkers, supports the use of *C. corruptus* as an environmental sentinel species to categorize the conservation status of sandy beaches.

Keywords: Biomarkers, conservation, contamination, micronucleus, toxicity.

Introdução Geral e Descrição da Área de Estudo

A ocupação dos ambientes aquáticos ocorre desde o início da humanidade, com o estabelecimento do homem junto aos rios, seja pela necessidade por água potável e plantios, como por ser via de acesso às áreas interiores do território (Oliveira *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2013). Com o advento da revolução industrial, houve uma aceleração crescente do desenvolvimento destes processos, principalmente em regiões costeiras, com intensificação das atividades antrópicas e da diversificação dos poluentes nestes locais, acarretando em diversos efeitos nocivos ao ecossistema marinho e outros adjacentes (Pinheiro *et al.*, 2017; Angeli *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2023).

A partir do Século XX houve o surgimento de diferentes tecnologias que intensificaram, ainda mais, a contaminação dos ambientes litorâneos, com uma gama de poluentes de expressiva toxicidade (*p. ex.*, metais; bifenilas policloradas, *PCBs*; pesticidas organoclorados, *POCs*; e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, *HPAs*), que passaram a ser frequentes, tanto em águas salinas como nas salobras (Stegeman & Hahn, 1994; Cajaraville *et al.*, 2000; Schmaltz *et al.*, 2020).

Entre esses poluentes, os metais se destacam por sua ocorrência (Costa *et al.*, 2021), incremento associado ao desenvolvimento industrial (Cajaraville *et al.*, 2000; Buzzi *et al.*, 2022), toxicidade e permanência, tanto nos sedimentos como na biota marinha (Rainbow, 2007; Ahearn *et al.*, 2004; Luoma & Rainbow, 2008; Duarte *et al.*, 2016). Esses elementos metálicos são divididos em dois grupos: **(1) metais essenciais** (*p. ex.*, cobre, *Cu*; cromo, *Cr*; e manganês, *Mn*), por fazerem parte de processos biológicos e serem encontrados na natureza em concentrações seguras às espécies, porém sendo tóxicos quando em altas concentrações (Duarte *et al.*, 2017); e **(2) metais não essenciais** (*p. ex.*, arsênio, *As*; cádmio, *Cd*; chumbo, *Pb*; e mercúrio, *Hg*), onde *As* é um metalóide, aqui considerado metal por sua persistência ambiental e grau de toxicidade (Carmo *et al.* 2004). Os metais não essenciais podem causar contaminação aos ambientes e organismos que ali vivem, mesmo quando em pequenas concentrações (Eisler, 2010; Duarte *et al.*, 2017; Trevizani, 2018).

Dessa forma, as áreas costeiras tornaram-se um local de disposição final desses contaminantes, seja pelo descarte irregular direto ou mesmo a lixiviação de terras emersas, contaminação de águas subterrâneas, dos rios e mar, além daqueles contaminantes provenientes da poluição atmosférica (Stegeman & Hahn, 1994; Wu *et al.*, 2023).

Nos últimos anos esta situação tem sido potencializada pelos contaminantes encontrados nos ecossistemas marinhos, que tem aumentado, sistematicamente, com a diversificação das atividades antrópicas, em sua maioria não sustentáveis e ambientalmente impactantes (Truchet *et al.*, 2023). Esses contaminantes são provenientes de diversas fontes, podendo ser oriundas de esgotos domésticos não tratados, efluentes industriais, pelo uso indiscriminado de pesticidas, durante os derramamentos de petróleo (ou de seus derivados) e por poluição atmosférica por queima de combustíveis fósseis, entre outros (Goulart & Callisto, 2003; Rainbow, 2007; Eisler, 2010; Cesar *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2016; Pinheiro *et al.*, 2017).

Tais substâncias potencialmente tóxicas comprometem a qualidade ambiental, contaminando a água e os sedimentos, podendo ser incorporados aos ciclos biogeoquímicos e mesmo às cadeias alimentares (Burton & Macpherson, 1995; Burton *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016; Cabrini *et al.*, 2018). Esses poluentes são capazes de gerar respostas fisiológicas e genéticas à biota aquática, promovendo danos respiratórios, reprodutivos, somáticos e até mesmo populacionais, bem como perturbações aos processos físico-químicos dos ecossistemas (Eisler, 2010; Pinheiro *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2017).

A mobilidade e persistência dessas substâncias nos compartimentos abióticos, assim como sua bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia trófica, podem afetar gravemente a saúde humana (Borga & Souza, 2001; Trevizani *et al.*, 2016). Para entender como os contaminantes influenciam as áreas costeiras, a concentração destas substâncias tem sido avaliada em seus compartimentos abióticos (água e sedimento). Os sedimentos possuem uma maior permanência de metais associados, em especial quando relacionados às partículas mais finas e com maior teor de matéria orgânica associado (Martincic *et al.* 1990). Tal fato difere da contaminação aquática, que é mais difusa e onde ocorre a dispersão de uma (ou mais) fonte(s) poluente(s) (Raknuzzaman *et al.*, 2016). No entanto, procedimentos de quantificação em matrizes abióticas apresentam elevado custo financeiro, o que poderia ser minimizado pelo uso de biomarcadores de efeito, em espécies sentinelas da qualidade ambiental (Adam *et al.*, 2023).

Os biomarcadores em espécies sentinelas possibilitam um alerta precoce à intoxicação por contaminantes, antes que aspectos crônicos possam ocorrer, como danos genéticos mais severos, elevação da mortalidade, declínios populacionais (Adams, 1990; Fishelson *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2017; Adam *et al.*, 2023) e até mesmo reduções na riqueza (Tavares & Carvalho, 1992) e diversidade biológica (Abessa *et al.*, 2001). No entanto, para que uma espécie animal possa ser considerada sentinela ambiental, é necessário conhecer as respostas geradas aos biomarcadores de efeito, bem como sua intensidade diferencial em áreas mais contaminadas, assegurando sua sensibilidade à exposição (Schwacke *et al.*, 2013). Além disso, algumas

características são de extrema importância para que uma espécie possa ser considerada uma sentinela ambiental, entre elas: **(1)** ser abundante e de fácil amostragem; **(2)** apresentar ampla distribuição geográfica; **(3)** ser resiliente à bioacumulação de substâncias tóxicas; **(4)** ser preferencialmente endêmica ao ambiente analisado; e **(5)** apresentar reduzida mobilidade ambiental (Van der Schalie *et al.*, 1999; Basu *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2008; Schwacke *et al.*, 2013; Pinheiro *et al.*, 2022). Além disso, seu nicho de ocorrência (*p. ex.*, planctônica, pelágica e bentônica) e posição trófica na cadeia alimentar (*p. ex.*, herbívora, carnívora ou onívora), também repercutem em diferentes respostas aos contaminantes (vide Pinheiro *et al.*, 2021 e Adam *et al.*, 2023).

Neste sentido, alguns invertebrados marinhos têm sido confirmados como importantes bioindicadores de contaminação, com vários grupos taxonômicos já empregados como espécie sentinela. Entre eles, os crustáceos detêm excelente resposta em estudos de biomonitoramento (Livingstone, 1998), com algumas espécies já utilizadas como indicadoras da contaminação por pesticidas, elementos metálicos ou outros xenobióticos, desde os pequenos peracáridos (*p. ex.*, *Gammarus pulex* – por Xuereb *et al.*, 2007), até alguns macrocrustáceos (*p. ex.*, *Aristeus antennatus* – por Antó *et al.*, 2009; *Nephrops norvegicus* – por Antó *et al.*, 2009; e *Ucides cordatus* – por Pinheiro *et al.*, 2017, 2022).

Entre os crustáceos utilizados como sentinelas ambientais destacam-se as “espécies-chave” de ecossistemas, por sua capacidade de promover alterações de parâmetros físico-químicos à comunidade local (Birkeland, 1989; Jones *et al.*, 1994). Neste sentido, os camarões-fantasma (família Callianassidae) compreendem macrocrustáceos que promovem expressiva bioturbação dos sedimentos de praias arenosas, trazendo alterações significativas em sua composição química e textural (Klerks *et al.*, 2007), como a espécie *Callichirus corruptus*, encontrada no Brasil, antigamente reconhecida como *Callichirus major* (vide Hernáez *et al.*, 2022).

Até recentemente, a distribuição de *Callichirus major* (Say, 1818) (Callichiridae) abrangia desde a Carolina do Norte (EUA) até Santa Catarina (Brasil). No entanto, evidências acumuladas por longo tempo (Staton & Felder 1995; Rodrigues & Shimizu 1997; Felder & Robles 2009; Souza *et al.*, 2018), somadas ao estudo desenvolvido por Hernáez *et al.* (2022), acabaram demonstrando que *C. major* representa um complexo de espécies e que sua população no Brasil, anteriormente identificada como *C. major*, na realidade representa uma nova identidade específica, distinta molecular e morfologicamente. Esta espécie, nomeada *C. corruptus* Hernáez, Miranda, Rio & Pinheiro, 2022, se distribui desde o Pará até Santa Catarina (Brasil), podendo ser identificada pelos seguintes caracteres: carapaça com rostro triangular

pequeno e duas projeções anterolaterais arredondadas; pedúnculos oculares contíguos, que não ultrapassam o segundo artículo antenular; e os machos apresentando um quelípodo maior, dotado de um gancho meral proeminente na margem inferior (Hernández *et al.*, 2022). Além disso, os machos desta espécie possuem gônadas compreendendo duas seções, uma delas masculina (testículo) e outra feminina (ovário), ambas funcionais morfológicamente, porém sem uma explicação convincente numa perspectiva comportamental (Souza *et al.*, 2018, 2020).

O camarão *C. corruptus* possui expressivo potencial como espécie sentinela da qualidade ambiental, pois é um “engenheiro ecossistêmico”, construindo suas galerias em sedimentos arenosos, onde desempenham importantes funções ecológicas (Rodrigues & Shimizu, 1997; Rosa *et al.*, 2018; Hernández *et al.*, 2019). Suas galerias permitem um grande fluxo hídrico, a incorporação de matéria orgânica e dos poluentes aos sedimentos (Berkenbusch & Rowden, 2003), interferindo, portanto, em processos funcionais de praias arenosas marinhas (Souza *et al.*, 1995; Rodrigues & Shimizu, 1997; Constantino *et al.*, 2024). Pelo exposto, o biomonitoramento de seus parâmetros fisiológicos e genéticos, por meio de biomarcadores de efeito, pode ser empregado como um método viável para a avaliação do *status* de qualidade ambiental desses ambientes (Livingstone, 1993; Souza *et al.*, 2022; Adam *et al.*, 2023).

O uso de populações de espécies bem-adaptadas e estabelecidas em certo ambiente, pode ser uma importante ferramenta para qualificar a saúde ambiental, permitindo a comparação dos resultados de toxicidade com estudos ecológicos e de biodiversidade (Valbonesi *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2021). Pelo conhecimento toxicológico genético e fisiológico, muitos autores sugerem o uso de ensaios para estimar, precocemente, os efeitos de contaminantes aos organismos. Entre eles estão o **Ensaio Vermelho Neutro (NRRT)**, que quantifica a citotoxicidade com base no tempo de retenção do vermelho neutro pelos lisossomos de hemócitos (Scarpato *et al.*, 1990; Duarte *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2022), o **Ensaio Micronúcleo (MN%)**, que tem a genotoxicidade expressa pela frequência de células micronucleadas em 1.000 analisadas (Pinheiro *et al.*, 2017; 2021), e as **Anormalidades Nucleares (AN%)**, que avaliam a frequência de várias anomalias nucleares em 1.000 células, (Adam *et al.*, 2023). Neste contexto, tais biomarcadores são conhecidos como indicadores pré-patológicos (Duarte *et al.*, 2019, 2020).

O NRRT é um biomarcador fisiológico que quantifica a citotoxicidade de um organismo pelo tempo de funcionamento lisossomal de seus hemócitos, gerando menores valores de tempo em espécimes de ambientes contaminados, com o inverso ocorrendo em ambientes mais preservados, onde o tempo de integridade é mais expressivo, podendo chegar a horas (Duarte *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2022). O MN%, por outro lado, é um marcador genético que quantifica

macrolesões ao DNA que foram sofridas por exemplares de uma espécie em determinada área de interesse, acarretando em aumento crescente das células micronucleadas em ambientes mais contaminados (Duarte *et al.*, 2017; Pinheiro *et al.*, 2017), bem como de valores reduzidos (basais) em ambientes preservados ($< 2\text{ MN}\%$ em invertebrados e de 3-5 $\text{MN}\%$ em vertebrados (*vide* Pinheiro *et al.*, 2021 e Adam *et al.*, 2023, respectivamente). Já as Anormalidades Nucleares (AN%), também conhecidas como Alterações Morfológicas Nucleares, quantifica as diferentes categorias anômalas assumidas pelo núcleo, podendo revelar a sensibilidade de uma espécie à agentes estressores ambientais, sendo considerado um procedimento complementar ao Ensaio de Micronúcleo (Adam *et al.*, 2023).

Os resultados basais para estes biomarcadores, previamente quantificados em áreas preservadas, são de extrema relevância como ferramenta de análise, por serem valores de referência confrontados àqueles de áreas contaminadas (Pinheiro *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2022; Adam *et al.*, 2023). Assim, eles podem variar interespecificamente, segundo o estilo de vida e hábito alimentar da espécie considerada (Pinheiro *et al.*, 2021). Até o momento, nenhuma espécie de camarão-fantasma ainda havia sido avaliada neste sentido, em especial *C. corruptus*, possibilitando a validação de seu uso como espécie sentinela da qualidade de praias arenosas no Brasil.

Considerando os diferentes contrastes de adensamento populacional humano e das atividades antrópicas ao longo do litoral brasileiro, o uso de áreas contrastantes possibilita avaliar a plasticidade das respostas destes biomarcadores de efeito, que podem ser explicadas por um contaminante (ou conjunto deles), independentemente de sua origem e constituição química (Duarte *et al.*, 2016, 2017).

Conhecendo a situação ambiental do Litoral Centro do Estado de São Paulo, bem como o desafio em avaliar o uso destes três biomarcadores genocitotóxicos para o camarão-fantasma *Callichirus corruptus*, espera-se que os resultados gerados possam permitir outros estudos, inclusive de um protocolo para que esta espécie possa ser utilizada como sentinela da qualidade ambiental das praias arenosas brasileiras.

Descrição da Área de Estudo

O presente estudo foi realizado em duas praias arenosas do Estado de São Paulo (SP), Brasil (Fig. 1 e Quadro 1): **(1) Praia de Santos (STS)** – Município de Santos (SP), na orla da cidade de Santos, no Litoral Centro SP; e **(2) Praia da Juréia (JUR)** – Município de Peruíbe (SP), próxima à Barra do Rio Una, na Estação Ecológica Juréia-Itatins (JUR), no Litoral Sul SP.

Em cada praia foram considerados três setores amostrais (*A*, *B* e *C*), com os pontos de coleta na orla de Santos estabelecidos pela distância dos canais de drenagem da cidade e entrada do canal portuário no estuário, conforme descritos a seguir: **(1) Setor A – Trecho Praia do José Menino** (23°58'1"S–46°20'35"O a 23°58'14"S–46°20'33"O), localizado entre os Canais 1 e 2, com distância média de 278 metros, bem como a 4.760 metros do Canal Portuário; **(2) Setor B – Trecho Praia do Boqueirão** (23°58'26"S–46°19'35"O a 23°58'26"S–46°19'33"O), localizado entre os Canais 3 e 4, com distância média de 361 metros, bem como a 3.170 metros do Canal Portuário; e **(3) Setor C – Trecho Praia Nossa Senhora Aparecida** (23°58'54"S–46°18'48"O a 23°58'56"S–46°18'46"O), localizado entre os Canais 5 e 6, com distância média de 406 metros, assim como a 1.598 metros do Canal Portuário. Já para os setores amostrais da Praia da Juréia, os pontos foram estabelecidos segundo a distância do Estuário do Rio Una, a saber: **(1) Setor A – Trecho Praia Proximal** (24°26'35"S–47°04'15"O a 24°26'31"S–47°04'9"O), mais próximo do canal estuarino, a uma distância de 450 metros; **(2) Setor B – Trecho Praia Mediano** (24°26'26"S–47°04'00"O a 24°26'21"S–47°03'54"O), cm distância intermediária em relação ao canal estuarino, a 943 metros; e **(3) Setor C – Trecho Praia Distal** (24°26'17"S–47°04'46"O a 24°26'13"S–47°03'40"O), mais distante do canal estuarino, a 1.400 metros.

O Município de Santos (SP) está localizado no Litoral Centro do Estado de São Paulo, fazendo parte da Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS), que se caracteriza por elevado adensamento populacional humano (1,9 milhões de habitantes, segundo o IBGE, 2021). Comporta, também, uma das principais áreas industriais do país, com 23 complexos de indústrias, 111 fábricas e mais de 300 fontes poluentes (Galvão-Filho, 1987; Pinheiro *et al.*, 2013; 2017), além do Porto de Santos, o maior da América do Sul (Angeli *et al.*, 2021). Devido a tais impactos antrópicos, apresenta várias fontes poluentes, que agem sobre os ecossistemas costeiros e seus organismos (Oliveira *et al.*, 2008; Perina *et al.*, 2018).

No Município de Peruíbe (SP), está situada a Estação Ecológica Juréia-Itatins (ESEC Juréia-Itatins), uma Unidade de Conservação (UC) sob égide estadual, reconhecida pelo

Decreto nº 24.646/1986 e regulamentada pela Lei nº 5.649/1987 (São Paulo, 1987), que foi convertida em Mosaico de Unidades de Conservação pela Lei nº 12.406/2006 (São Paulo, 2006), tendo a Barra do Una como Reserva de Desenvolvimento Sustentável (RDS). Tendo isso em vista, a Praia da Juréia é considerado um local com elevado grau de conservação ambiental, possuindo um baixo adensamento populacional humano (162 habitantes, segundo Duarte *et al.* 2016).

Importante destacar que estas duas áreas foram escolhidas por diferirem quanto a sua qualificação ambiental histórica, sendo uma delas antropizada (*STS*: Praia de Santos – Município de Santos) e outra preservada (*JUR*: Praia da Juréia – Município de Peruíbe), tendo como respaldo os estudos de Pinheiro *et al.* (2013) e Duarte *et al.* (2016).

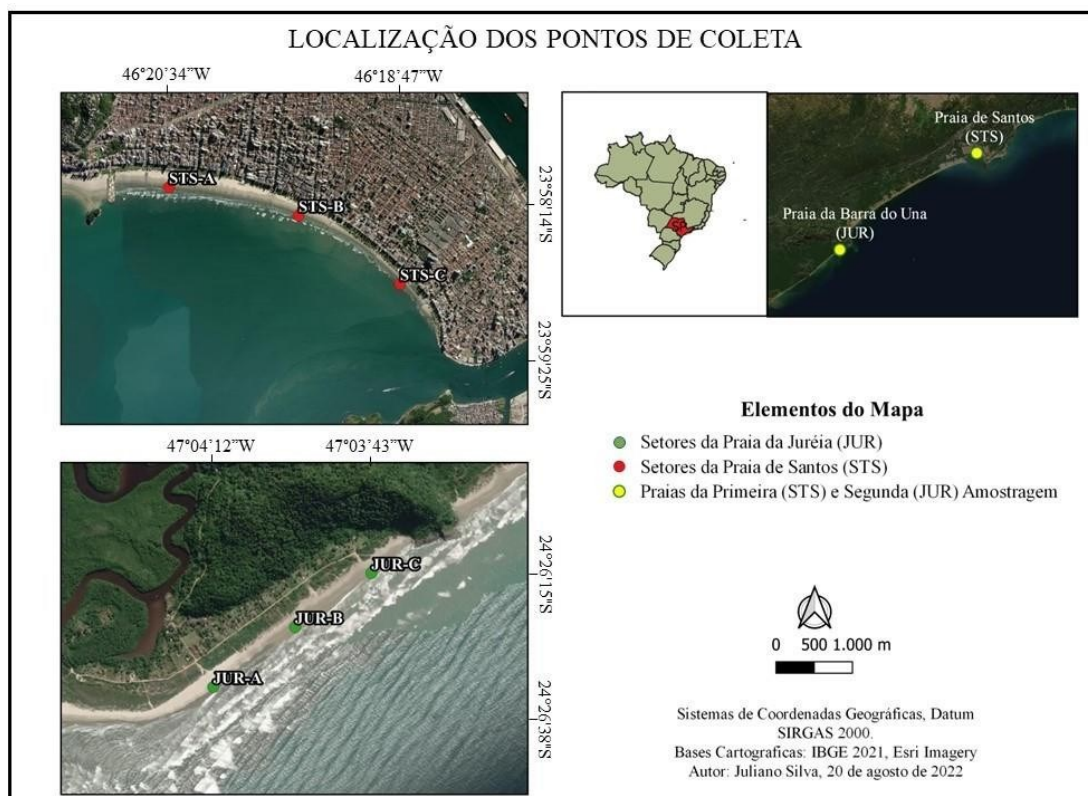


Figura 1. Localização dos setores amostrais (A, B e C) das duas praias do Estado de São Paulo (*STS*, Praia de Santos; e *JUR*, Praia da Juréia), estabelecidos para a coleta das amostras de sedimento e dos camarões-fantasma (*Callichirus corruptus*).

Referências Bibliográficas

- Abessa, D.M.S.; Sousa, E.C.P.M.; Rachid, B.R.F. & Mastroti, R.R. 2001. Sediment Toxicity in Santos Estuary, SP–Brazil: Preliminary Results. *Ecotoxicology And Environmental Restoration*, 4(1): 6–9.
- Adam, M.L.; Torres, R.A.; Boos, H. & Pinheiro, M.A.A. 2023. Espécies sentinelas: Monitoramento Ambiental com base em biomarcadores de efeito cito–e genotóxico. *Revista CEPSUL–Biodiversidade e Conservação Marinha*, 12: e2023002.
- Adams, S.M. 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *American Fisheries Society Symposium*, 8: 1–8.
- Ahearn, G.A.; Mandal, P.K. & Mandal, A. 2004. Mechanisms of heavy–metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 17: 439–452.
- Angeli, J.L.F.; Sartoretto, J.R.; Kim, B.S.M.; Ferreira, P.A.; Mahiques, M.M. & Figueira, R.C.L. 2021. Trace element fluxes during the “Anthropocene” in a large South American industrial and port area (Santos and São Vicente estuarine system, SE, Brazil). *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(9): 594.
- Antó, M.; Arnau, S.; Buti, E.; Cortijo, V.; Gutiérrez, E. & Solé, M. 2009. Characterization of integrated stress biomarkers in two deep-sea crustaceans, *Aristeus antennatus* and *Nephrops norvegicus*, from the NW fishing grounds of the Mediterranean Sea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5): 1455–1462.
- Basu, N.; Scheuhammer, A.M.; Bursian, S.J.; Elliott, J.; Rouvinen–Watt, K. & Chan, H.M. 2007. Mink as a sentinel species in environmental health. *Environmental Research*, 103(1): 130–144.
- Berkenbusch, K. & Rowden, A.A. 2003. Ecosystem engineering—moving away from 'just-so' stories. *New Zealand Journal of Ecology*, 67–73.
- Birkeland, C., 1989. The Faustian traits of the crown–of–thorns starfish. *American Science*, 77(2): 63–154.
- Borga K. & Souza, A.V. 2001. Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution*, 113(2): 187–198.
- Brasil, 2013. Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução Anvisa nº 42, de 29 de agosto de 2013. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0042_29_08_2013.html. Acessado em: 2 maio 2022.
- Burton, G.A. & Macpherson, C. 1995. Sediment toxicity testing issues and methods. In: Hoffman, D.J.; Rattner, B.A.; Burton, G.A. & Cairns, J. (Eds.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, Vol. 1: 1312p.
- Burton, G.A.; Baudo, R.; Beltrami, M. & Rowland, C. 2001. Assessing sediment contamination using six toxicity assays. *Journal of Limnology*, 60(2): 263–267.

- Buzzi, N.S.; Menéndez, M.C.; Truchet, D.M.; Delgado, A.L. & Severini, M.F. 2022. An overview on metal pollution on touristic sandy beaches: Is the COVID–19 pandemic an opportunity to improve coastal management? *Marine. Pollution. Bulletin*, 174, e113275.
- Cabrini, T.M.; Barboza, C.A.; Skinner, V.B.; Hauser–Davis, R.A.; Rocha, R.C.; Saint'Pierre, T.D. & Cardoso, R.S. 2018. Investigating heavy metal bioaccumulation by macrofauna species from different feeding guilds from sandy beaches in Rio de Janeiro, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162: 655–662.
- Cajaraville, M.P.; Bebianno, M.J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C. & Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of The Total Environment*, 247(2–3): 295–311.
- Carmo, C.V.; Martins, L.M.P.; Abessa, D.M.S. & Crespo, M.L.L. 2004. Contaminação química. toxicidade de sedimentos hídricos e acúmulo de elementos metálicos em caranguejos de manguezais de Itanhaém. *O Mundo da Saúde*, 28: 450–455.
- Cesar, A.; Choueri, R.B.; Gusso–Choueri, P.K. & Pereira, C.D.S. 2012. Integrative approach for the environmental quality assessment of aquatic ecosystems: A critical review. *Global Journal of Environmental Science and Technology*, 1: 2–9
- Constantino, W.D.; Ferreira, K.A.; Zalmon, I.R. & Soares-Gomes, A. 2024. Short-term changes in the spatial distribution of the ghost shrimp *Callichirus corruptus* (Decapoda: Axiidea, Callichiridae) from southwestern Atlantic. *Marine Biology.*, 171(1): 37.
- Costa, L.L.; Soares-gomes, A.; Zalmon, I.R.; 2021. Burrow occupation rates and spatial distribution within habitat of the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787): implications for impact assessments. *Reginal Studies of Marine Science*; 44: e10169.
- Duarte, L.F.; 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 areas from the western Atlantic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133: 176–187.
- Duarte, L.F.; Souza, C.A.; Pereira, C.D.S. & Pinheiro, M.A.A. 2017. Metal toxicity assessment by sentinel species of mangroves: In situ case study integrating chemical and biomarkers analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 367–376.
- Duarte, L.F.A.; Moreno, J.B.; Catharino, M.G.M.; Moreira, E.G.; Trombini, C. & Pereira, C.D.S. 2019. Mangrove metal pollution induces biological tolerance to Cd on a crab sentinel species subpopulation. *Science of the Total Environment*, 687: 768–779.
- Duarte, L.F.A.; Moreno, J.B.; Catharino, M.G.M.; Moreira, E.G.; Trombini, C.; Nobre, C.R.; Moreno, B.B.; Abessa, D.M.S. & Pereira, C.D.S. 2020. Lead toxicity on a sentinel species subpopulation inhabiting mangroves with different status conservation. *Chemosphere*, 251: 126394.
- Eisler, R. 2010. Crustaceans. In: Eisler, R. (Ed.). **Compendium of Trace Metal in Marine Biota**. Amsterdam: Elsevier, Vol. 1: 577p.
- Fishelson, L.; Bresler, V.; Manelis, R.; Zuk–Rimon, Z.; Dotan, A.; Hornung, H. & Yawetz, A. 1999. Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment. *Science of the Total Environment*, 226(2–3): 121–131.
- Galvão–Filho, J.B. 1987. Controle da poluição ambiental: Cubatão, filosofia e conceito. *Revista Ambiente*, 1(2): 70–73.

- GERIN – Gerência de Inteligência de Mercado e Estatísticas. 2022. Mensário Estatístico do Porto de Santos (fevereiro/2023). Disponível em: https://intranet.portodesantos.com.br/docs_codesp/doc_codesp_pdf_site.asp?id=141031 >. Acessado em: 20 de março de 2023.
- Goulart, M. & Callisto, M. 2003. Bioindicadores de Qualidade de Água como Ferramenta em Estudos de Impacto Ambiental. *Revista da FAPAM*, 2(1): 156–164.
- Hernaéz, P.; Miranda, M.S.; Rio, J.P.P & Pinheiro, M.A.A. 2022. A new species of the ghost shrimp genus *Callichirus* Stimpson, 1866 (Decapoda: Axiidea: Callichiridae) from the southwestern Atlantic, long confounded with *C. major* (Say, 1818), with neotype designation and an illustrated key to the western Atlantic species. *Journal of Natural History*, 56(9–12): 533–563.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2021. Estatísticas Sociais. Disponível em: <https://ibge.gov.br>>. Acessado em: 07 julho 2022.
- Jones, C.G.; Lawton, J.H. & Shachak, M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Nordic Society Oikos*, 69(3): 130–147.
- Klerks, P.L.; Felder, D.L.; Strasser, K. & Swarzenski, P.W. 2007. Effects of ghost shrimp on zinc and cadmium in sediments from Tampa Bay, FL. *Marine chemistry*, 104(1–2): 17–26.
- Livingstone, D.R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 57(3):195–211.
- Luoma, S.N. & Rainbow, P.S. 2008. **Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Management**. New York: Cambridge University Press, Vol. 1: 98–99p.
- Oliveira, A.J.F.C.; Pinheiro, M.A.A. & Fontes, R.F.C. 2008. **Panorama Ambiental da Baixada Santista**. São Vicente: UNESP, Vol. 1: 127p.
- Peiró, D.F. 2012. *Status taxonômico de Callichirus major (Say, 1818) sensu lato (Crustacea, Decapoda, Axiidea, Callianassidae) da costa brasileira: taxonomia, sistemática molecular, biologia populacional e reprodutiva* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Perina, F.C.; Torres, R.J.; Mozeto, A.A.; Nascimento, M.R.L. & Abessa, D.M.S. 2018. Sediment quality assessment of the tributaries of the Santos-São Vicente Estuarine System–Brazil. *Ecotoxicology Environmental Contamination*, 13(2): 25–38
- Pinheiro, M.A.A.; Duarte, L.F.A.; Toledo, T.R.; Adams, M.A. & Torres, R.A. 2013. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucridae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(10): 8273–8285.
- Pinheiro, M.A.A.; Kriegler, N.; Souza, C.A. & Duarte, L.F.A. 2021. Feeding habit and lifestyle influence the baseline micronuclei frequency of crab species in pristine mangroves. *Wetlands*, 41: 30.
- Pinheiro, M.A.A.; Souza, C.A.; Zanutto, F.P.; Torres, R.A. & Pereira, C.D.S. 2017. The crab *Ucides cordatus* (Malacostraca, Decapoda, Brachyura) and other related taxa as environmental sentinels for assessment and monitoring of tropical mangroves from South

- America. In: Larramendi, M.L. (Ed.). **Ecotoxicology and Genotoxicology Non-traditional Aquatic Models**. London: Royal Society of Chemistry (RSC), Vol. 33: 538p.
- Pinheiro, M.A.A.; Souza, F.V.B.; Boos, H. & Duarte, L.F.A. 2022. Cytotoxicity, genotoxicity, and impact on populations of the mangrove sentinel species, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae) after an environmental disaster at Cubatão, São Paulo, Brazil. *Nauplius*, 30: e2022025.
- Rainbow, P.S. 2007. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability, and toxicity. *Environment International*, 33(4): 576–582.
- Rodrigues, S.A. & Shimizu, R.M. 1997. Autoecologia de *Callichirus major* (Say, 1818). *Oecol. Austral*, 3(1): 155–170.
- Rosa, L.C.; Freire, K.M.; & Souza, M.J. 2018. Spatial distribution and population dynamics of *Callichirus major* (Crustacea, Callinassidae) in a tropical sandy beach, northeastern Brazil. *Invertebrate Biology*, 137(4): 308–318.
- São Paulo, 1987. Lei nº 5.649, de 28 de abril de 1987, Cria a Estação Ecológica da Juréia-Itatins e dá outras providências. *Diário Oficial Estado de São Paulo*, 97(79): 1p.
- São Paulo, 2006. Lei nº 12.406, de 12 de dezembro de 2006, Altera a Lei n. 5.649, de 28 de abril de 1987, que criou a Estação Ecológica da Juréia-Itatins, exclui, reclassifica e incorpora áreas que especifica, institui o Mosaico de Unidades de Conservação da Juréia-Itatins, regulamenta ocupações. *Diário Oficial Estado de São Paulo*, 116(236): 1p.
- 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.
- Schmaltz, E.; Melvin, E.C.; Diana, Z.; Gunady, E.F.; Rittschof, D.; Somarelli, J.A. & Dunphy-Daly, M.M. 2020. Plastic pollution solutions: emerging technologies to prevent and collect marine plastic pollution. *Environment International*, 144, 106067.
- Schwacke, L.H.; Gulland, F.M. & White, S. 2013. Sentinel species in oceans and human health. Environmental toxicology: selected entries from the encyclopedia of sustainability. In: Laws, E.A. (Ed.). **Environmental Toxicology: Selected Entries from Encyclopedia of Sustainability Science and Technology**. New York: Springer, Vol. 1: 737p.
- Souza, J.D.; Borzone, C.A.; & Brey, T. 1998. Population dynamics and secondary production of *Callichirus major* (Crustacea: Thalassinidea) on a southern Brazilian sandy beach. *Archive of Fishery and Marine Research*, 46, 151–164.
- Souza, C.A.; Duarte, L.F.A.; Zanotto, F.P.; Ortega, P.; Moreira, R. G. & Pinheiro, M.A.A. 2022. Seasonal effect on biomarker responses in sentinel species: innovation in mangrove conservation status assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194: 425.
- Souza, J.R.B.; Machado, E.C.; Borzone, C.A. & Brandini, N. 1995. *Callichirus major* (Say, 1818) contribui significativamente para os fluxos bentônicos de praias arenosas? *Resumos do IV Congresso Latinoamericano de Ciencias del Mar*, 4: 190.
- Staton, J. L., & Felder, D. L. (1995). Genetic variation in populations of the ghost shrimp genus *Callichirus* (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea) in the western Atlantic and Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 56(2), 523–536.

- Stegeman, J.J. & Hahn, M. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. *Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives*, 1: 87–206.
- Tavares, T.M. & Carvalho, F.M. 1992. Avaliação de Exposição Humana a Elementos metálicos Pesados no Ambiente: Exemplos do Recôncavo Baiano. *Química nova*, 15(2): 147–152.
- Trevizani, T.H. 2018. **Bioacumulação e biomagnificação de metais pesados em teias tróficas de estuários do sul-sudeste do Brasil**. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO/USP), São Paulo, 179 p. (*Tese de Doutorado*).
- Trevizani, T.H.; Figueira, R.C.L.; Ribeiro, A.P.; Theophilo, C.Y.S.; Majer, A.P.; Petti, M.A.V. & Montone, R.C. 2016. Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms and sediments from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1–2): 366–371.
- Truchet, D.M.; Negro, C.L.; Buzzi, N.S.; Mora, M.C. & Marcovecchio, J.E. 2023. Assessment of metal contamination in an urbanized estuary (Atlantic Ocean) using crabs as biomonitors: A multiple biomarker approach. *Chemosphere*, 312: 137–317.
- Valbonesi, P.; Sartor, G. & Fabbri, E. 2003. Characterization of cholinesterase activity in FCUP 14 Biomonitoring of coastal contamination using a biomarker approach: the use of *Pollicipes pollicipes* as a sentinel species three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Science Total Environment*, 312(1–3): 79–88.
- Van der Schalie, W.H.; Gardner, H.S.; Bantle, J.A.; De Rosa, C.T.; Finch, R.A.; Reif, J.S. & Stokes, W.S. 1999. Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107(4): 309–315.
- Wu, M.; Lin, Y.P.; Ruiz-Fernandez, A.C. & Sahu, B.K. 2023. Coastal environmental and ecological data analysis. *Frontier of Marine Science*, 9, e1126086.
- Xuereb, B.; Noury, P.; Felten, V.; Garric, J. & Geffard, O. 2007. Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology*, 236(3): 178–189.

Capítulo I – Contaminação por metais no Camarão-Fantasma *Callichirus corruptus* e nos sedimentos de duas praias arenosas do Estado de São Paulo, com diferentes níveis de antropização.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo central, a avaliação da concentração de 10 elementos metálicos (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, V e Zn), em tecidos do camarão-fantasma *Callichirus corruptus* (*G*, gônadas; *H*, hepatopâncreas; e *M*, musculaturas), assim como no sedimento onde ele vive, considerando duas praias arenosas do Estado de São Paulo, que contrastam quanto ao seu *status* de antropização (*JUR*, Juréia: praia preservada; e *STS*, Santos: praia antropizada). Para isso, tanto os camarões como o sedimento de cada praia foram coletados com o auxílio de uma bomba de sucção. As amostras de sedimento passaram por análise de granulometria, matéria orgânica e quantificação de metais, sendo registrada a fração granulométrica predominante, o tamanho médio do grão (*TMG*), o teor de matéria orgânica (*MO*%) e as concentrações metálicas, respectivamente. Para a composição das amostras bióticas foi utilizado um *pool* de sete indivíduos, estabelecendo uma amostra composta de cada tecido ($n = 3$ *pools*/setor praial). A análise de concentração metálica foi realizada pela técnica de Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (*ICP-MS*). Também foi avaliado o fator de bioacumulação (*B*), com base na razão entre a soma da concentração total de metais nos tecidos do camarão pela concentração de tecidos associados ao sedimento. No sedimento da praia de Santos preponderou a fração Areia Muito Fina ($AMF = 0,096$ mm), enquanto a Juréia foi categorizada como Areia Fina ($AF = 0,150$ mm). O teor de *MO* apresentou uma relação inversa com *TMG*, com menores valores em *JUR* (0,04 %), quando comparados a *STS* (0,14 %). A praia de Santos apresentou concentrações metálicas superiores às da Juréia para 88,9% dos metais estudados, com destaque ao cobre e arsênio, que foram de 1,6 a 3,2 vezes maiores em *STS*, respectivamente. As concentrações de metais no sedimento apresentaram correlação positiva com o teor de *MO* ($p \geq 0,63$; $p \leq 0,01$). Ao compararmos as concentrações de metais com os valores de Limite Máximo Tolerável (*LMT*) da Anvisa, que trata da contaminação de crustáceos, foi confirmado que *As*, *Cd* e *Cu* foram os únicos que superaram estes limiares, indicando inadequação para consumo humano, em ambas as praias. A hierarquia de acumulação metálica nos tecidos de *C. corruptus* foi $H > M > G$, independente da praia considerada. Foi verificada uma bioacumulação (*B*) dos elementos (*Cu* e *Zn*) em ambas as praias, como também de *As* apenas nos exemplares da Juréia. A associação de *MO* com os metais no sedimento pode ser explicada pela maior complexação destes elementos nesta matriz ambiental na praia de *STS*, decorrente de seu sedimento ser mais fino e com maior *MO*, alterando a biodisponibilidade desses metais. A maior concentração metálica em Santos pode ser explicada pelo elevado adensamento populacional e efeito de diversas fontes poluentes, entre elas com destaque às atividades portuárias. A maior concentração de metais no hepatopâncreas advém da importância desse órgão na detoxificação dos crustáceos, por possuir grandes concentrações de metalotioneínas. Portanto, o presente estudo fornece informações inéditas e úteis a respeito do *status* de contaminação do sedimento das duas praias avaliadas, assim como dos indivíduos de *C. corruptus*, podendo gerar políticas públicas de conservação deste ecossistema costeiro no Estado de São Paulo.

Palavras-chave: Bioacumulação, camarão-fantasma, Juréia, Santos, toxicidade.

1. Introdução

Os ambientes costeiros têm sofrido grande influência por impactos antrópicos, devido ao elevado adensamento populacional humano em áreas litorâneas, em especial aquelas associadas aos rios (Luoma & Rainbow, 2008; Pinheiro *et al.*, 2017). Tais interferências contribuem para a elevação das taxas de desmatamento (especialmente da mata ciliar de rios), construção de moradias irregulares em áreas de proteção ambiental e, principalmente, o aumento do descarte inadequado de contaminantes líquidos (*p. ex.*, esgotos domésticos e industriais não tratados) e resíduos sólidos nas regiões litorâneas (Goulart & Callisto, 2003; Rainbow, 2007; Eisler, 2010; Cesar *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2017).

As praias arenosas estão entre os ecossistemas mais afetados, já que vêm sofrendo alterações físico-químicas significativas, que têm afetado a distribuição de várias espécies de invertebrados (Cardoso *et al.*, 2016; Cabrini *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2023), bem como sua abundância (Osuala *et al.*, 2018; Koziol *et al.*, 2021) e diversidade (Nwabueze *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023). Devido às suas características peculiares, as regiões costeiras e estuarinas são importantes barreiras naturais aos poluentes (Karlioniene *et al.*, 2021; Hyndes *et al.*, 2022; Corte *et al.*, 2023), além de oferecerem outros relevantes serviços ecossistêmicos, como a ciclagem orgânica e de nutrientes, purificação da água, entre outros (Defeo *et al.*, 2009, 2021; Buzzi *et al.*, 2022; Liang *et al.*, 2024). Apesar da relevância dos ecossistemas costeiros marinhos, os estudos sobre poluentes em praias arenosas são escassos na literatura (Jonathan *et al.*, 2011; Santhiya *et al.*, 2011; Nagarajan *et al.*, 2013; Corte *et al.*, 2023).

Entre os poluentes de maior abrangência nos ecossistemas marinhos, os metais se destacam por sua ocorrência (Costa *et al.*, 2021), com incremento associado ao desenvolvimento industrial (Cajaraville *et al.*, 2000; Buzzi *et al.*, 2022) e expressiva toxicidade e permanência, tanto nos sedimentos como na biota marinha (Rainbow, 2007; Ahearn *et al.*, 2004; Luoma & Rainbow, 2008; Duarte *et al.*, 2017; Pinheiro *et al.*, 2017). Esses elementos metálicos podem **essenciais** (*p. ex.*, Cobre, *Cu*; Cromo, *Cr*; e Manganês, *Mn*), por fazerem parte de processos biológicos (Duarte *et al.*, 2017) ou **não essenciais** (*p. ex.*, Arsênio, *As*; Cádmio, *Cd*; Chumbo, *Pb*; e Mercúrio, *Hg*), devido ao seu grau de toxicidade e persistência ambiental, podendo causar contaminação mesmo em pequenas concentrações (Eisler, 2010; Duarte *et al.*, 2017; Trevizani, 2018). De acordo com a dosagem, esses metais podem promover elevado risco de poluição, ocorrendo uma maior mobilidade na água, onde são facilmente dissolvidos, transportados e modificados quimicamente (Abdennor, 2000; Harris & Santos, 2000;

Raknuzzaman *et al.*, 2016), enquanto se acumulam nos sedimentos e tecidos orgânicos, onde sua toxicidade é mais persistente (Ahearn *et al.*, 2004; Rainbow, 2007; Luoma & Rainbow, 2008; Vilhena *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2017).

A água atua no transporte dos elementos metálicos, que nela podem se dissolver e modificar quimicamente, fazendo com que sua concentração varie ao longo do tempo em função da distância das fontes poluentes (Harris & Santos, 2000; Raknuzzaman *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2021). Por outro lado, esses elementos são adsorvidos pelos sedimentos, se acumulando fortemente nessa matriz (Ahearn *et al.*, 2004; Rainbow, 2007; Vilhena *et al.*, 2012; Banci *et al.*, 2017; Perina *et al.* 2018). Do mesmo modo, os metais também podem se concentrar nos organismos, podendo ocorrer a biomagnificação na cadeia trófica, causando danos irreversíveis à biota local (Luoma & Rainbow, 2008; Duarte *et al.*, 2017; Trevizani *et al.*, 2023). Dessa forma, apenas 1% da poluição está associada à água, enquanto os sedimentos figuram como os principais reservatórios abióticos dos 99% restantes (Gaur *et al.*, 2005; Bartoli *et al.*, 2012). Portanto, através de suas características cumulativas, os sedimentos e os organismos tornam-se excelentes indicadores do *status* de contaminação nos ecossistemas (Hortellani *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.* 2017).

O processo de acumulação orgânica possibilita diferenciar quais são as concentrações metálicas normais para um local e uma espécie, bem como aquelas potencialmente tóxicas (Souza *et al.*, 2022). Concentrações de metais que superam o nível de normalidade podem desencadear distúrbios à comunidade de invertebrados bentônicos, como a elevação dos casos de doenças, mudanças nas taxas de mortalidade e declínios populacionais (Fishelson *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2016; Cabrini *et al.*, 2017), até a depleção da riqueza e diversidade biológica (Tavares & Carvalho, 1992; Abessa, 2002; Osuala *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2023).

A principal via de contaminação dos invertebrados bentônicos, seja por elementos metálicos e outros poluentes, ocorre pelo contato cutâneo direto ou ingestão do sedimento contaminado (Rainbow, 2007; Duarte *et al.*, 2020), repercutindo em redução do estado de preservação ambiental e efeitos deletérios à biota (García-Alonso *et al.* 2011; Castilioni *et al.*, 2018). Tal fato já foi confirmado para várias espécies de invertebrados, que respondem fisiológica e/ou geneticamente à diferentes níveis de contaminantes metálicos (Ryu *et al.*, 2011; Rumisha *et al.*, 2012; Cabrini *et al.*, 2017). Por isso, o uso de invertebrados na avaliação e monitoramento de impactos antropogênicos têm sido considerados fundamentais (Goulart & Callisto, 2003; Costa *et al.*, 2021).

Entre as espécies bentônicas, merecem atenção especial as “espécies-chave” de ecossistemas, devido a sua capacidade de promover alterações dos parâmetros físico-químicos e da comunidade local (Birkeland, 1989; Jones *et al.*, 1994). Neste sentido, os camarões-fantasma pertencentes à família Callianassidae, constituem um grupo de crustáceos bioturbadores dos sedimentos de praias arenosas, promovendo alterações significativas na química e textura dos sedimentos (Staton *et al.*, 1995; Rodrigues & Shimizu, 1997; Klerks *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2022).

Callichirus corruptus (Hernández *et al.*, 2022) é um camarão-fantasma (Callianassidae), endêmico, que se distribui ao longo de toda a costa brasileira (Hernández *et al.*, 2022), onde escava galerias nos sedimentos, desempenhando importantes funções ecológicas, como: **(1)** mudanças estruturais nas comunidades próximas; **(2)** alterações no ciclo biogeoquímico local; e **(3)** modificações nas propriedades físico-químicas do sedimento (Posey, 1986; Ziebis *et al.*, 1996; Rodrigues & Shimizu, 1997; Constantino *et al.*, 2024). Suas galerias permitem grande fluxo de água, incorporação de matéria orgânica e de poluentes a ela associados (Constantino *et al.*, 2024), assim de interferirem em processos funcionais de praias arenosas marinhas (Rodrigues & Shimizu, 1997; Hernández *et al.*, 2019).

Devido à influência do adensamento populacional humano na qualidade dos ambientes costeiros, o que ocorre pela intensificação das atividades industriais e domésticas, espera-se que as praias do Município de Santos (SP) se encontrem com um *status* de contaminação mais evidente (*vide* os estudos de Santana *et al.*, 2021; Izar *et al.*, 2022; Pusceddu *et al.*, 2022). Da mesma forma, o Sistema Estuarino Santos-São Vicente (SESSV) também apresenta elevado histórico de contaminação por conta do Porto de Santos, Parque Industrial de Cubatão, além do grande adensamento populacional humano nos municípios que abrange (Hortellani *et al.*, 2008). Segundo os relatórios da Cetesb (2001), existem várias indústrias com fontes potenciais de contaminação por metais, em especial nos canais estuarinos de Santos e Piaçaguera (Cubatão), nas seguintes áreas de atuação: indústria siderúrgica (*Cu*, *Mn*, *Ni* e *Zn*); refinaria de petróleo (*Cu*, *Cr*, *Ni*, *Hg* e *Zn*); indústrias químicas e petroquímicas (*Cd*, *Cu*, *Cr*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *Zn* e *Hg*); e indústrias de fertilizantes (*Pb*, *Ni* e *Zn*). O Porto de Santos também causa sérios impactos ecossistêmicos, o que intensifica o efeito local por ser o maior da América do Sul (Angeli *et al.*, 2021), onde as atividades de importação/exportação envolveram cerca de 57 milhões de toneladas de mercadorias por 452 embarcações de grande porte, apenas em abril/2024 (Dineg/Supor/Gerin, 2024). A maior dinâmica de embarcações pode acarretar aumento das concentrações de contaminantes metálicos (*p. ex.*, *Cu*, *Cr* e *Ni* – Förstner &

Wittmann, 1981; Gonçalves *et al.*, 2013), com alterações físico-químicas substanciais ao meio aquático.

A situação ambiental do Litoral Centro do Estado de São Paulo, onde se localiza a cidade de Santos, aliada às características bioecológicas do camarão-fantasma *Callichirus corruptus*, espera-se que ela possa ser utilizada como espécie sentinela ambiental, indicando áreas com diferentes níveis de contaminação. Para comprovar tal possibilidade, os dados foram registrados para duas praias arenosas, uma delas preservada, localizada na Estação Ecológica Juréia-Itatins (ESEC Juréia-Itatins), com 90% de seus ambientes sob proteção integral (Sanches, 2004), em contraste à uma praia urbana do Município de Santos, onde o histórico de impactos antrópicos é notório.

2. Objetivos e Hipóteses

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os níveis de 10 elementos metálicos (*As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn Ni, Pb, V e Zn*), presentes no sedimento de duas praias paulistas (Juréia e Santos), assim como sua concentração em tecidos de *C. corruptus* (musculatura, hepatopâncreas e gônadas), obtidos nestas mesmas praias.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os níveis de 10 elementos metálicos (*As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn Ni, Pb, V e Zn*) no sedimento arenoso de duas praias do Estado de São Paulo, com diferentes adensamentos populacionais humanos, sendo uma delas preservada (Praia da Juréia) e outra urbana (Praia de Santos);
- Associar a relação entre a concentração dos 10 elementos metálicos (*As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn Ni, Pb, V e Zn*), com a granulometria e teor de matéria orgânica do sedimento;
- Avaliar a concentração de 10 elementos metálicos (*As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn Ni, Pb, V e Zn*), em três tecidos (gônadas, hepatopâncreas e musculatura) de exemplares do camarão-fantasma *C. corruptus*, com avaliação de um possível contraste entre duas praias arenosas do Estado de São Paulo, com diferentes níveis de adensamento populacional humano: praia preservada (Juréia) vs. praia urbana (Santos).

2.3. Hipóteses

- **Hipótese I:** Um maior acúmulo de metais no sedimento arenoso ocorrerá na praia com maior teor de matéria orgânica (*MO%*) e menor tamanho médio do grão (*TMG*), com associação negativa significativa entre as variáveis;

- **Hipótese II:** Haverá uma maior concentração metálica associada ao sedimento da praia em local com maior adensamento populacional humano (*STS*), em contraste aos menores valores preconizados para a praia preservada (*JUR*); e
- **Hipótese III:** A concentração metálica nos tecidos de *C. corruptus* será mais elevada em uma praia antropizada (Santos), em contraste à praia preservada (Juréia), com a seguinte hierarquia de contaminação para os tecidos: hepatopâncreas > gônadas > musculatura.

3. Materiais e Métodos

3.1. Área de Estudo

Consulte o tópico “*Introdução Geral e Descrição da Área de Estudo*”.

3.2. Delineamento Amostral

Em cada praia, em seus três setores pré-estabelecidos (A, B e C), foram capturados 21 exemplares fêmeas de *C. corruptus*, por serem maiores do que os machos e, também, por apresentarem gônadas de maior porte (Rodrigues & Shimizu, 1997; Hernáez *et al.*, 2022). Desta forma, os animais tiveram seus tecidos agrupados segundo três *pools* amostrais (I, II e III), com sete exemplares cada (*vide* Fig. 2). Assim, para cada *pool* amostral os sete indivíduos foram dissecados e seus tecidos (*M*, musculatura; *G*, gônada; e *H*, hepatopâncreas), agrupados quanto ao tipo para uma análise de quantificação dos elementos metálicos (*vide* item correspondente, a seguir), totalizando três amostras de cada tecido por setor praial (n=9 amostras/praia). Em cada setor praial também foi obtida uma amostra composta do sedimento, tanto para o estrato superior (*STRI*: 0–15cm), como para o inferior (*STRII*: 30–45 cm), totalizando duas amostras por setor, cada uma delas dividida em duas porções para posterior processamento (*vide* item “*Amostragem e Processamento do Sedimento*”).

3.3. Amostragem e Processamento dos Sedimentos

Em cada setor praial foram realizadas amostras compostas de sedimentos, obtidas com auxílio de uma bomba de sucção, posicionada em local não bioturbado pela espécie, sempre entre as aberturas de galerias. Assim, cada amostra composta foi obtida a partir de cinco colunas de sedimento (45 cm), que após sucção, foram cuidadosamente dispostas sobre lona plástica para remoção do estrato superior (*STRI*: 0–15 cm) e inferior (*STRII*: 30–45 cm). As cinco porções de cada estrato de sedimento (*STRI* e *STRII*) foram dispostas em sacos devidamente identificados, homogeneizadas manualmente, totalizando cerca de 1 kg/estrato/setor praial, e acondicionadas em um freezer até o momento das análises.

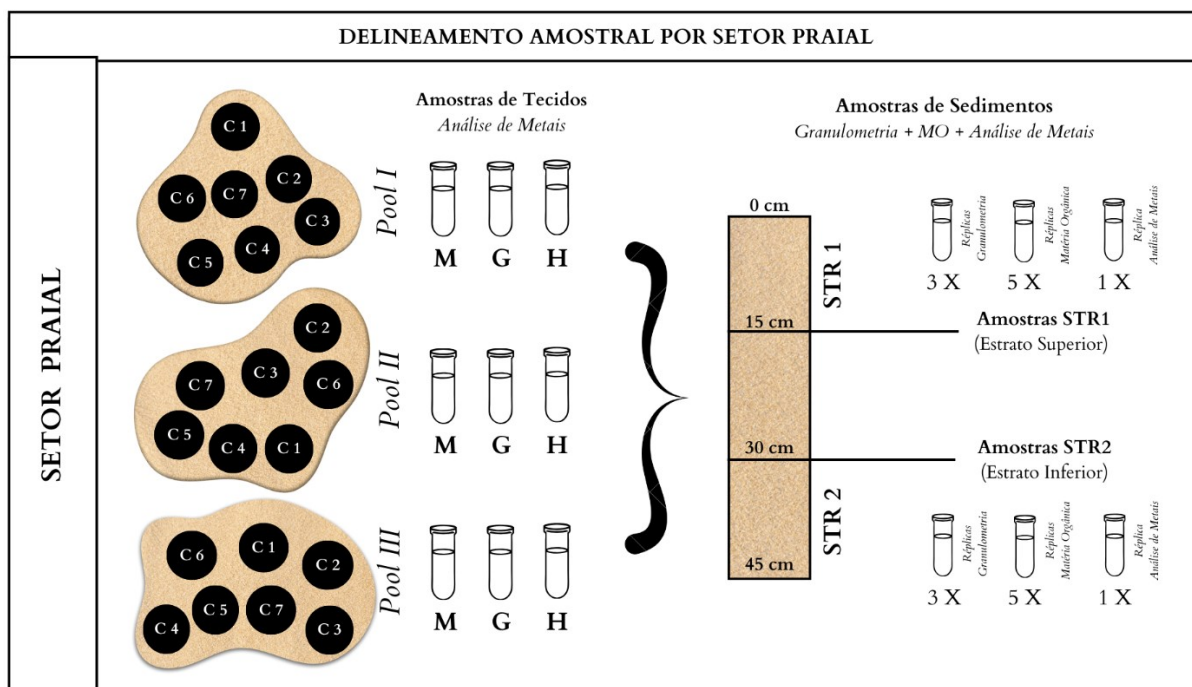


Figura 2. Delineamento amostral empregado para cada Setor Praial, nas duas praias em estudo. Onde: C1 a C7, identificação numérica de cada camarão por *pool* amostral; G, gônada (ovários); H, hepatopâncreas; M, musculatura; MO, matéria orgânica associada ao sedimento; STRI, estrato de sedimento superior (0 a 15 cm); STRII, estrato de sedimento inferior (30 a 45 cm).

As análises granulométricas e do teor de matéria orgânica nos sedimentos foram realizadas no *Laboratório de Biologia e Conservação de Crustáceos e Ambientes Costeiros (LBC)*, do *Instituto de Biociências da UNESP Campus do Litoral Paulista (IB/CLP)*, sede do *Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos (CRUSTA)*, seguindo os métodos indicados por Negreiros-Fransozo *et al.* (1991).

De cada uma das amostras de sedimentos foram reservadas três réplicas de 100 g para a análise granulométrica por setor amostral, as quais foram submetidas a uma estufa de ventilação forçada de ar (60°C, por 72h), até a estabilização do peso seco, com posterior aplicação da técnica de peneiramento diferencial em sete frações granulométricas (C, cascalho: $\geq 2\text{mm}$; AMG, areia muito grossa: 2-1mm; AG, areia grossa: 1-0,5mm; AM, areia média: 0,5-0,25mm; AF, areia fina: 0,25-0,15mm; AMF, areia muito fina: 0,15-0,05mm; e S+A, silte e argila: $< 0,05\text{mm}$). Para cada praia a média de peso (em gramas) foi estabelecida para cada fração granulométrica, utilizando as amostras por setor praial ($n = 3$), com posterior somatória para gerar 1.000 gramas para o total delas. Estes dados foram submetidos ao programa *Sysgran* (*vide* Camargo, 2006), para a categorização verbal da composição do sedimento, bem como cálculo do tamanho médio do grão (TMG), expresso pela equação $TMG = (\phi 84 - \phi 16) / 4 + (\phi$

$95 - \phi 5) / 6,6$ (vide Folk & Ward, 1957), que no presente estudo foi transformado de ϕ para milímetros, pela equação $TMG \text{ (mm)} = 1/2 \phi$.

Para cada setor praial cinco réplicas de 10 g de sedimento seco e com peso estabilizado foram submetidas a um forno mufla (500°C, por 3 horas), para a quantificação do teor de matéria orgânica do sedimento (em %), pelo método do peso livre das cinzas.

Subsequentemente foram reservadas amostras de 15 g de sedimento seco por setor, que foram acondicionadas em tubos Falcon (15 mL), devidamente etiquetados e reservados para transporte ao *Laboratório de Química Inorgânica Marinha (LaQIMar)*, do *Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO/USP)*, onde foram executadas as análises de quantificação de elementos metálicos (vide item “*Análise Quantitativa de Elementos Metálicos*”).

3.4. Amostragem de *Callichirus corruptus*

Os camarões foram capturados com uma bomba de sucção simples (vide Rodrigues & Shumizu, 1997), sendo cada galeria sendo submetida a no máximo cinco sucções seguidas. O material sugado a cada tentativa foi disposto sobre uma peneira (55 cm diâmetro e 6 mm de malha). Após serem capturados, os exemplares foram colocados vivos em um balde com água do mar do local de coleta e mantidos sob aeração por um compressor a pilhas, para seu transporte até a *UNESP IB/CLP*.

Em cada setor praial foram coletados 21 exemplares de *C. corruptus*, totalizando 63 exemplares por praia e 126 exemplares para o presente estudo. Além disso, 16 exemplares (08 machos e 08 fêmeas) compuseram dois lotes testemunho ($n=4$ exemplares cada), que foram depositados na *Coleção de Crustáceos Decápodos*, do *Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos (CRUSTA)*, na *UNESP IB/CLP*.

3.5. Biometria de *Callichirus corruptus*

Os animais capturados foram medidos com um paquímetro analógico de precisão (0,05 mm), com o registro de três variáveis biométricas: comprimento de carapaça (*CC*), desde a margem pós-orbital até a margem posterior do cefalotórax; comprimento da área oval (*CAO*), pela maior dimensão desta estrutura na região dorsal do cefalotórax; e comprimento total (*CT*), pela distância desde a margem pós-orbital até a extremidade distal do telson. Cada indivíduo também

teve seu peso úmido total (*PE*) registrado em balança digital de precisão (0,01g). Os exemplares com perda de apêndices ou quebra das estruturas já referidas não foram utilizados nas análises.

3.6. *Preparo das Amostras de Tecidos*

Os exemplares foram dissecados com auxílio de tesouras e pinças, visando a remoção de tecidos das três estruturas corpóreas em estudo (gônadas, *G*; hepatopâncreas, *H*; e musculatura, *M*). A musculatura foi coletada na região abdominal de cada exemplar, enquanto os demais tecidos foram removidos após incisão longitudinal-mediana, na região dorsal do abdômen, visando a composição do *pool* amostral já citado ($n = 7$ exemplares/*pool*), cada um deles armazenado em tubo Falcon (50 mL). Cada tubo teve seu conteúdo devidamente homogeneizado, recebendo identificação quanto à praia (*STS*, Santos; ou *JUR*, Juréia), setor praial (*A*, *B* ou *C*), *pool* amostral (*I*, *II* ou *III*) e tecido de referência (*G*, *H* e *M*), finalizando em um código abreviado (*p. ex.*, *JUR-B-II-H*).

Os tubos Falcon ($n=9$ /tecido/praia) foram pesados individualmente em uma balança analítica (0,01g), para registro do peso úmido de cada amostra de tecido (*PU*), bem como seu peso seco após liofilização (*PS*), sendo reservados para a análise dos elementos metálicos – *vide* item “*Análise Quantitativa de Elementos Metálicos*”.

3.7. *Análise Quantitativa dos Elementos metálicos*

Todas as amostras de sedimentos e tecidos em tubos Falcon (15mL) foram submetidas à liofilização (*VirTis BenchTop Pro*[®] – Scientific Products[®]), do *Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais*, da *UNESP/IB/CLP*. Após este processo, as amostras foram reservadas sob refrigeração e transportadas em caixas térmicas com gelo-gel, até o *LaQIMar* do *IO/USP*, onde foram efetuados os procedimentos de digestão das amostras e quantificação de elementos metálicos (*As*, *Cd*, *Cr*, *Cu*, *Hg*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V* e *Zn*).

As amostras de sedimentos secos foram submetidas à digestão seguindo a Técnica 3050B (USEPA, 1996), com uso de 1g/estrato (*STRI* e *STRII*), para cada setor praial, que foram dispostas em chapa térmica (95°C), com adição de HNO₃ concentrado, em três etapas (1^a: 5 mL, por 10 min; 2^a: 2,5 mL, por 30 min; e 3^a: 2,5 mL, por 90 min). Em seguida, ainda sob a chapa, foi adicionado 1 mL de H₂O₂ com 1,5 mL de água Milli-Q[®] (2 h), com posterior adição de 1mL de H₂O₂ (a cada 30 min), até serem completados 5 mL de solução. Posteriormente,

foram acrescentados 5mL de HCl (15 min) até o final do processo, quando a solução foi retirada da chapa e colocada para resfriar e avolumar a 50 mL, com água Milli-Q®.

As amostras bióticas foram submetidas ao método de digestão ácida, adaptado de Moreira *et al.* (2010) e detalhado por Trevizani *et al.* (2016), onde 0,15 g do peso seco de cada *pool* amostral/tecido receberam 4 mL de ácido nítrico, por 8 h, além de 1 mL de H₂O₂, por 15 h. Assim, foram processados um total de 18 *pools* amostrais/tecido para as duas praias em estudo (9 *pools* amostrais/praias). Após 15 horas, os analitos tratados foram dispostos em um bloco digestor aquecido (90°C, durante 3 h). Após o resfriamento, foi acrescida água Milli-Q®, até que a solução final chegasse a 15 mL, para a quantificação de nove elementos selecionados (*As*, *Cd*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V* e *Zn*).

No caso do mercúrio (*Hg*), a quantificação nas amostras exigiu uma digestão diferenciada, utilizando uma adaptação do Método 7471A (USEPA, 1994), no qual foram utilizados 0,6 g por amostra seca (tecido ou sedimento), que foram acondicionadas em tubos Falcon, com adição de 1,7 mL de água régia (1 HNO₃: 3 HCl) + 1,7 mL de água Milli-Q®. Após essas adições, a solução passou por um banho de água (90°C, por 2 min) e, posteriormente, por um processo de resfriamento. Em seguida, ocorreu o acréscimo de 4,9 mL de permanganato de potássio (5%) e de 16,4 mL de água Milli-Q®, seguida de um novo banho de água (90°C, por 30 min). Após isso, a solução passou por outro resfriamento e adição de 2 mL de cloridrato de hidroxilamina (12%), com elevação do volume da solução para 40 mL, seguido de filtragem.

As amostras abióticas e bióticas tiveram os elementos metálicos (*As*, *Cd*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V* e *Zn*) quantificados pela técnica de Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES – Varian, Modelo 710ES). As concentrações de elementos metálicos foram expressas em função do peso seco (µg/g = mg/kg).

Os valores de referência para os elementos metálicos presentes nos tecidos foram estabelecidos de acordo com os limites permissivos em alimentos designados como crustáceos, conforme a Resolução ANVISA nº 42/2013 (Brasil, 2013). Para as amostras de sedimentos foram utilizados os valores estipulados pela *Canadian Environmental Quality Guidelines* (CCME, 2002), utilizando os limites aceitáveis para a concentração de elementos metálicos, a saber: *ISQGs* (*Interim Sediment Quality Guidelines*), abaixo do qual não ocorre efeito adverso à comunidade biótica; e *PEL* (*Probable Effects Level*), acima do qual é provável que ocorram efeitos adversos à comunidade biótica.

3.8. Fator de Bioacumulação

O fator de Bioacumulação (B) foi estipulado com base no estudo de Trevizani *et al.* (2023), seguindo a equação $B = CM_{Cam}/CM_{Sed}$, onde o valor de B resulta da divisão da concentração metálica em *C. corruptus* (CM_{Cam}) pela concentração metálica do sedimento (CM_{Sed}). Para calcular concentração metálica no camarão-fantasma, foi utilizada a seguinte equação $CM_{cam}=CM_{Pool}/n$, onde é calculada a concentração individual pela razão da concentração do *pool* amostral (CM_{Pool}) pelo número de indivíduos em cada *pool* (n). A confirmação da bioacumulação foi baseada no trabalho de Trevizani *et al.* (2016), quando o valor foi superior à unidade.

O estudo estipulou ainda, a diferença textual entre os termos: **(1) Bioacumulação**, com referência aos valores relacionados ao fator B do presente estudo; e **(2) Acúmulo, Bioconcentração ou Concentração**, para o caso das concentrações resultantes da análise de quantificação dos elementos metálicos.

3.9. Matriz de Associação

Para a realização da análise de componentes principais (*PCA*), assim como para os testes de correlações adequados (*Pearson* ou *Spearman*), foram construídas duas matrizes abióticas, com as variáveis do sedimento. A **Matriz I (12x10) – Elementos Metálicos, Matéria Orgânica e Tamanho Médio do Grão**, foi construída com 12 linhas (06 amostras de cada estrato do sedimento: 06 STRI + 06 STRII) vs. 10 colunas (08 variáveis metálicas: As, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V e Zn; teor de matéria: *MO*; e tamanho médio do grão: *TMG*). Já a **Matriz II (12x9) – Avaliação das Características Sedimentares**, teve sua construção com 12 linhas (*idem* a Matriz I) vs. 09 colunas (08 frações granulométricas: *C*, *AMG*, *AG*, *AM*, *AF*, *AMF*, *AS*; teor de matéria: *MO*; e tamanho médio do grão: *TMG*).

Devido às diferentes ordens de grandeza das variáveis de cada matriz, elas foram inicialmente log-transformadas por $Y = \text{Log}(X+I)$, para uma padronização anterior às análises.

3.10. Análises Estatísticas

Os dados registrados foram digitados e organizados em planilhas eletrônicas do *Microsoft Excel*[®] 2019, enquanto o *R Studio* v. 1.4.1106 (Ihaka & Gentleman, 1996) foi empregado para as análises estatísticas e construção dos gráficos.

As variáveis quantitativas das concentrações de elementos metálicos nas amostras bióticas e abióticas foram previamente submetidas aos testes de pressupostos de homogeneidade das variâncias (*L*, Levene) e de normalidade (*SW*, Shapiro–Wilk). Para os dados confirmados como homocedásticos e normais ($p > 0,05$), foram submetidos a testes paramétricos como a ANOVA (*F*) ou teste-t de *Student* (*t*), para o confronto de médias para um mesmo parâmetro para mais do que três situações ou numa abordagem entre as duas praias (*STS* vs. *JUR*), respectivamente. Porém, os dados confirmados como não normais e heterocedásticos ($p \leq 0,05$), foram submetidos a testes não paramétricos, como Kruskal-Wallis (*H*) ou Wilcoxon (*W*), confrontando medianas de uma mesma variável para acima de três ou apenas duas situações, respectivamente.

Foram aplicados testes de comparação simples (*t* ou *W*) para contrastar as medidas de tendência central entre as duas praias, levando em consideração as seguintes variáveis: **(1) biométricas** (*CC*, *CAO*, *CT* e *PE*); **(2) abióticas**, representadas por aquelas metálicas (*As*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Pb*, *V*, *Ni* e *Zn*), granulométricas (*C*, *AMG*, *AG*, *AM*, *AF*, *AMF*, *AS*), *MO* e *TMG*; e **(3) bióticas**, abrangendo as metálicas (*As*, *Cd*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *V* e *Zn*) Já para o confronto das medidas de tendência central das concentrações dos elementos metálicos (*As*, *Cd*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *V* e *Zn*) entre os tecidos (*G*, *H* e *M*) de *C. corruptus* de uma mesma praia, foram utilizados uma análise de variância (ANOVA ou Kruskal-Wallis), seguidos de um teste *a posteriori* (Tukey e Dunn, respectivamente), com correção pelo método de Bonferroni para análises repetidas.

As frações granulométricas (*C*, *AMG*, *AG*, *AM*, *AF*, *AMF*, *S+A*, em gramas), tamanho médio do grão (*TMG*, em milímetros) e teor de matéria orgânica (*MO*, em porcentagem) associado ao sedimento, foram avaliadas em associação à concentração de cada um dos nove elementos metálicos nas amostras desta matriz abiótica ($n = 12$). Para isso, os dados foram submetidos a uma análise de correlação de Spearman (ρ), empregando a função *cor*, do pacote *stats*.

Em todas as análises anteriores, o nível de significância estatística foi estabelecido em 5%.

4. Resultados

4.1. Variáveis Abióticas: Granulometria, TMG e MO% dos Sedimentos

Quando comparamos a concentração dos elementos metálicos entre os estratos de sedimentos (*STRI* e *STRII*) das duas praias, foi observado que não houve diferença significativa entre eles, para qualquer um dos 10 elementos metálicos avaliados, seja para JUR ($t \geq 0,41$; $p \geq 0,58$) ou para STS ($t \geq 1,05$; $p \geq 0,26$). Tal fato possibilita utilizar indistintamente as amostras destes estratos, por ocasião do confronto entre as duas praias em estudo.

O tamanho médio do grão (TMG) diferiu significativamente entre as praias ($W = 324,00$; $p \leq 0,01$), com uma mediana 64% menor em Santos (0,096 mm), em comparação à da Juréia (0,150 mm). Isso se coaduna à fração granulométrica predominante em cada praia (JUR: AF, areia fina; STS: AMF, areia muito fina), explicada pela diferença significativa constatada para quatro frações granulométricas (AMG, AG, AF e AMF: $W \leq 324$; $p \leq 0,01$), em especial para AF (JUR: 702,7 g $\neq$ STS: 138,2 g), com a mediana da Juréia sendo cinco vezes superior à de Santos, e para AMF (JUR: 255,9 g $\neq$ STS: 820,4 g, que em Santos superou três vezes à mediana da Juréia JUR (Tab. 1). No caso do teor de matéria orgânica associado ao sedimento (MO), as amostras dessas duas praias também diferiram significativamente ($W = 2,00$; $p < 0,05$), sendo quatro vezes maior no sedimento das praias de Santos (0,12 %), em relação aos valores da Juréia (0,03 %).

4.2. Variáveis Abióticas: PCA e Análise de Associação de Variáveis nos Sedimentos

Na análise de componentes principais (PCA) (Fig. 3) foi identificado que 96,3% da variância foi explicada por duas componentes principais (PC1 e PC2). Os vetores das variáveis MO e TMG apresentaram sentidos antagônicos, com maiores valores de MO direcionados ao sedimento de Santos, enquanto os maiores valores de TMG estão voltados para a Juréia. A análise também torna evidente, que os vetores de sete concentrações metálicas estão direcionados aos três setores de Santos, junto ao vetor de MO, mostrando sua associação aos referidos elementos metálicos.

Tabela 1. Composição do sedimento em duas áreas praiais (*JUR*, Juréia; e *STS*, Santos – n=6/praia), registrada em novembro e dezembro/2022, respectivamente, em relação às sete frações granulométricas (*C*, cascalho; *AMG*, areia muito grossa; *AG*, areia grossa; *AM*, areia média; *AF*, areia fina; *AMF*, areia muito fina; e *SA*, silte + argila), tamanho médio do grão (*TMG*) e teor de matéria orgânica (*MO*). Onde: *Min*, valor mínimo; *Max*, valor máximo; *x*, média; *s*, desvio padrão; *Md*, mediana; *W*, teste de Wilcoxon.

	Variáveis Edáficas	Local	Sumário de Valores (g)				Teste <i>W</i>
			<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>x</i> ± <i>s</i>	<i>Md</i>	
Frações Granulométricas (g)	<i>C</i>	<i>JUR</i>	0,1	0,2	0,1 ± 0,0	0,1 a	150
		<i>STS</i>	0,2	0,3	0,3 ± 0,1	0,3 a	
	<i>AMG</i>	<i>JUR</i>	0,0	2,1	0,7 ± 0,6	0,4 a	0
		<i>STS</i>	3,8	8,9	5,8 ± 1,5	5,7 b	
	<i>AG</i>	<i>JUR</i>	0,1	7,1	3,2 ± 2,5	2,9 a	1
		<i>STS</i>	6,2	7,1	10,3 ± 2,0	10,4 b	
	<i>AM</i>	<i>JUR</i>	6,1	99,7	39,9 ± 36,4	21,9 a	221
		<i>STS</i>	11,5	17,7	14,0 ± 1,7	14,4 a	
	<i>AF</i>	<i>JUR</i>	649,3	721,3	693,7 ± 25,1	702,7 b	324
		<i>STS</i>	125,1	146,5	137,9 ± 6,1	138,2 a	
	<i>AMF</i>	<i>JUR</i>	180,6	311,1	250,1 ± 34,3	255,9 a	0
		<i>STS</i>	811,9	835,5	821,6 ± 6,7	820,4 b	
	<i>As</i>	<i>JUR</i>	7,3	27,5	12,5 ± 4,5	11,8 a	201
		<i>STS</i>	1,2	16,7	10,4 ± 3,8	10,9 a	
	<i>TMG</i> (mm)	<i>JUR</i>	0,1	0,2	0,15 ± 0,01	0,15 b	324
		<i>STS</i>	0,1	0,1	0,09 ± 0,00	0,09 a	
	<i>MO</i> (%)	<i>JUR</i>	0,1	0,1	0,04 ± 0,02	0,03 a	2
		<i>STS</i>	0,1	0,4	0,14 ± 0,06	0,12 b	

* Médias de uma mesma variável, seguidas por letras distintas, evidenciam diferença significativa entre as praias em relação às medianas, pelo teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

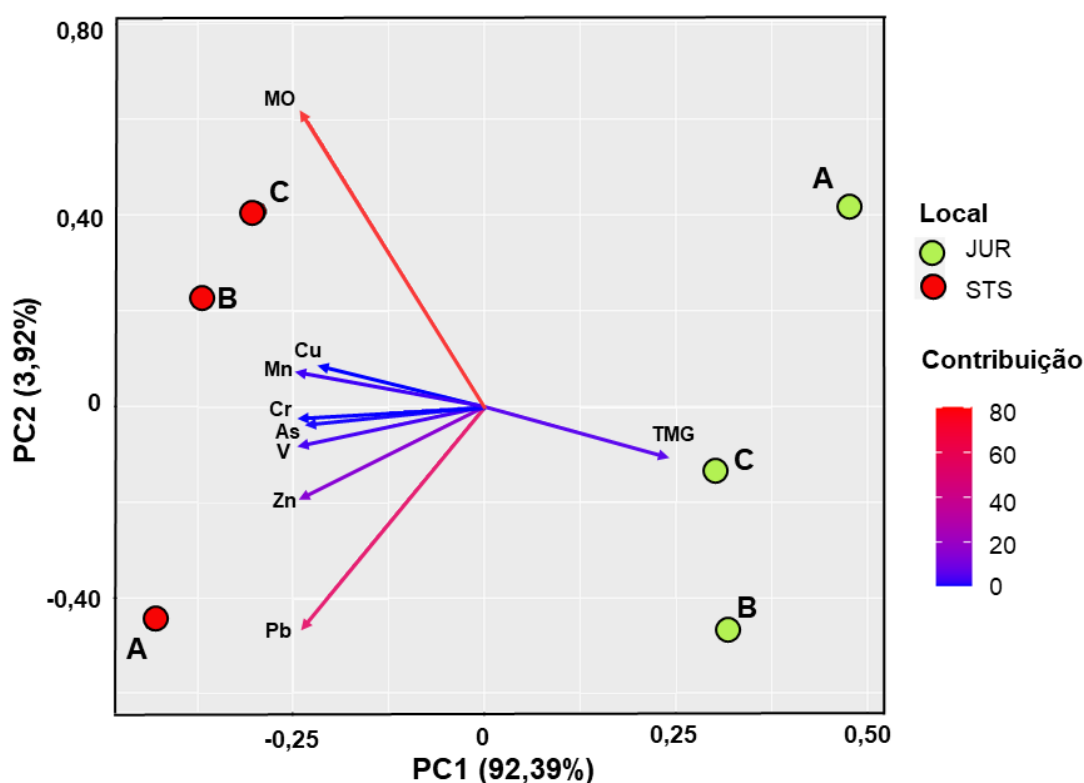


Figura 3. Análise de componentes principais (*PCA*) empregando as concentrações de sete elementos metálicos (*As*, arsênio; *Pb*, chumbo; *Cu*, cobre; *Cr*, cromo; *Mn*, manganês; *V*, vanádio; e *Zn*, zinco), tamanho médio do grão (*TMG*) e teor de matéria orgânica (*MO*), em amostras de sedimento superficial nas praias da Juréia (*JUR*) e Santos (*STS*), obtidas em três diferentes setores (A, B, C), em novembro e dezembro/2022, respectivamente.

A análise de associação entre variáveis bióticas ($n = 12$ amostras totais) revelou uma correlação negativa e significativa entre *TMG* e *MO* ($\rho = -0,67$ $p \leq 0,01$). Para a concentração de metais, foi confirmada uma associação positiva e significativa entre oito elementos metálicos (*As*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V* e *Zn*) com *MO* ($\rho \geq 0,63$; $p \leq 0,01$), sendo observado o inverso em relação ao *TMG* ($\rho \leq -0,65$; $p \leq 0,01$) (Fig. 4-A). No caso da composição granulométrica, o teor de matéria orgânica apresentou uma correlação positiva e significativa com três frações granulométricas (*AMG*, *AG* e *AMF*; $\rho \geq 0,66$; $p \leq 0,01$), mas uma correlação negativa significativa com *AF* ($\rho = -0,86$ $p \leq 0,01$) (Fig. 4-B).

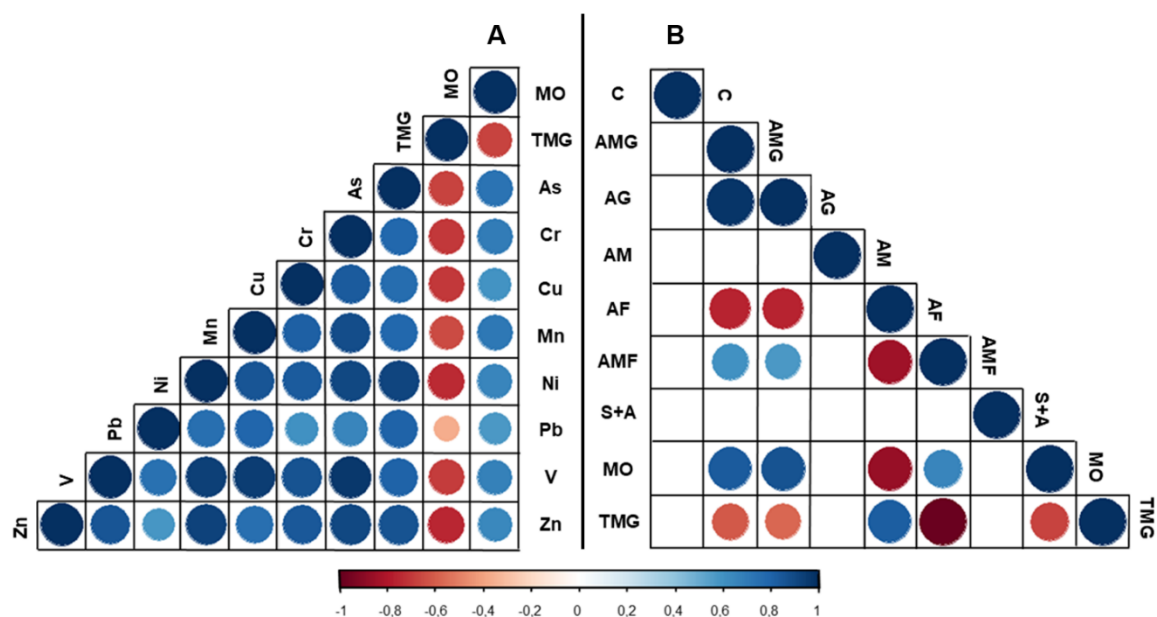


Figura 4. Correlação de Spearman ($n=6$ /praia) entre as variáveis abióticas do sedimento em duas praias arenosas (*JUR*, Juréia; e *STS*, Santos), registrada em novembro e dezembro/2022, relacionando o teor de matéria orgânica (*MO*) e tamanho médio do grão (*TMG*) em relação aos: **(A)** elementos metálicos no sedimento (*As*, arsênio; *Cr*, cromo; *Cu*, cobre; *Mn*, manganês; *Ni*, níquel; *Pb*, chumbo; *V*, vanádio; e *Zn*, zinco); e **(B)** frações granulométricas (*C*, cascalho; *AMG*, areia muito grossa; *AG*, areia grossa; *AM*, areia média; *AF*, areia fina; *AMF*, areia muito fina e *SA*, silte + argila). Onde, células em branco representam ausência de correlação a 5% ($p > 0,05$), enquanto as células com círculos vermelhos e azuis compreendem correlações negativas e positivas, respectivamente, significativas a 5% ($p \leq 0,05$).

4.3. Variáveis Abióticas: Concentração de Elementos Metálicos nos Sedimentos

Nove elementos metálicos foram registrados nos sedimentos da praia de Santos (*STS*), enquanto na Juréia (*JUR*) somente *Cd* não foi detectado (Tab. 2). Assim, 88,9% dos elementos metálicos no sedimento de *STS* apresentaram concentrações significativamente mais elevadas do que em *JUR* (*As*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Pb*, *V* e *Zn*: $t \leq 7,84$; $p \leq 0,01$; e *Ni*: $W = 0$; $p \leq 0,01$) (Fig. 5), com destaque para o cobre e arsênio, que foram de 1,6 a 3,2 vezes maiores em *STS*, respectivamente. A ordem hierárquica de concentração dos elementos metálicos nas amostras de sedimento em *STS* foi $Mn > Zn > V > Cr > As > Pb > (Ni = Cu)$, variando pouco em relação a hierarquia de *JUR*, representada por $Mn > Zn > V > Cr > (As = Pb) > Cu > Ni$.

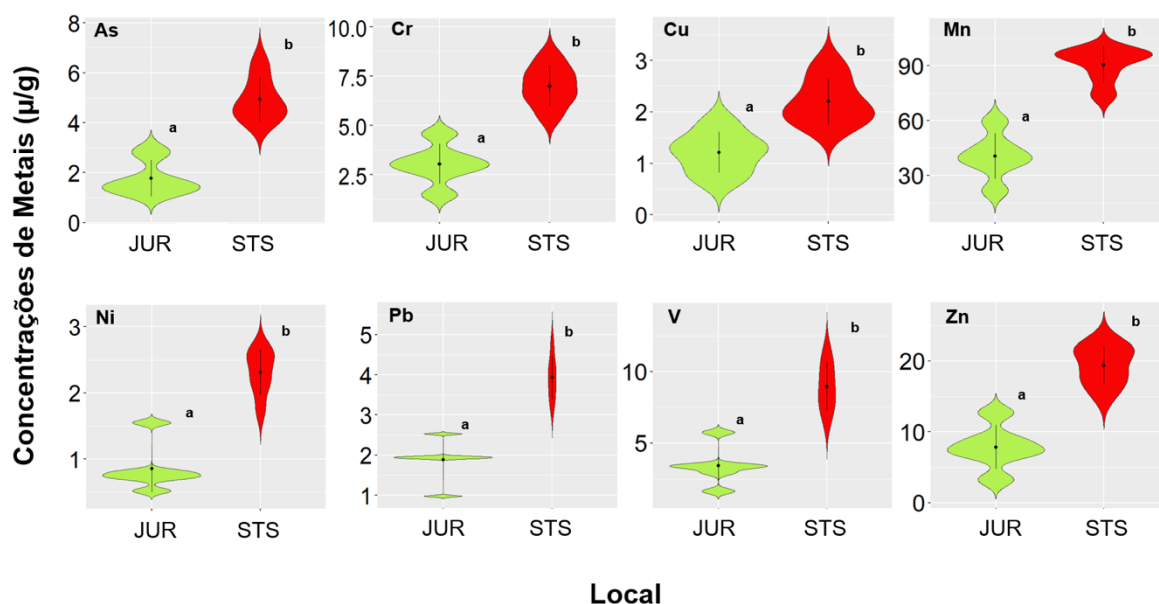


Figura 5. Gráfico comparativo das concentrações de oito elementos metálicos (*As*, arsênio; *Cd*, cádmio; *Pb*, chumbo; *Cu*, cobre; *Cr*, cromo; *Mn*, manganês; *Ni*, níquel; *V*, vanádio; *Zn*, zinco), em amostras de sedimento superficial nas praias da Juréia (*JUR*) e Santos (*STS*), obtidas em novembro e dezembro/2022, respectivamente. Onde: Ponto (interior do violino), média; linha vertical, desvio padrão; violino, distribuição modal de cada variável. Médias de concentração de um mesmo elemento metálico, seguido por letras distintas, diferiram significativamente entre as praias em estudo ($p \leq 0,01$).

Todos os elementos metálicos identificados apresentaram concentrações abaixo dos parâmetros *Interim Sediment Quality Guidelines (ISQG)* e *Problabe Effect Levels (PEL)*, estabelecidos pela *Canadian Environmental Quality Guidelines (CCME, 2002)* (Tab. 2).

4.4. Variáveis Bióticas: Biometria de *Callichirus corruptus*

Em cada praia (*STS* e *JUR*) foram utilizadas 63 fêmeas (*vide* Tab. 3), sendo as de Santos significativamente maiores (*CT*: $W = 1336,00$; $p \leq 0,01$) e mais pesadas (*PE*: $W = 576,5$; $p \leq 0,01$) do que as da Juréia. No entanto, nenhuma diferença significativa no tamanho destes animais foi detectada para as variáveis *CC* ($t = 0,07$; $p = 0,95$) e *CAO* ($W = 1691,50$; $p = 0,15$).

Tabela 2. Concentrações (média $\pm$ desvio padrão, em $\mu\text{g/g}$) dos elementos metálicos no sedimento (*As*, arsênio; *Cd*, cádmio; *Pb*, chumbo; *Cu*, cobre; *Cr*, cromo; *Mn*, manganês, *Ni*, níquel; *V*, vanádio; e *Zn*, zinco), usando seis amostras/praias (*JUR*, Juréia; e *STS*, Santos), em novembro e dezembro/2022, respectivamente. Os valores foram confrontados aos de *ISQG* (*Interim Sediment Quality Guidelines*) e *PEL* (*Probable Effect Levels*), pelo CCME (*Canadian Environmental Quality Guidelines*). Onde: *Min*, mínimo; *Max*, máximo; $\bar{x}$, média; *s*, desvio padrão; *t*, teste *t*; *W*, teste de Wilcoxon.

Metal	Local	Concentração de Elementos Metálicos (µg/g)				Teste Estatístico (<i>t</i> ou <i>W</i>)	CCME (2002)	
		<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>x</i> ± <i>s</i>			<i>ISQG</i>	<i>PEL</i>
<i>As</i>	<i>JUR</i>	1,2	2,8	1,8 ± 0,7	a*	<i>t</i> = 6,3	7,2	41,6
	<i>STS</i>	4,1	6,4	4,9 ± 0,9	b			
<i>Cd</i>	<i>JUR</i>	–	–	< LDM		–	0,7	4,2
	<i>STS</i>	0,1	0,1	0,1 ± 0,0				
<i>Cr</i>	<i>JUR</i>	1,5	4,6	3,0 ± 1,0	a	<i>t</i> = 6,7	52,3	160
	<i>STS</i>	5,5	8,4	7,0 ± 1,0	b			
<i>Cu</i>	<i>JUR</i>	0,7	1,8	1,2 ± 0,4	a	<i>t</i> = 4,1	18,7	108
	<i>STS</i>	1,7	2,9	2,2 ± 0,4	b			
<i>Mn</i>	<i>JUR</i>	21,7	59,6	40,6 ± 12,5	a	<i>t</i> = 7,8	–	–
	<i>STS</i>	74,0	98,0	90,7 ± 9,4	b			
<i>Ni</i>	<i>JUR</i>	0,5	1,5	0,8 ± 0,4	a	<i>W</i> = 0,0		
	<i>STS</i>	1,7	2,6	2,3 ± 0,3	b			
<i>Pb</i>	<i>JUR</i>	1,0	2,5	1,9 ± 0,5	a	<i>t</i> = 6,8	30,2	112
	<i>STS</i>	3,2	4,8	3,9 ± 0,5	b			
<i>V</i>	<i>JUR</i>	1,6	5,7	3,4 ± 1,3	a	<i>t</i> = 6,3	–	–
	<i>STS</i>	6,7	11,3	8,9 ± 1,7	b			
<i>Zn</i>	<i>JUR</i>	3,3	12,7	7,9 ± 3,1	a	<i>t</i> = 6,9	124	271
	<i>STS</i>	15,4	21,8	19,4 ± 2,7	b			

* Médias de concentração de um mesmo elemento metálico, seguido por letras distintas, diferiram significativamente entre as praias em estudo ($p \leq 0,01$), em relação ao teste estatístico estabelecido.

Tabela 3. Parâmetros de biometria do comprimento da carapaça (*CC*), comprimento da área oval (*CAO*), comprimento total (*CT*) e peso (*PE*) dos camarões *C. corruptus* coletados na Juréia (*JUR*) e Santos (*STS*), em novembro e dezembro/2022, respectivamente. Onde: *Min*, valor mínimo; *Max*, valor máximo; *x*, média aritmética; *s*, desvio padrão.

Praia	CC (mm)			CAO (mm)			CT (mm)			PE (g)		
	Min	Max	$\bar{x} \pm s$	Min	Max	$\bar{x} \pm s$	Min	Max	$\bar{x} \pm s$	Min	Max	$\bar{x} \pm s$
JUR	10,2	20,0	15,1 $\pm$ 2,2 a	8,2	13,8	12,2 $\pm$ 1,3 a	52,4	106,9	85,5 $\pm$ 10,4 a*	1,2	5,7	4,1 $\pm$ 1,4 a
STS	11,1	19,4	15,1 $\pm$ 2,1 a	9,0	16,3	12,4 $\pm$ 1,6 a	67,9	116,9	93,5 $\pm$ 12,1 b	3,3	15,2	7,7 $\pm$ 3,5 b

* Médias de uma mesma variável seguidas por letras distintas evidenciam diferença significativa entre as praias analisadas ($p < 0,05$). Obs: para a variável *CC*, foi utilizado um teste *t* entre as médias, enquanto para as variáveis *CAO*, *CT* e *PE*, foi aplicado o teste de Wilcoxon, para as medianas.

4.5. Variáveis Bióticas: Concentração de Metais nos Tecidos de *C. corruptus*

Dos 10 elementos metálicos quantificados, *Hg* e *Pb* não foi detectado nos tecidos de *C. corruptus*, independente da praia analisada, o que também ocorreu com *Cr*, mas apenas para Santos. O único elemento metálico que apresentou diferença significativa de concentração para *C. corruptus* nas praias em estudo foi *As*, com uma média 1,8 vezes superior em *JUR* ($17,3 \pm 2,7 \mu\text{g/g}$), em relação à *STS* ($9,1 \pm 1,4 \mu\text{g/g}$) ($W=81,0$; $p < 0,01$). Ao compararmos as concentrações de elementos metálicos com os limites máximos toleráveis (*LMT*) estabelecidos para os crustáceos pela Anvisa (Brasil, 2013), confirmamos que eles foram ultrapassados por *As*, *Cd* e *Cu* nas duas praias. Assim, foi constatado que os maiores níveis de contaminação nos camarões-fantasma de *JUR* foram 4 a 16 vezes superiores aos de *STS*.

Uma relação similar também foi verificada quanto à acumulação de metais em cada tecido, evidenciando contraste para *C. corruptus* entre as duas praias estudadas. Nas gônadas foi verificada uma bioconcentração significativa de *As*, mais expressiva em *JUR* ($17,2 \pm 1,3 \mu\text{g/g}$) do que em *STS* ($10,1 \pm 1,3 \mu\text{g/g}$) ($W = 81$; $p \leq 0,01$). No hepatopâncreas, ocorreu contraste significativo para concentração de três elementos metálicos (*As*, *Cd* e *Zn*; $W \geq 66,0$; $p \leq 0,01$), com médias também mais elevadas em *JUR* (*As*: $18,0 \mu\text{g/g}$; *Cd*: $4,5 \mu\text{g/g}$; e *Zn*: $61,2 \mu\text{g/g}$), do que em *STS* ($9,8 \mu\text{g/g}$; $1,3 \mu\text{g/g}$; e $52,4 \mu\text{g/g}$, respectivamente). O mesmo padrão foi encontrado nas amostras de musculatura para *As* ($W = 81$; $p \leq 0,01$), também com valores mais elevados de concentração na Juréia (Tab. 4)

Quando comparamos as concentrações de metais entre os tecidos de *C. corruptus* (Fig. 6), foi registrado um maior acúmulo para *Cu* e *Ni* no hepatopâncreas ($H \geq 11,24$; $p \leq 0,01$), independentemente da praia em estudo, com concentrações de 7,9 a 15 vezes superiores às dos demais tecidos estudados. Isso também foi confirmado para *Cd* na Juréia ($H = 16,1$; $p \leq 0,01$) e *V* em Santos ($H = 6,2$; $p \leq 0,01$). O segundo tecido com maior bioconcentração de metais foi a musculatura, com maior acúmulo de *Mn* ($H = 17,4$; $p \leq 0,01$), que superou as concentrações registradas no hepatopâncreas e gônadas (*JUR*: > 12 vezes; e *STS*: > 15 vezes). O zinco ocorreu com elevada concentração nas gônadas dos exemplares das duas praias estudadas ($H \geq 10,8$; $p \leq 0,01$), correspondendo a cerca do dobro registrado para o hepatopâncreas (1,9 a 2,3 vezes) e na musculatura (1,8 vezes). Por sua vez o arsênio apresentou concentrações similares entre os três tecidos, o que foi confirmado nas duas praias em estudo.

Pelo exposto anteriormente, como síntese os exemplares de *JUR* e *STS* apresentaram a seguinte hierarquia de acumulação de metais nos tecidos: $H > M > G$. Já em relação à concentração média total de cada elemento metálico por praia, a hierarquia de acumulação nos camarões de *JUR* foi $Cu > Zn > As > Cd > Ni > V > Cr$, diferindo pouco da hierarquia de *STS*, devido a posição do cádmio e ausência de *romo*, a saber: $Cu > Zn > As > Ni > Cd > V$.

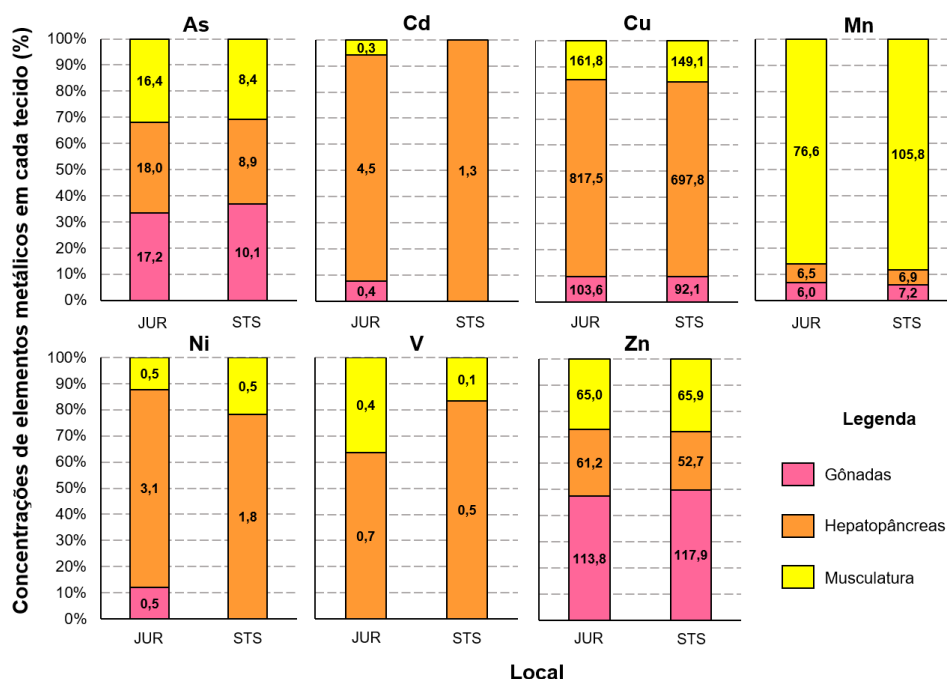


Figura 6. Concentração acumulada (%) para cada elemento metálico nos três tecidos (gônadas, hepatopâncreas e musculatura) do camarão *C. corruptus*, em duas praias arenosas do Estado de São Paulo (*JUR*, Juréia; e *STS*, Santos), obtidas em novembro e dezembro/2022, respectivamente. Os valores no interior das barras correspondem as médias de concentração nos tecidos (em $\mu\text{g/g}$). Onde: *As*, arsênio; *Cd*, cádmio; *Cu*, cobre; *Cr*, cromo; *Mn*, manganês; *Ni*, níquel; *V*, vanádio; e *Zn*, zinco.

Tabela 4. Concentrações (média $\pm$ desvio padrão, em $\mu\text{g/g}$) dos elementos metálicos (*As*, arsênio; *Cd*, cádmio; *Cu*, cobre; *Cr*, cromo; *Mn*, manganês, *Ni*, níquel; *V*, vanádio; e *Zn*, zinco), em 54 amostras de tecidos (*G*, gônadas; *H*, hepatopâncreas; e *M*, musculatura) de *C. corruptus* nas praias em estudo (*JUR*, Juréia e *STS*, Santos), obtidas em novembro e dezembro/2022, respectivamente, assim como o Fator de Bioacumulação (*B*) para cada metal.

Metal	Local	Concentração de Elementos Metálicos nos Tecidos ($x \pm s$)			<i>B</i>	Brasil (2013)**
		<i>G</i>	<i>H</i>	<i>M</i>		
<i>As</i>	<i>JUR</i>	17,2 $\pm$ 1,3 A(b)*	18,0 $\pm$ 3,8 A(b)	16,7 $\pm$ 2,7 A(b)	4,5	1,0
	<i>STS</i>	10,1 $\pm$ 1,3 A(a)	8,9 $\pm$ 1,2 A(a)	8,4 $\pm$ 1,1 A(a)	0,8	
<i>Cd</i>	<i>JUR</i>	0,4 $\pm$ 0,1 A	4,5 $\pm$ 0,9 B(b)	0,3 $\pm$ 0,1 A	–	0,5
	<i>STS</i>	< LDM	1,3 $\pm$ 0,3 a	< LDM	–	
<i>Cr</i>	<i>JUR</i>	< LDM	< LDM	0,34 $\pm$ 0,12		–
	<i>STS</i>	< LDM	< LDM	< LDM	–	
<i>Cu</i>	<i>JUR</i>	103,6 $\pm$ 33,6 A(a)	817,5 $\pm$ 135,7 B(a)	161,8 $\pm$ 32,4 A(a)	110,5	30,0
	<i>STS</i>	92,1 $\pm$ 19,0 A(a)	697,8 $\pm$ 211,7 B(a)	149,1 $\pm$ 50,8 A(a)	55,6	
<i>Mn</i>	<i>JUR</i>	6,0 $\pm$ 1,0 A(a)	6,5 $\pm$ 2,6 A(a)	76,6 $\pm$ 28,9 B(a)	0,3	–
	<i>STS</i>	7,2 $\pm$ 1,3 A(a)	6,9 $\pm$ 1,8 A(a)	105,8 $\pm$ 50,7 B(a)	0,2	
<i>Ni</i>	<i>JUR</i>	0,5 $\pm$ 0,1 A	3,1 $\pm$ 3,3 B(a)	0,5 $\pm$ 0,1 A(a)	0,4	–
	<i>STS</i>	<LDM	1,8 $\pm$ 0,7 B(a)	0,5 $\pm$ 0,1 A(a)	0,1	
<i>V</i>	<i>JUR</i>	<LDM	0,6 $\pm$ 0,5 A(a)	0,4 $\pm$ 0,1 A(b)		–
	<i>STS</i>	<LDM	0,5 $\pm$ 0,1 B(a)	0,1 $\pm$ 0,0 A(a)		
<i>Zn</i>	<i>JUR</i>	115,9 $\pm$ 7,0 B(a)	61,2 $\pm$ 8,1 A(b)	64,4 $\pm$ 4,43 A(a)	4,4	–
	<i>STS</i>	118,4 $\pm$ 4,0 B(a)	52,4 $\pm$ 6,6 A(a)	65,0 $\pm$ 3,5 A(a)	1,8	

* Médias de concentração de um mesmo elemento metálico, seguido por letras minúsculas distintas, diferiram significativamente entre as praias em estudo ($p \leq 0,05$), enquanto se acompanhadas de letras maiúsculas distintas, estas médias diferiram significativamente entre os tecidos em estudo ($p \leq 0,02$). ** Brasil (2013) apresenta o limite máximo de contaminação tolerável por metais em crustáceos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

4.6. Variáveis Bióticas: Fator de Bioacumulação

A bioacumulação (B) em *C. corruptus* ocorreu por três elementos metálicos em *JUR*, sendo muito expressiva para *Cu* ($B = 110,5$) e em menor intensidade para o arsênio e zinco ($B = 4,5$ e $4,4$, respectivamente), muito similar entre si. No caso de Santos, a bioacumulação ocorreu por dois elementos metálicos, ainda com o cobre em maior intensidade ($B = 55,6$), seguido pelo zinco ($B = 1,8$), correspondendo a cerca de 50,3% e 40,9% dos valores registrados nos indivíduos de *JUR*.

5. Discussão

O presente estudo confirmou que as duas praias estudadas apresentam traços de elementos metálicos no sedimento arenoso, embora sem confirmação de contaminação ambiental promotora de danos à biota, no confronto com os parâmetros estabelecidos para o sedimento (*ISQG* e *PEL* – CCME, 2002). No entanto, as maiores concentrações metálicas foram encontradas em Santos, onde alguns desses elementos químicos apresentaram maiores registros (*As*, *Cd*, *Pb* e *V*), o que certamente está associado ao seu maior adensamento populacional humano e histórico de impacto ambiental. Além disso, o camarão-fantasma (*C. corruptus*) apresentou elevada concentração de elementos metálicos em seus tecidos, principalmente no hepatopâncreas. Alguns elementos metálicos (*As*, *Cd* e *Cu*) apresentaram valores acima daqueles recomendados para o consumo de crustáceos pela Anvisa (Brasil, 2013), sendo preocupantes aqueles não essenciais (*As* e *Cd*). Foi identificado, também, a bioacumulação de *Cu* e *Zn* nos camarões das duas praias, com os exemplares de *JUR* bioacumulando adicionalmente o elemento *As*.

5.1. Variáveis Abióticas: Granulometria, TMG, MO% e Metais no Sedimento.

A maior concentração de elementos metálicos no sedimento arenoso da praia de Santos foi devido a sua granulometria mais fina (*TMG*: 0,09 mm), que favoreceu uma maior retenção de matéria orgânica (*MO*: 0,14 %), potencializando o acúmulo de metais, contrastando com os valores antagônicos registrados no sedimento da praia da Juréia (0,15 mm e 0,03 %, respectivamente). No presente estudo, a análise da associação entre a concentração de cada elemento metálico (*As*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V*, *Zn*) e o *TMG* confirmou correlações negativas significativas para todos os casos ($\rho \leq -0,65$; $p \leq 0,01$), validando este recorrente padrão já registrado por Luoma & Rainbow (2008). Segundo Martincic *et al.* (1990), em um estudo sobre a distribuição de *Cd*, *Cu*, *Pb* e *Zn* em sedimentos de fundo com distintos valores de *TMG*, aqueles com menor tamanho de grão estiveram associados a um maior percentual de *MO* ($r \geq 0,90$; $p \leq 0,01$), aspecto também confirmado no presente estudo ($\rho = -0,67$; $p \leq 0,01$). Nos manguezais, por exemplo, os maiores teores de matéria orgânica encontram-se associados a sedimentos onde predominam as partículas mais finas (*p. ex.*, frações silte-argilosas), favorecendo uma maior adsorção e complexação de metais, que podem ser ali imobilizados, ou por redução de seu estado de valência, apresentarem maior biodisponibilidade (*vide* Sauvé *et*

al., 1998 e Uchimiya *et al.*, 2010). Tal fato foi confirmado também no presente estudo, que apresentou associação positiva de cada elemento metálico em função de *MO* ($\rho \geq 0,63$; $p \leq 0,01$). Em Santos essa relação pode ser explicada pela proximidade que a praia em estudo tem da foz do *SESSV*, abrigando o Canal Portuário de Santos, o que eleva os teores de matéria orgânica particulada na Baía de Santos (Torres *et al.*, 2009; Perina *et al.*, 2018). De acordo com Souza (2012), tal embaçamento e a posição dessa praia em estudo ao fundo, favorece sua morfodinâmica dissipativa de baixa energia. Hernáez *et al.* (2017), ainda afirmam que essas características minimizam o fluxo hídrico local, permitindo uma maior deposição das partículas mais finas e da matéria orgânica, já que sua exportação é limitada. Ainda sobre o trabalho de Souza (2012), a praia de STS contrasta bastante daquela em JUR, já que esta última é dissipativa de alta energia, por ser uma praia denominada de “mar aberto” e por sofrer maior efeito das correntes de deriva litorânea, que dificultam a sedimentação das partículas e incorporação da *MO* aos sedimentos.

Quando analisamos a associação de alguns metais com a matéria orgânica, temos que, segundo Uchimiya *et al.* (2010), os sedimentos com maior teor de matéria orgânica natural podem atrair o *Cu* (II). Tal fato foi confirmado no presente estudo pela correlação positiva e significativa para a relação dos metais com *MO*, mesmo apresentando menor coeficiente de correlação de Spearman ($\rho = 0,63$ $p \leq 0,01$). Já Sauvé *et al.* (1998), registraram que a associação *Pb* vs. *MO*, também depende do pH do sedimento, pois a retenção deste metal só acontece quando o pH é $> 5,7$, com tendência à neutralidade, fato frequente em áreas com maiores teores de *MO*, como registrado em STS. Segundo Boechat *et al.* (2016), a acidificação do sedimento promove uma maior biodisponibilidade dos elementos metálicos para água, repercutindo em menores concentrações no sedimento. Além disso, essa relação explicaria a ausência de *Pb* nos tecidos de *C. corruptus*, apesar das concentrações deste metal terem sido encontradas tanto nos sedimentos de JUR (2,1 $\mu\text{g/g}$), como de STS (3,7 $\mu\text{g/g}$). No entanto, novos estudos levando em consideração o pH do local deverão ser realizados para confirmar a veracidade dessa informação. Vale lembrar que uma das formas de detoxificação do chumbo nos crustáceos ocorre no momento da troca de seu exoesqueleto, pelo processo de ecdise (Ramos & Leite, 2022).

Pelo exposto, o estudo confirma a **Hipótese I**, mostrando a existência de uma forte associa  o entre a concentra  o metálica no sedimento arenoso e o teor de matéria orgânica, o que ficou evidente pela Análise de Componentes Principais e foi confirmada pela correla  o de

Spearman para as relações Metais vs. *MO%* ($\rho \geq 0,63$; $p \leq 0,01$) e Metais vs. *TMG* ($\rho \leq -0,65$; $p \leq 0,01$), repercutindo na relação *MO%* vs. *TMG* ($\rho = -0,67$; $p < 0,01$).

5.2. Variáveis Abióticas: Concentração de Metais nos Sedimentos

O registro de oito elementos metálicos (*As*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V* e *Zn*) no sedimento das praias em estudo, confirmou concentrações mais elevadas para *STS* em relação à *JUR*. Neste sentido, o presente estudo se coaduna com outros já desenvolvidos anteriormente, até mesmo para ambientes costeiros adjacentes, como verificado para áreas de manguezal do Estuário Santos-São Vicente por Duarte *et al.* (2016, 2017), onde a concentração média de *Pb* (6,5 µg/g) correspondeu ao dobro da média encontrada no sedimento praiial de Santos ($3,2 \pm 0,5$ µg/g) no presente estudo. Banci *et al.* (2017) também registraram concentrações de elementos metálicos até 2,4 vezes superiores nos sedimentos dos manguezais de Cubatão (área interna do *SESSV*), em relação aos da Juréia (*Cr*: 6,1 e 3,0 µg/g; *Cu*: 3,3 e 1,4 µg/g; e *Pb*: 4,8 e 3,3 µg/g, respectivamente). O presente estudo confirmou concentrações médias similares para estes mesmos elementos metálicos nos sedimentos das praias de Santos e Juréia – *Cr* (6,7 e 3,4 µg/g), *Cu* (2,1 e 1,3 µg/g) e *Pb* (3,7 e 2,1 µg/g), respectivamente –, embora com menor variação. A concentração de elementos metálicos pode ser ainda mais expressiva em sedimentos de dragagem, como aqueles oriundos de canais portuários, fato confirmado no Canal do Porto de Santos por Bordon *et al.* (2011), onde as concentrações de metais atingiram níveis 10 vezes superiores (*p. ex.*, *Cu*: 29,9 µg/g; *Ni*: 20,6 µg/g; *Pb*: 37,8 µg/g; e *Zn*: 180,0 µg/g), comparados àqueles registrados nos sedimentos arenosos de *STS* (2,1; 2,2; 3,7; e 18,5 µg/g, respectivamente). Essa mesma condição também foi relatada neste mesmo local por Torres *et al.* (2009), obtendo elevadas concentrações médias de *Pb* (38,5 µg/g), além do estudo de Angeli *et al.* (2021), com sedimentos de fundo do Sistema Estuarino Santos-São Vicente, revelando registros de *As* (8,9 µg/g) e *V* (21,1 µg/g), que também foram confirmados no sedimento da praia de Santos no presente estudo, porém em menores concentrações (4,9 e 8,9 µg/g, respectivamente).

O contraste nos níveis de concentração desses estudos está associado à granulometria e teor de matéria orgânica no sedimento. Os estudos conduzidos por Banci *et al.* (2017) e Duarte *et al.* (2017), foram realizados em manguezais, ambientes categorizados por possuírem maiores teores de matéria orgânica (~5,5 %, de acordo com Gomes *et al.*, 2013). Já nos estudos de sedimento de dragagem (Torres *et al.*, 2009 e Bordon *et al.*, 2011), os metais estão associados

ao predomínio de frações mais finas no sedimento, em especial o silte e argila, que representam de 65 a 86 % dos sedimentos de dragagem (Torres *et al.*, 2009). O presente estudo confirma a significância da relação *MO* vs. *TMG* ($\rho = -0,67$; $p < 0,01$), encontrando uma relação inversa entre estas covariáveis em praias arenosas.

A contaminação de ambientes litorâneos por metais (ou outros poluentes) tem relação direta com o histórico de ocupação e adensamento populacional humano, o que é maximizado em regiões portuárias e complexos industriais, como em Santos (SP) (Torres *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2017). Nos sistemas estuarinos e ambientes costeiros adjacentes, alguns metais podem ocorrer em maior concentração, como é o caso do *Zn*, que é oriundo de indústrias siderúrgicas, químicas e petroquímicas (*p. ex.*, regiões internas do Sistema Estuarino de Santos-São Vicente – *vide* Cetesb, 2001), com concentração média de 18,5 µg/g nos sedimentos de manguezal, em relação a 8,7 µg/g para a Juréia, padrão que foi identificado no presente estudo (*STS*: 19,4 µg/g; e *JUR*: 7,9 µg/g). Segundo este mesmo relatório da Cetesb, tais indústrias também são responsáveis pela liberação de *Mn* (86,5 µg/g), o que contrasta da metade deste valor para a Juréia (44,9 µg/g). Segundo Gonçalves *et al.* (2013) e Angeli *et al.* (2021), os níveis elevados de *Cu* e *Zn* nessa região estão associados ao tráfico de embarcações e indústrias portuárias, assim como ao descarte inadequado de esgotos não tratados. Além disso, segundo Costa *et al.* (2004), o Porto de Santos também é o responsável por intensificar as concentrações de *Cu*, *Cr* e *Ni*, oriundos dos combustíveis, que são metais muito adsorvidos pelos sedimentos de Santos. No caso do arsênio, ele ocorre naturalmente na costa brasileira devido a formação sedimentar (Kim *et al.*, 2018; Angeli *et al.*, 2021), no entanto, altas concentrações podem estar associadas à indústria metalúrgica e, principalmente, pelo uso de fertilizantes (Baeyens *et al.*, 2019). Por fim, a presença do metal *Pb* na região de Santos, também pode estar associada às indústrias petroquímicas, refinarias de petróleo e fertilizantes, como aponta os trabalhos de Kim *et al.* (2019) e Angeli *et al.* (2021).

Uma comparação dos resultados de concentração metálica no sedimento arenoso do presente estudo, com aqueles obtidos em 2017 por José-Silva *et al.* (*no prelo*), nas mesmas praias do presente estudo, identificou o mesmo padrão para os quatro elementos metálicos (*Cd*, *Cr*, *Cu* e *Mn*) (Tabela 5). Nesses estudos as concentrações em Santos superaram em cerca de duas vezes as da Juréia, embora a concentração de *Cd* em 2017 (José-Silva *et al.*, *no prelo*), tenha sido quatro vezes superior, demonstrando um declínio desse elemento metálico.

Tabela 5. Comparação das concentrações de metais (média $\pm$ desvio padrão, em $\mu\text{g/g}$), em amostras de sedimento arenoso das praias de Santos e Juréia (SP), Brasil.

Local	Concentração de Metais ($\mu\text{g/g}$)				Autor (Ano)
	Cádmio (Cd)	Cromo (Cr)	Cobre (Cu)	Manganês (Mn)	
Juréia (JUR)	$< LDM$	$3,0 \pm 1,0$	$1,2 \pm 0,4$	$40,6 \pm 12,5$	Presente Estudo
	$< LDM$	$3,4 \pm 1,0$	$1,3 \pm 0,3$	$44,9 \pm 13,6$	José-Silva <i>et al.</i> (no prelo)
Santos (STS)	$0,1 \pm 0,0$	$7,0 \pm 1,0$	$2,2 \pm 0,4$	$90,7 \pm 9,4$	Presente Estudo
	$0,5 \pm 0,2$	$6,7 \pm 1,0$	$2,1 \pm 0,1$	$86,5 \pm 8,7$	José-Silva <i>et al.</i> (no prelo)

Dessa forma, o presente estudo aceita a **hipótese II**, associando o sedimento arenoso de Santos a uma maior concentração metálica devido ao elevado adensamento populacional humano, o que intensifica as atividades poluidoras no local, como elencado nos estudos de Cetesb (2001; 2023), Buruaem *et al.* (2013), Kim *et al.* (2016), Perina *et al.* (2018) e Angeli *et al.* (2021).

5.3 Variáveis Bióticas: Concentração de Metais em *C. corruptus*

Quando analisamos a concentração de metais nos tecidos do camarão *C. corruptus*, ficou perceptível que os exemplares de JUR apresentaram uma maior concentração para quase todos os elementos metálicos observados, exceto para Mn. O manganês apresentou concentrações mais elevadas em Santos, tanto nas gônadas (JUR: $5,9 \mu\text{g/g}$; e STS: $7,2 \mu\text{g/g}$), quanto na musculatura (JUR: $76,6 \mu\text{g/g}$; e STS: $105,8 \mu\text{g/g}$). Segundo Baden & Eriksson (2006), o Mn é um metal essencial, que é amplamente utilizado no metabolismo de animais invertebrados, atuando como ativador de diferentes reações enzimáticas, e por possuir ação antioxidante. Esse elemento participa como cofator enzimático, atuando nos processos de glicólise e no ciclo de Krebs (Napieska & Skorkowski, 2001), explicando os altos níveis encontrados na musculatura, que é um tecido com elevada demanda energética (Thibodeaux *et al.*, 2009). Estes autores afirmam que nos crustáceos decápodos marinhos, a concentração média de Mn é de $54,5 \mu\text{g/g}$, embora possam ocorrer variações interespecíficas nesse grupo. Por ser o único elemento com maior concentração nos indivíduos de Santos e, conhecendo as propriedades deste metal essencial, observada a concentração superior para os crustáceos na musculatura, podemos deduzir que esses exemplares estejam utilizando Mn para alguma finalidade específica, possivelmente relacionada ao seu efeito antioxidante, conforme sugerido

por Baden & Eriksson (2006) para crustáceos decápodos. Para outros elementos metálicos essenciais, como o Zn (*JUR*: 80,5 µg/g; e *STS*: 78,6 µg/g), a bioconcentração seguiu padrões esperados para outros crustáceos decápodos em ambas as praias, uma vez que, segundo Rainbow (2002), o Zn ocorre numa concentração ideal de regulação entre 70 e 90 µg/g no camarão *Palaemon elegans*. Este autor ainda informa que o Zn é um elemento chave na regulação de diversas enzimas (*p. ex.*, a anidrase carbônica), que atua como componente central em receptores respiratórios e de transporte de íons (Henry, 1988). O cobre também é um elemento essencial para os decápodos, tendo ocorrido concentrações mais elevadas nos indivíduos da Juréia (324,4 µg/g), em contraste a Santos (298,5 µg/g), sendo que, os indivíduos das duas praias possuem valores que ultrapassam em muito o limite máximo tolerável (*LMT*), que é de 30 µg/g segundo a Anvisa (Brasil, 2013). No entanto, como o cobre é um metal essencial, por ser o responsável pela pigmentação e transporte de oxigênio combinado à hemocianina nos crustáceos decápodos (Rainbow, 2002; Terwillinger (2013), seu excesso pode ser realocado e mantido em elevadas concentrações no hepatopâncreas desses animais (*p. ex.*, a lagosta *Homarus Gammarus*, com 2.000 µg/g – *vide* Clark, 2001). No presente estudo as concentrações médias de cobre no hepatopâncreas de *C. corruptus*, foram elevadas, independente da praia considerada (*JUR*: 817,5 µg/g; e *STS*: 697,8 µg/g), porém em menores concentrações do que no trabalho de Clark (2001).

Os camarões-fantasma da Juréia apresentaram elevadas concentrações de elementos metálicos não essenciais (*As*: 17,3 µg/g; e *Cd*: 2,1 µg/g), quando comparado aos de Santos (9,1 e 1,3 µg/g, respectivamente). Independente da praia, o *As* foi registrado acima do limite máximo tolerável nesses camarões ($\geq 1,0$ µg/g, segundo a Anvisa – Brasil, 2013), embora Clark (2001) mencione que o limite de contaminação para crustáceos marinhos bentônicos possa ser de até 57 µg/g. Segundo este autor, somente acima deste valor o arsênio promove danos de estresse oxidativo, aumento dos processos inflamatórios, apoptose e mesmo alterações imunes humorais. Isso foi confirmado por Liao *et al.* (2022), em experimento realizado com o camarão-branco (*Penaeus vannamei*), submetido a diferentes concentrações de *As*, onde ocorreu elevadas taxas de acúmulo deste elemento metálico em seus tecidos, principalmente no hepatopâncreas ($250,4 \pm 45,7$ µg/g) e musculatura ($77,3 \pm 11,3$ µg/g). Para o camarão-fantasma *C. corruptus*, embora o presente estudo tenha registrado valores mais modestos para o acúmulo máximo de *As*, mesmo assim podem ser considerados elevados, intendente dos tecidos considerados, variando de 16,4 µg/g na musculatura até 18,0 µg/g no hepatopâncreas, considerando as duas praias avaliadas. Este elevado acúmulo de arsênio nos camarões pode ser

decorrente deste elemento ocorrer naturalmente por toda a costa brasileira, conforme indicado por Kim *et al.* (2018).

O cádmio também ultrapassou o *LMT* (0,5 µg/g), com registro de maior concentração no hepatopâncreas de *C. corruptus* nas duas avaliadas (1,3 a 4,5 µg/g, para *STS* e *JUR*, respectivamente), o mesmo informado por Nuñez-Nogueira & Rainbow (2005) para o camarão *Penaeus indicus*, os quais explicaram tal fato pela função detoxificadora deste órgão. O hepatopâncreas detém a propriedade de acúmulo de metais por possuir elevadas quantidades de glutathione-S-transferase, lipídios e metalotioneínas, conforme indicado por Habig & Jakoby (1981), Lobato *et al.* (2013) e Liao *et al.* (2022), respectivamente. Segundo Vig *et al.* (2003) e Cabrini *et al.* (2018), o cádmio é um metal não essencial e biologicamente tóxico aos organismos (3ª posição de toxicidade, segundo Luoma & Rainbow, 2008), geralmente ocorrendo em concentrações mais expressivas nos organismos basais de uma cadeia alimentar (Bargagli *et al.*, 1998) e depurado até os consumidores secundários por processos fisiológicos (*p. ex.*, inibição por metalotioneínas – Baudrimont *et al.*, 2003; e pelo processo de muda que caracteriza os crustáceos – Reichmuth *et al.*, 2010).

Outro metal também disponível com frequência em áreas costeiras é o níquel, que é utilizado na mineração, refino do petróleo, incineração de resíduos e queima de combustíveis fósseis (Eisler, 1998), também ocorrendo nos tecidos de *C. corruptus* nas praias em estudo, em concentrações que variaram de 1,4 a 2,0 µg/g. Segundo Eisler (1998), o *Ni* pode causar inibição do crescimento somático em invertebrados, mesmo ocorrendo em elevadas concentrações nos crustáceos decápodos (1,4 a 7,84 µg/g – Cabrini *et al.*, 2018). A inibição de crescimento foi observado para o presente estudo, uma vez que, os indivíduos de *JUR* apresentaram uma maior concentração de níquel (3,1 µg/g) e um menor comprimento total (85,5 mm), quando comparado aos exemplares de *STS* (*Ni*=1,8 µg/g; *CT*=93,5 mm). O vanádio, por sua vez, ocorreu em baixas concentrações nas praias estudadas (0,4 a 0,5 µg/g), não possuindo indicações de biomagnificação na cadeia alimentar (Costigan *et al.*, 2001), o mesmo ocorrendo para o cromo, apenas na Juréia (0,3 µg/g), não possuindo função biológica conhecida (Ochiai, 1995; Cabrini *et al.*, 2018) e podendo causar redução na sobrevivência, fecundidade e inibição do crescimento (Honig *et al.*, 1980).

A hierarquia de acumulação metálica apontou semelhança na posição de quase todos os elementos quando foi confrontada entre as praias, com manutenção dos três primeiros (*Cu* > *Zn* > *As*), sendo as concentrações de *Cd* e *Ni* similares em *STS*, e *Cr* com reduzidos teores, apenas na Juréia. Cabrini *et al.* (2018) avaliaram a hierarquia de acumulação metálica em duas espécies de tatuíras (Decapoda: Hippidae), que também são filtradoras e ocorrentes em praias arenosas

(p. ex., *Emerita brasiliensis*: $Zn > Cu > Ni > Cr > V > Cd$; e *Lepidopa richmondi*: $Zn > Cu > V > Ni > Cd > Cr$). Em uma comparação com outro camarão-fantasma (*Callichirus laurae*), na praia de Aqba (Jordânia), Abu-Hilal *et al.* (1988) identificaram uma hierarquia representada por $Cu > Zn > Ni > Mn > Cr > Cd$, com destaque para metais essenciais para funções biológicas (*Zn* e *Cu*) e menores concentrações de metais não essenciais (*Cr* e o *Cd*), com elevada toxicidade.

As elevadas concentrações de elementos metálicos na Juréia, quando comparados aos resultados obtidos em Santos (*vide As, Cu, Mn e Zn*) podem ser devido a sua biodisponibilidade no ambiente praial, sendo relacionadas diretamente com o reduzido percentual de matéria orgânica associado aos sedimentos neste local. Segundo Martincic *et al.* (1990) e Uchimiya *et al.* (2010), a matéria orgânica possui capacidade de adsorção de contaminantes metálicos, no entanto, os sedimentos de *JUR* apresentaram reduzido teor médio de *MO* (0,04 %) em relação à *STS* (0,15 %). O estudo confirma este padrão pelos coeficientes de correlação de Spearman entre os elementos metálicos (*As, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V e Zn*) e o teor de *MO*, que foram positivos e significativos ($\rho \geq 0,63$; $p \leq 0,01$). Possivelmente, o sedimento arenoso de maior granulação média na praia da Juréia não possibilita igual complexação desses elementos, deixando-os biodisponíveis na água intersticial e aos camarões-fantasma, que vivem em íntima associação ao sedimento. Espera-se que futuros estudos possam investigar se as maiores concentrações de metais encontradas nos tecidos da espécie sejam referentes aos seus níveis naturais no sedimento ou na água intersticial, ou mesmo se são associadas à outras fontes de contaminação.

A hierarquia de concentração entre os tecidos de *C. corruptus* seguiram como ordem hierárquica crescente $H > M > G$, indicando um maior poder detoxificante para o hepatopâncreas e o menor para as gônadas. Segundo Pinheiro *et al.* (2012), a contaminação de elementos metálicos no caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*), espécie endêmica de manguezais, apresentou uma hierarquia similar entre o hepatopâncreas e musculatura ($H > M$), no entanto, os autores não analisaram o acúmulo dos elementos metálicos nas gônadas. Segundo Ahearn *et al.* (2004), o hepatopâncreas é o órgão onde ocorre a maior concentração de elementos metálicos nos crustáceos, sendo considerado por vários autores como seu principal órgão de detoxificação (Metian *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2022), fato também confirmado no presente estudo, considerando as proporções e a hierarquia de contaminação entre estes tecidos. Segundo Luoma & Rainbow (2008) e Liao *et al.* (2022), o hepatopâncreas possui a propriedade de acumular mais metais devido às suas características bioquímicas, com elevada concentração de alguns componentes, entre eles: **1) lipídeos**, em especial durante a fase

de engorda dos crustáceos decápodos, quando se acumulam nos tecidos (Wu *et al.*, 2008; Lobato *et al.*, 2013); 2) metalotioneínas, que são proteínas ricas em enxofre, responsáveis pelo sequestro de elementos metálicos com propósito de desintoxicação, regulação da homeostase metálica e redistribuição desses elementos para outros tecidos (Pourang *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2022); e 3) glutathione-S-transferase, que são isoenzimas metabólicas com capacidade detoxificante, catalisando compostos xenobióticos em substâncias de menor toxicidade (Habig & Jakoby, 1981; Lobato *et al.*, 2013).

Desse modo, o presente estudo nega a **hipótese III**, pois as maiores concentrações de metais foram verificadas nos exemplares de camarão-fantasma oriundos de um ambiente mais preservado, em comparação àqueles de um ambiente antropizado. Essa maior concentração de metais está associada à sua biodisponibilidade na matriz abiótica (sedimento), pois, como explicado anteriormente, sedimentos arenosos com maior teor de matéria orgânica possuem um maior potencial de retenção desses elementos, deixando-os menos biodisponíveis para os camarões-fantasma ali presentes. Quanto a hierarquia de acumulação metálica, o presente estudo indicou $H > M > G$, diferindo da hipótese inicial proposta ($H > G > M$). Assim, o presente estudo confirma a maior eficiência do hepatopâncreas no processo de detoxificação metálica nos crustáceos decápodos, por apresentarem maior presença de lipídios, metalotioneínas e glutathione-S-transferase (Wu *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2022; Lobato *et al.*, 2013, respectivamente).

O estudo de biomarcadores de efeito em *C. corruptus* foram importantes para responder se as concentrações encontradas, afetam negativamente, a saúde dos camarões estudados, ou se as altas concentrações não são metabolizadas. Para isso, foi pensando em um segundo capítulo complementar ao presente estudo, intitulado **“O Uso de Biomarcadores de Efeito no Camarão-fantasma *C. corruptus*, para Identificação do *Status* de Conservação de Praias Arenosas no Sudeste Brasileiro”**, que aborda os efeitos genocitotóxicos nesta espécie e sua relação aos contaminantes.

5.4. Variáveis Bióticas: Fator de Bioacumulação de Metais em *C. corruptus*

Quando observamos a bioacumulação (*B*) nos indivíduos de *C. corruptus* foram confirmados os maiores valores para *JUR* (*As*: 4,5; *Cu*: 110,5; *Zn*: 4,4) em relação a *STS* (*Cu*: 55,6; *Zn*: 1,1). A maior bioacumulação nos exemplares da Juréia pode estar relacionada a maior biodisponibilidade dos metais na água intersticial, uma vez que o baixo teor de matéria orgânica presente nos sedimentos reduziria a adsorção desses elementos metálicos, como sugere

Martincic *et al.* (1990). Por outro lado, os animais de Santos apresentam uma menor bioacumulação, onde se evidencia uma relação inversa devido aos maiores teores de MO%, fato também evidenciado por Martincic *et al.* (1990) e Uchimiya *et al.* (2010), para o cobre e chumbo, respectivamente. Os autores afirmam ainda que o pH também é um fator que influencia a biodisponibilidade dos elementos, no entanto, esses valores não foram avaliados no presente estudo.

O elevado grau de bioacumulação do cobre e o zinco, podem ser explicados por serem metais essenciais aos crustáceos. Segundo Henry (1988) e Rainbow (2001), o *Zn* é um importante regulador de enzimas, como a anidrase carbônica, atuando nos receptores respiratórios e de transporte de íons. No caso do cobre, trata-se de um elemento responsável por auxiliar a síntese de metaloproteínas e metaloenzimas (Engel & Brouwer, 1987). Os autores Rainbow & White (1989) e Pourang *et al.* (2004), afirmam, também, que o Cu e Zn participam de processos importantes, como o crescimento somático, a muda e no metabolismo celular dos decápodos marinhos.

O fator *B* para o arsênio foi significativo apenas para os camarões da Juréia. Segundo Eisler (2009), em seu compêndio sobre metais na biota marinha, aponta que embora o arsênio seja um metalóide não essencial, sua bioacumulação pode estar relacionada à transformação do arsênio em arsenito em ambientes marinhos e costeiros, onde a temperatura e a salinidade auxiliam no processo de transformação, sendo sua forma arsenito mais biodisponíveis para os animais presentes nessas regiões.

Por fim, a ausência da bioacumulação dos demais metais (*Ni* e *Mn*) no camarão *C. corruptus*, podem estar associados à alimentação desses indivíduos, uma vez que os animais deste grupo se alimentam pela filtração de material orgânico em suspensão na água, conforme indicado por Rodrigues & Shimizu (1997), Hernáez *et al.* (2019) e Constantino *et al.* (2024).

6. Conclusões

O presente estudo permitiu caracterizar a qualidade ambiental por análise do sedimento praiar, bem como do efeito sobre os tecidos do camarão-fantasma *Callichirus corruptus*, com base no registro da concentração de 10 elementos metálicos em Santos (Litoral Centro) e Juréia (Litoral Sul), no Estado de São Paulo. O sedimento arenoso de Santos apresentou um menor tamanho médio do grão e, conseqüentemente, um maior teor de matéria orgânica associado, ocorrendo o inverso no sedimento da Juréia. Assim, foi confirmado para a Praia de Santos uma maior concentração de metais no sedimento, em relação à JUR, o que traz preocupação para esta área estudada, por ser mais frequentada por turistas como balneário. O elevado adensamento populacional de STS certamente também potencializa a concentração metálica local, uma vez que tais poluentes são oriundos do complexo industrial e portuário, afetando todo o Sistema Estuarino de Santos-São Vicente. Aliado á isso, a relação entre a concentração de metais e o teor de MO no sedimento, apontou sua maior complexação em um sedimento mais rico em matéria orgânica e com menores valores para o tamanho médio do grão. Assim, os exemplares de *C. corruptus* da Juréia apresentaram um maior acúmulo de metais do que os de Santos, com três deles (*As*, *Cd* e *Cu*) em concentrações que ultrapassam os Limites Máximos Toleráveis estabelecidos pela Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (Anvisa). Essa maior concentração está relacionada à biodisponibilidade dos metais no sedimento, uma vez que, a presença de MO torna os metais menos disponíveis para a biota local, com o inverso observado na Praia da Juréia. Desta forma, a maior biodisponibilidade de metais ocorreu para os camarões-fantasma da Juréia, que apresentaram uma hierarquia de concentração nos tecidos já reportada para outros crustáceos decápodos ($H > M > G$), com o hepatopâncreas apresentando importante função imobilizadora e detoxificante de metais, pela elevada concentração de metalotioneínas que apresenta, entre outras substâncias com propriedades igualmente detoxificantes. Uma maior bioacumulação ocorreu para *Cu* e *Zn* nos camarões-fantasma, independente da praia estudada, sendo essenciais aos processos biológicos dos crustáceos decápodos. Os indivíduos da Juréia bioacumulam o arsênio, que apesar de ser um metalóide não essencial. Pelo exposto, o presente estudo fornece informações importantes sobre o *status* de conservação dos ambientes estudados, além de apresentar informações inéditas sobre a bioacumulação de metais no camarão-fantasma *Callichirus corruptus*.

7. Referências Bibliográficas

- Abessa, D.M.S.; Sousa, E.C.P.M.; Rachid, B.R.F. & Mastroti, R.R. 2001. Sediment Toxicity in Santos Estuary, SP–Brazil: Preliminary Results. *Ecotoxicology And Environmental Restoration*, 4(1): 6–9.
- Abdenmour, C.; Smith, B.D.; Boulakoud, M.S.; Samraoui, B. & Rainbow, P.S. 2000. Trace metals in marine, brackish and freshwater prawns (Crustacea, Decapoda) from northeast Algeria. *Hydrobiologia*, 432(1): 217–227.
- Abu–Hilal, A.; Badran, M. & Vaugelas, J. 1988. Distribution of trace elements in *Callichirus laurae* burrows and nearby sediments in the Gulf of Aqaba, Jordan (Red Sea). *Marine Environmental Research*, 25(4): 233–248.
- Ahearn, G.A.; Mandal, P.K. & Mandal, A. 2004. Mechanisms of heavy–metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 17: 439–452.
- Angeli, J.L.F.; Sartoretto, J.R.; Kim, B.S.M.; Ferreira, P.A.; Mahiques, M.M. & Figueira, R.C.L. 2021. Trace element fluxes during the “Anthropocene” in a large South American industrial and port area (Santos and São Vicente estuarine system, SE, Brazil). *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(9): 594.
- Baden, S.P. & Eriksson, S.P. 2006. Role, routes, and effects of manganese in crustaceans. In: Barnes, H. (Ed.). **Oceanography and Marine Biology: An annual review**. London: CRC Press, Vol. 44: 556p.
- Banci, K.R.; Mori, G.M.; Oliveira, M.A.; Paganelli, F.L.; Pereira, M.R. & Pinheiro, M.A A. 2017. Can environmental pollution by metals change genetic diversity? *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) as a study case in Southeastern Brazilian mangroves. *Marine Pollution Bulletin*, 116(1–2): 440–447.
- Bartoli, G.; Papa, S.; Sagnella, E. & Fioretto, A. 2012. Heavy metal content in sediments along the Calore River: relationships with physical–chemical characteristics. *Jornal Environmental Managment*, 95, 9–14.
- Bargagli, R. 1998. Cadmium in marine organisms from the Tyrrhenian sea: no evidence of pollution or biomagnification. *Oebalia*, 19: 13–25.
- Baudrimont, M.; Andres, S.; Durrieu, G. & Boudou, A. 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquatic Toxicology*, 63(2): 89–102.
- Bayens, W.; Mirlean, N.; Bundschuh, J.; de Winter, N.; Baisch, P.; Silva Júnior, F.M. R. & Gao, Y. 2019. Arsenic enrichment in sediment and beaches of Brazilian coastal waters: A review. *Science of the Total Environment*, 681: 143–154.
- Birkeland, C. 1989. The Faustian traits of the crown–of–thorns starfish. *American Scientist*, 77(2): 154–63.
- Boechat, C.L.; Pistóia, V.C.; Ludtke, A.C.; Gianello, C. & Camargo, F.A.D.O. 2016. Solubility of heavy metals/metalloid on multi-metal contaminated soil samples from a gold ore processing area: effects of humic substances. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 40.

- Bordon, I.C.; Sarkis, J.E.; Gobbato, G.M.; Hortellani, M.A. & Peixoto, C.M. 2011. Metal concentration in sediments from the Santos estuarine system: a recent assessment. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22: 1858–1865.
- Brasil, 2013. Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução Anvisa nº 42, de 29 de agosto de 2013. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/dc0042_29_08_2013.html. Acessado em: 5 março 2024.
- Buruaem, L.M.; Castro, Í.B.; Hortellani, M.A.; Taniguchi, S.; Fillmann, G.; Sasaki, S.T. & Abessa, D.M.S. 2013. Integrated quality assessment of sediments from harbour areas in Santos-São Vicente Estuarine System, Southern Brazil. *Estuarine. Coastal. Shelf Science*, 130:179–189.
- Buzzi, N.S.; Menéndez, M.C.; Truchet, D.M.; Delgado, A.L. & Severini, M.F. 2022. An overview on metal pollution on touristic sandy beaches: Is the COVID-19 pandemic an opportunity to improve coastal management? *Marine. Pollution. Bulletin*, 174: e113275.
- Cabrini, T.M.; Barboza, C.A.; Skinner, V.B.; Hauser-Davis, R.A.; Rocha, R.C.; Saint'Pierre, T.D. & Cardoso, R.S., 2017. Heavy metal contamination in sandy beach macrofauna communities from the Rio de Janeiro coast, Southeastern Brazil. *Environmental Pollution*, 221: 116–129.
- Cabrini, T.M.; Barboza, C.A.; Skinner, V.B.; Hauser–Davis, R.A.; Rocha, R.C.; Saint'Pierre, T.D. & Cardoso, R.S. 2018. Investigating heavy metal bioaccumulation by macrofauna species from different feeding guilds from sandy beaches in Rio de Janeiro, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162: 655–662.
- Cajaraville, M.P.; Bebianno, M.J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C. & Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of The Total Environment*, 247(2–3): 295–311.
- Camargo, M.G. 2006. SysGran: um sistema de código aberto para análises granulométricas do sedimento. *Revista Brasileira de Geociências*, 36(2): 371–378.
- Cardoso, R.S.; Barboza, C.A.; Skinner, V.B. & Cabrini, T.M. 2016. Crustaceans as ecological indicators of metropolitan sandy beaches health. *Ecological Indicators*, 62: 154–162.
- Castiglioni, D.; Rezende, C.E.; Muniz, P.; Muir, A.I. & García-Alonso, J. 2018. Trace metals bioavailability approach in intertidal estuarine sediments and bioaccumulation in associated nereidid polychaetes. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 100: 472–476.
- CCME – Canadian Council of Ministers of the Environment. 2002. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: Summary tables. Updated. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg. <http://www.popstoolkit.com/Tools/SitePrioritization/Files/Guidelines/SedQ%20aquatic%20life.pdf>. Accessed June 20, 2023.

- Cesar, A.; Choueri, R.B.; Gusso–Choueri, P.K. & Pereira, C.D.S. 2012. Integrative approach for the environmental quality assessment of aquatic ecosystems: A critical review. *Global Journal of Environmental Science and Technology*, 1: 2–9
- Cetesb – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2001. **Sistema Estuarino de Santos e São Vicente** – São Paulo: Relatório do Programa de Controle de Poluição, 4p.
- Cetesb – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2023. **Qualidade das águas costeiras do estado de São Paulo** – São Paulo: Relatório Anual de Águas Costeiras de 2022, 95p.
- Clark, R.B. 2001. **Marine Pollution**. New York: Oxford University Press, Vol. 5: 237p.
- Constantino, W.D.; Ferreira, K.A.; Zalmon, I.R. & Soares-Gomes, A. 2024. Short-term changes in the spatial distribution of the ghost shrimp *Callichirus corruptus* (Decapoda: Axiidea, Callichiridae) from southwestern Atlantic. *Marine Biology*, 171(1): 37.
- Corte, G.N.; Esmaeili, Y.S.; Maria, T.F.; Costa, L.; Mattos, G.; Checon, H.H. & Barboza, C.A.D.M. 2023. The science we need for the beaches we want: frontiers of the flourishing Brazilian ecological sandy beach research. *Frontier of Marine Science*, 10: e1200979.
- Costa, M.F.; Araújo, C.M.B.; Chagas–Spinelli, A.C.O.; Santanna Junior, N. & Souza, S.T. 2004. Poluição Marinha. In: Costa, M.F. (Ed.). **Oceanografia: um cenário tropical**. Recife: Editora Bagaço, Vol. 1: 761p.
- Costa, L.L.; Constantino, W.D.; Ferreira, K.A.; Zalmon, I.R. & Soares-Gomes, A. 2022. Sandy beach ecology in the Anthropocene: Ghost shrimp (Crustacea: Callinassidae) as a study model. *Estuarine Coastal Shelf Science*, 275: e107999.
- Costa, L.L.; Soares-gomes, A. & Zalmon, I.R. 2021. Burrow occupation rates and spatial distribution within habitat of the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787): implications for impact assessments. *Regional Studies Marine Science*, 44: e10169.
- Costigan, M.; Cary, R. & Dobson, S. 2001. **Vanadium pentoxide and other inorganic Vanadium compounds**. Geneva: World Health Organization, Vol. 1: 53p.
- Defeo, O.M.; McLachlan, A.; Schoeman, D.S.; Schlacher, T.A.; Dugan, J.; Jones, A.; Lastra, M. & Scapini, F., 2009. Threats to sandy beach ecosystems: a review. *Estuarine Coastal Shelf Science*, 81: 1–12.
- Duarte, L.F.; 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 areas from the western Atlantic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133: 176–187.
- Duarte, L.F.; Souza, C.A.; Pereira, C.D.S. & Pinheiro, M.A.A. 2017. Metal toxicity assessment by sentinelspecies of mangroves: In situ case study integrating chemical and biomarkers analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 367–376.
- Eisler, R. 1998. **Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review**. US Department of the Interior, US Geological Survey, Patuxent Wildlife Research Center, Vol. 1: 76p.
- Eisler, R. 2009. **Compendium of trace metals and marine biota: Volume 1: Plants and Invertebrates**. Elsevier, Amsterdam, 602p.
- Eisler, R. 2010. Crustaceans. In: Eisler, R. (Ed.). **Compendium of Trace Metal in Marine Biota**. Amsterdam: Elsevier, Vol. 1: 577p

- Engel, D.W. & Brouwer, M. 1987. Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism. *The Biological Bulletin*, 173(1):239–251.
- Fishelson, L.; Bresler, V.; Manelis, R.; Zuk–Rimon, Z.; Dotan, A.; Hornung, H. & Yawetz, A. 1999. Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment. *Science of the Total Environment*, 226(2–3): 121–131.
- Folk, R.L. & Ward, W.C. 1957. Brazos River bar: a study in the significance of grain size parameters. *Journal of Sedimentary Petrology*, 27: 3–26.
- Förstner, U. & Wittmann, G.T.W. 1981. **Metal Pollution in the Aquatic Environment**. Nova York: Berlin Heidelberg, Vol. 2: 110p.
- García-Alonso, J.; Greenway, G.M.; Munshi, A.; Gómez, J.C.; Mazik, K.; Knight, A.W.; Hardege, J.D. & Elliott, M., 2011. Biological responses to contaminants in estuaries: disentangling complex relationships. *Marine Environmental Research*, 71(4): 295–30.
- Gaur, V.K.; Gupta, S.K.; Pandey, S.D.; Gopal, K. & Misra, V. 2005. Distribution of heavy Metals in sediment and water of River Gomti. *Environmental Monitoring Assessment*, 02: 419–433.
- GERIN – Gerência de Inteligência de Mercado e Estatísticas. 2024. Mensário Estatístico do Porto de Santos (fevereiro/2023). Disponível em: https://intranet.portodesantos.com.br/docs_codesp/doc_codesp_pdf_site.asp?id=141031 >. Acessado em: 02 de maio de 2024.
- Gomes, J.D.; Abrunhosa, F.A.; Smith, D.D.J. & Asp, N.E. 2013. Mangrove sedimentary characteristics and implications for crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda, Ucididae) distribution in an estuarine area of the Amazonian region. *Acta Amazonica*, 43: 481–488.
- Gonçalves, C.; Figueira, R.C.L.; Sartoretto, J.R.; Salaroli, A.B.; Ribeiro, A.P.; Ferreira, P.A.L.; & Mahiques, M.M. 2013. Reconstruction of historical trends in potentially toxic elements from sediment cores collected in Bertioga Channel, southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 61(2): 149–160.
- Goulart, M. & Callisto, M. 2003. Bioindicadores de Qualidade de Água como Ferramenta em Estudos de Impacto Ambiental. *Revista da FAPAM*, 2(1): 156–164.
- Habig, W.H. & Jakoby, W.B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S–Transferases. In: (Ed.) Jakoby, W.B. **Methods in enzymology**. California: University of California Academic Press, Vol 77: 376p.
- 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.
- Hernández, P.; Hereman, M.J.; Pimenta, C.E.; Rio, J.P.; João, M.C. & Pinheiro, M.A.A. 2019. La efectividad de una ley de protección al servicio de la conservación de un recurso marino: El ejemplo del camarón fantasma *Callichirus major* (Decapoda, Callinassidae) de la costa de Brasil. *Iheringia, Série Zoológica*, 109: e2019001.
- Hernaéz, P.; Miranda, M.S.; Rio, J.P.P & Pinheiro, M.A.A. 2022. A new species of the ghost shrimp genus *Callichirus* Stimpson, 1866 (Decapoda: Axiidea: Callichiridae) from the southwestern Atlantic, long confounded with *C. major* (Say, 1818), with neotype designation

- and an illustrated key to the western Atlantic species. *Jornal of Natural History*, 56(9–12): 533–563.
- Honig, R.A.; McGinniss, M.J.; Buikema, A.L.; & Cairns, J. 1980. Toxicity tests of aquatic pollutants using *Chilomonas paramecium* Ehrenberg (Flagellata) populations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 25: 169–175.
- Hortellani, M.A.; Sarkis, J.E.; Abessa, D. & Sousa, E.C. 2008. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do Estuário Santos-São Vicente. *Química Nova*, 31(1): 10–19.
- Hyndes, G.A.; Berdan, E.L.; Duarte, C.; Dugan, J.E.; Emery, K.A.; Hamback, P.A.; Henderson, C.J.; Hubbard, D.M.; Lastra, M.; Mateo, M.A.; Olds, A. & Schlacher, T.A. 2022. The role of inputs of marine wrack and carrion in sandy-beach ecosystems: a global review. *Biological Reviews*, 97: 2127–2161.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas Sociais, 2022. <https://ibge.gov.br>. Accessed July 28, 2023.
- Ihaka, R. & Gentleman, R. 1996. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5(3): 299–314.
- Izar, G.M.; Gimiliani, G.T.; Nobre, C.R.; Takada, H.; Fontes, R.F.C.; & Abessa, D.M.D.S. 2022. Can the colors of beach-stranded plastic pellets in beaches provide additional information for the environmental monitoring? A case study around the Santos Port, Brazil. *International Aquatic Research*, 14(1): 23–40.
- Jones, C.G.; Lawton, J.H. & Shachak, M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Nordic Society Oikos*, 69(3): 130–147.
- Jonathan, M.P.; Roy, P.D.; Thangadurai, N.; Srinivasalu, S.; Rodríguez-Espinosa, P.F.; Sarkar, S.K.; Lakshumanan, C.; Navarrete-López, M. & Muñoz-Sevilla, N.P. 2011. Metal concentrations in water and sediments from tourist beaches of Acapulco, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 845–850.
- Karlonienė, D.; Pupienis, D.; Jarmalavičius, D.; Dubikaltinienė, A. & Žilinskas, G. 2021. The impact of coastal geodynamic processes on the distribution of trace metal content in sandy beach sediments, south-eastern Baltic Sea coast (Lithuania). *Applied Sciences*, 11(3): e1106.
- Kim, B.S.M.; Salaroli, A.B.; Ferreira, P.A.L.; Sartoretto, J.R.; Mahiques, M.M. & Figueira, R.C.L. 2016. Spatial distribution and enrichment assessment of heavy metals in surface sediments from Baixada Santista, Southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 103(1–2): 333–338.
- Kim, B.S.M.; Angeli, J.L.F.; Ferreira, P.A.L.; Mahiques, M.M. & Figueira, R.C. L. 2018. Critical evaluation of different methods to calculate the Geoaccumulation Index for environmental studies: A new approach for Baixada Santista – Southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 127: 548–552.
- Kim, B.S.M.; Angeli, J.L.F.; Ferreira, P.A.L.; Mahiques, M.M. & Figueira, R.C.L. 2019. A multivariate approach and sediment quality index evaluation applied to Baixada Santista, Southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 143: 72–80.
- Kozioł, A.; Paso K.G. & Kuciel, S. 2022. Properties and recyclability of abandoned fishing net-based plastic debris. *Catalysts*, 12(9): 948.
- Klerks, P.L.; Felder, D.L.; Strasser, K. & Swarzenski, P.W. 2007. Effects of ghost shrimp on zinc and cadmium in sediments from Tampa Bay, FL. *Marine chemistry*, 104(1–2): 17–26.

- Lang, T.; Tam, N.F.Y.; Hussain, M.; Ke, X.; Wei, J.; Fu, Y. & Zhou, H. 2023. Dynamics of heavy metals during the development and decomposition of leaves of *Avicennia marina* and *Kandelia obovata* in a subtropical mangrove swamp. *Science of The Total Environment*, 855: 158700.
- Liao, Z.H.; Chuang, H.C.; Huang, H.T.; Wang, P.H.; Chen, B.Y.; Lee, P.T. & Nan, F.H. 2022. Bioaccumulation of arsenic and immunotoxic effect in white shrimp (*Penaeus vannamei*) exposed to trivalent arsenic. *Fish & Shellfish Immunology*, 122: 376–385.
- Lin, H.; Cui, J. & Bai, X. 2021. Feature extraction of marine water pollution based on data mining. *Symmetry*, 13(2): 355.
- Lobato, R.O.; Nunes, S.M.; Wasielesky, W.; Fattorini, D.; Regoli, F.; Monserrat, J.M. & Ventura-Lima, J. 2013. The role of lipoic acid in the protection against of metallic pollutant effects in the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(4): 491–497.
- Luoma, S.N. & Rainbow, P.S. 2008. **Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Management**. New York: Cambridge University Press, Vol. 1: 98–99p.
- Martinčić, D.; Kwokal, Ž. & Branica, M. 1990. Distribution of zinc, lead, cadmium and copper between different size fractions of sediments I: The Limski Kanal (North Adriatic Sea). *Science of the Total Environment*, 95: 201–215.
- Metian, M.; Hédouin, L.; Eltayeb, M.M.; Lacoue-Labarthe, T.; Teyssié, J.L.; Mugnier, C. & Warnau, M. 2010. Metal and metalloid bioaccumulation in the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) from New Caledonia: laboratory and field studies. *Marine pollution bulletin*, 61(7–12): 576–584.
- Moreira, E.G.; Vasconcellos, M.B.A.; Catharino, M.G.M.; Maihara, V.A. & Saiki, M. 2010. Long-term stability study on a *Perna perna* mussel candidate reference material. *Accreditation and Quality Assurance*, 15: 233–238.
- Napierska, D. & Skorkowski, E.F. 2001. Isolation and some properties of malic enzyme from the abdomen muscle of Antarctic krill *Euphausia superba*. *Bulletin of the Sea Fisheries Institute*, 1(152): 31–44.
- Negreiros-Fransozo, M.L.; Fransozo, A.; Pinheiro, M.A.A.; Mantelatto, F.L.M. & Santos, S. 1991. Caracterização Física e Química da Enseada da Fortaleza, Ubatuba, SP. *Revista Brasileira de Geociências*, 21(2): 114–120.
- Núñez-Nogueira, G. & Rainbow, P.S. 2005. Cadmium uptake and accumulation by the decapod crustacean *Penaeus indicus*. *Marine environmental research*, 60(3): 339–354.
- Nwabueze, J.C.; Sogbanmu, T.O. & Ugwumba, A.A. 2020. Physicochemical characteristics, animal species diversity and oxidative stress responses in dominant fish from an impacted site on the Lagos Lagoon, Nigeria. *Ife. Journal Science*, 22(2): 81–93.
- Ochiai, E.I. 1995. Toxicity of heavy metals and biological defense: principles and applications in bioinorganic chemistry–VII. *Journal of Chemical Education*, 72(6): 479.

- Osuala, F.I.; Abiodun, O.A.; Igwo-Ezikpe, M.N.; Oguejiofor, U. & Salami, O. 2018. Evaluation of Sixteen Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediment and Impacts on Benthic Macroinvertebrate Community Structure of the Lagos Lagoon. *NISEB Journal*, 18(3).
- Perina, F.C.; Torres, R.J.; Mozeto, A.A.; Nascimento, M.R.L. & Abessa, D.M.S. 2018. Sediment quality assessment of the tributaries of the Santos-São Vicente Estuarine System–Brazil. *Ecotoxicology Environmental Contamination*, 13(2): 25–38.
- Pinheiro, M.A.A., Silva, P.P.G., Duarte, L.F.A., Almeida, A.A., Zanutto, 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). *Ecotoxicological Environmental Safety*, 81: 114–121.
- Pinheiro, M.A.A.; Duarte, L.F.A.; Toledo, T.R.; Adams, M.A. & 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(10): 8273–8285.
- Pinheiro, M.A.A.; Souza, C.A.; Zanutto, F.P.; Torres, R.A. & Pereira, C.D.S. 2017. The crab *Ucides cordatus* (Malacostraca, Decapoda, Brachyura) and other related taxa as environmental sentinels for assessment and monitoring of tropical mangroves from South America. In: Larramendi, M.L. (Ed.). **Ecotoxicology and Genotoxicology Non-traditional Aquatic Models**. London: Royal Society of Chemistry (RSC), Vol. 33: 538p.
- Pourang, N.; Dennis, J.H. & Ghourchian, H. 2004. Tissue distribution and redistribution of trace elements in shrimp species with the emphasis on the roles of metallothionein. *Ecotoxicology*, 13: 519–533.
- Posey, M.H., 1986. Changes in a benthic community associated with dense beds of a burrowing deposit feeder, *Callinassa californiensis*. *Marine Ecology*, 31: 15–22.
- Pusceddu, F.H.; Guimarães, M.M., Lopes, L.O.; Souza, L.S.; Cortez, F.S.; Pereira, C.D.S. & Cesar, A. 2022. Biological effects of the antihypertensive losartan under different ocean acidification scenarios. *Environmental Pollution*, 292: 118329.
- R Core Team. 2021. **R: A language and environment for statistical computing**. Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rainbow, P.S. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental pollution*, 120(3): 497–507.
- Rainbow, P.S. 2007. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability, and toxicity. *Environment International*, 33(4): 576–582.
- Rainbow, P.S. & White, S.L. 1989. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia*, 174: 245–262.
- Raknuzzaman, M.; Ahmed, M.K.; Islam, M.S.; Habibullah-Al-Mamun, M.; Tokumura, M.; Sekine, M. & Masunaga, S. 2016. Trace metal contamination in commercial fish and crustaceans collected from coastal area of Bangladesh and health risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17): 17298–17310.
- Reichmuth, J.M.; Weis, P. & Weis, J.S. 2010. Bioaccumulation and depuration of metals in blue crabs (*Callinectes sapidus* Rathbun) from a contaminated and clean estuary. *Environmental Pollution*, 158(2): 361–368.

- Rodrigues, P.A.; Ferrari, R.G.; Kato, L.S.; Hauser–Davis, R.A. & Conte–Junior, C.A. 2022. A systematic review on metal dynamics and marine toxicity risk assessment using crustaceans as bioindicators. *Biological Trace Element Research*, 1:1–23.
- Rodrigues S.A. & Shimizu R.M. 1997. Autoecologia de *Callichirus major* (Say, 1818). *Oecologia Australis*, 3(1): 155–170.
- Rumisha, C.; Elskens, M.; Leermakers, M. & Kochzius, M. 2012. Trace metal pollution and its influence on the community structure of soft bottom molluscs in intertidal areas of the Dar es Salaam coast, Tanzania. *Marine Pollution Bulletin*, 64: 521–531.
- Ryu, J.; Khim, J.S.; Kang, S.G.; Kang, D.; Lee, C. & Koh, C. 2011. The impact of heavy metal pollution gradients in sediments on benthic macrofauna at population and community levels. *Environmental Pollution*, 159: 2622–2629
- Sanches, R.A. 2004. **Caícaras e a Estação Ecológica de Juréia–Itatins: litoral sul de São Paulo**. São Paulo: Annablume / FAPESP, Vol. 1: 285p.
- Santana, D.C.N.; Perina, F.C.; Lourenço, R.A.; Silva, J.; Moreira, L.B. & Abessa, D.M.S. 2021. Levels of hydrocarbons and toxicity of water–soluble fractions of maritime fuels on neotropical invertebrates. *Ecotoxicology*, 30(10): 2109–2118.
- Sauve, S.; McBride, M. & Hendershot, W. 1998. Soil solution speciation of lead (II): Effects of organic matter and pH. *Soil Science Society of America Journal*, 62(3): 618–621.
- Souza, C.R.G. 2012. Praias arenosas oceânicas do estado de São Paulo (Brasil): síntese dos conhecimentos sobre morfodinâmica, sedimentologia, transporte costeiro e erosão costeira. *Revista do Departamento de Geografia*, 1: 308–371.
- Terwilliger, N.B. 2015. Oxygen transport proteins in Crustacea: hemocyanin and hemoglobin. In: Chang, T.S & Thiel, M. (Eds.). **Physiology: The Natural History of the Crustacean**. New York: Oxford University Press, Vol. 4: 528p.
- Thibodeaux, L.K.; Burnett, K.G. & Burnett, L.E. 2009. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. *Journal of Experimental Biology*, 212(21): 3428–3439.
- Torres, R.J.; Abessa, D.M.; Santos, F.C.; Maranhão, L.A.; Davanzo, M.B.; do Nascimento, M.R. & Mozeto, A.A. 2009. Effects of dredging operations on sediment quality: contaminant mobilization in dredged sediments from the Port of Santos, SP, Brazil. *Journal of soils and sediments*, 9: 420–432.
- Trevizani, T.H. 2018. **Bioacumulação e biomagnificação de metais pesados em teias tróficas de estuários do sul-sudeste do Brasil**. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO/USP), São Paulo, 179 p. (Tese de Doutorado).
- Trevizani, T.H.; Domit, C.; Santos, M.C.O. & Figueira, R.C.L. 2023. Bioaccumulation of heavy metals in estuaries in the southwest Atlantic Ocean. *Environmental Science and Pollution Research*, 30: 26703–26717.
- Trevizani, T.H.; Figueira, R.C.L.; Ribeiro, A.P.; Theophilo, C.Y.S.; Majer, A.P.; Petti, M.A.V. & Montone, R.C. 2016. Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms and sediments from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1–2): 366–371.

- Uchimiya, M.; Lima, I.M.; Klasson, K.T. & Wartelle, L.H. 2010. Contaminant immobilization and nutrient release by biochar soil amendment: roles of natural organic matter. *Chemosphere*, 80(8): 935–940.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency 1994. Method 7471A. Mercury in solid or semisolid waste (manual cold–vapor technique). *Revision 1*.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency 1996. Method 3050b Acid digestion of sediments, sludges and soils. *Revision 2*.
- Vig, K.; Megharaj, M.; Sethunathan, N. & Naidu, R. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research*, 8(1): 121–135.
- Vilhena, M.S.P.; Costa, M.L. & Berredo, J.F. 2012. Accumulation and transfer of Hg, As, Se, and other metals in the sediment-vegetation-crab-human food chain in the coastal zone of the northern Brazilian state of Pará (Amazonia). *Environmental Geochemistry and Health*, 35(4): 477–494.
- Wu, J.P.; Chen, H.C. & Huang, D.J. 2008. Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 73(7): 1019–1026.
- Wu, M.; Lin, Y.P.; Ruiz-Fernandez, A.C. & Sahu, B.K. 2023. Coastal environmental and ecological data analysis. *Frontier of Marine Science*, 9: e1126086.
- Zhu, Q.H.; Zhou, Z.K.; Tu, D.D.; Zhou, Y.L.; Wang, C.; Liu, Z.P. & Shu, M.A. 2018. Effect of cadmium exposure on hepatopancreas and gills of the estuary mud crab (*Scylla paramamosain*): Histopathological changes and expression characterization of stress response genes. *Aquatic Toxicology*, 195: 1–7.

Capítulo II – O Uso de Biomarcadores de Efeito no Camarão-fantasma *Callichirus corruptus*, para Identificação do Estado de Conservação de Duas Praias Arenosas no Sudeste Brasileiro.

Resumo

O estudo visou quantificar os danos genocitotóxicos no camarão-fantasma (*Callichirus corruptus*), em duas praias arenosas do Estado de São Paulo (Brasil), sendo uma urbana e mais impactada (Santos) e outra preservada (Juréia). Para isso foram utilizados dois biomarcadores de efeito, um deles genotóxico – ensaio micronúcleo ($MN\%$), complementado pelo estudo de anormalidades nucleares ($AN\%$) – e outro citotóxico – ensaio vermelho neutro ($NRRT$), para avaliar o potencial uso desse macrocrustáceo como espécie sentinela de qualidade ambiental de praias arenosas marinhas. Em cada praia foram estabelecidos três setores amostrais, onde foram capturados os exemplares de *C. corruptus* ($n=36$ /praia), totalizando 72 indivíduos avaliados no estudo. De cada exemplar foi obtida uma amostra de hemolinfa, que foi submetida à análise dos biomarcadores supracitados, com as respostas geradas resultando em informação sobre o efeito citogenotóxico nos setores e praias avaliadas. O tempo médio de retenção do vermelho neutro ($NRRT$), foi significativamente maior na Juréia (100 ± 24 min), quando comparado à Santos (59 ± 29 min), indicando uma maior viabilidade fisiológica celular e saúde global dos camarões na praia preservada. Não foram detectadas diferenças significativas de citotoxicidade entre os setores amostrais para cada praia. A frequência de células micronucleadas ($MN\%$) nos exemplares de Santos ($12 \pm 4 \%$), foi cerca de 2 vezes superior à dos indivíduos da Juréia ($5 \pm 1 \%$), sendo este último o nível basal de genotoxicidade para esta espécie em um ambiente preservado, indicando uma maior frequência de macrolesões nos camarões da praia urbana. As anormalidades nucleares seguiram a mesma tendência, com maior incidência em Santos, o que reflete seu maior impacto e efeito de estressores ambientais. Os dados sugerem que *C. corruptus* pode ser utilizado como espécie sentinela e indicadora da qualidade ambiental em praias arenosas. O maior efeito citogenotóxico observado nos camarões-fantasma de Santos, refletem o maior impacto antrópico dessa praia, existindo uma associação negativa entre os biomarcadores da relação $NRRT$ vs. $MN\%$ ($r = -0,81$; $p \leq 0,01$) e $NRRT$ vs. $AN\%$ ($r = -0,93$; $p < 0,01$), indicando um menor tempo de estabilidade lisossomal em indivíduos com maiores frequências de $MN\%$ e $AN\%$. Através da relação dos dois biomarcadores ($MN\%$ e $NRRT$) e a concentração de metais nos sedimentos das duas praias estudadas, foi observado uma correlação positiva para os danos genéticos $MN\%$ e $AN\%$ ($r \geq 0,77$ e $0,71$; $p \leq 0,01$, respectivamente) e o inverso com $NRRT$ ($r \leq -0,67$; $p \leq 0,01$). Já para as concentrações metálicas presentes nos camarões *C. corruptus*, foi verificada uma correlação positiva entre $NRRT$ vs. quatro metais (As , Cd , Cr e V) ($r \geq 0,64$; $p \leq 0,01$), enquanto o inverso ocorreu para as variáveis genotóxicas $MN\%$ e $AN\%$ ($r \leq -0,66$ e $-0,60$; $p \leq 0,01$, respectivamente). Os biomarcadores indicaram elevados danos genéticos e prejuízos à saúde global dos camarões em *STS*, certamente por conta de sua maior antropização, onde têm sido registrados contaminantes emergentes (fluoxetina e losartana), microplásticos (polimetilmetacrilatos etc.), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (*PAHs*) e metais. A correlação positiva entre o biomarcador citotóxico ($NRRT$) e quatro metais (As , Cd , Cr e V), indicam que por mais que os indivíduos da Juréia acumulem altas concentrações metálicas, elas não causaram alteração na estabilidade da membrana lisossomal. Os resultados obtidos são relevantes, possibilitando ações de monitoramento em praias arenosas e confirmando o uso de *C. corruptus* como espécie sentinela deste ecossistema no Brasil.

Palavras-chave: Anormalidades nucleares, camarão, citotoxicidade, micronúcleo.

1. Introdução

Os ecossistemas marinhos são responsáveis pela maior parte da biodiversidade do mundo (Duarte *et al.*, 2016), embora sofram a ameaça constante de várias substâncias tóxicas que têm sido liberadas diretamente em corpos hídricos, muitas vezes sem qualquer tratamento prévio, causando impacto negativo para a biota local (Pinheiro *et al.*, 2013; Zhong *et al.*, 2022). Dependendo da dosagem, a presença desses contaminantes é preocupante por sua biodisponibilidade e toxicidade à biota (Ahearn *et al.*, 2004; Rainbow, 2007; Duarte *et al.*, 2017). A acumulação desses elementos serve como um parâmetro importante para quantificar o nível de contaminação em ambientes naturais (Rainbow, 2007; Luoma & Rainbow, 2008; Angeli *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2023), porém, critérios recentes de avaliação de danos cito – genotóxicos têm sido considerados como a melhor forma de monitorar ambientes naturais (Pinheiro *et al.*, 2017; 2021; Adam *et al.*, 2023).

A presença de xenobióticos pode gerar distúrbios genéticos e fisiológicos nos organismos, os quais podem ser identificados e quantificados por biomarcadores de efeito (Pereira *et al.*, 2014; Nobre *et al.*, 2022). Estes efeitos podem ser subletais e precoces, podendo ser detectados e revertidos ao cessar a ação do agente estressor, antes que possam causar futuramente impactos mais graves e persistentes na população ou comunidade local (Duarte *et al.*, 2020; Pinheiro *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2022).

O uso desses modelos biológicos (bioindicadores) pode revelar uma espécie como “sentinela” ambiental, alguns deles, inclusive, apresentando importante função ecossistêmica (Pereira *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2016; Pinheiro *et al.*, 2017; Falcão *et al.*, 2020). Os biomarcadores de efeito em espécies sentinelas possibilitam um alerta precoce à toxicidade por contaminantes, antes que aspectos crônicos possam ocorrer, entre eles danos genéticos mais severos e persistentes, elevação da mortalidade, declínios populacionais (Adams, 1990; Fishelson *et al.*, 1999; Pinheiro *et al.*, 2017; Adam *et al.*, 2023), ou mesmo reduções substanciais na riqueza e diversidade biológica (Tavares & Carvalho, 1992; Abessa *et al.*, 2001).

No entanto, para que uma espécie possa ser considerada uma boa sentinela ambiental é necessário conhecer sua resposta basal aos biomarcadores de efeito em áreas preservadas, bem como a amplitude dessa resposta em comparação às áreas mais impactadas, assegurando sensibilidade à exposição ou um efeito associado (Schwacke *et al.*, 2013). Além disso, algumas características são de extrema importância para que uma espécie possa ser utilizada como

sentinela ambiental, para garantir seu uso em um protocolo de monitoramento futuro, tais como: **(1)** ser abundante e de fácil amostragem; **(2)** apresentar ampla distribuição geográfica; **(3)** ser resiliente à bioacumulação de substâncias tóxicas; **(4)** ser preferencialmente endêmica ao ambiente analisado; e **(5)** apresentar reduzida mobilidade ambiental (Van der Schalie *et al.*, 1999; Basu *et al.*, 2007; Schwacke *et al.*, 2013; Pinheiro *et al.*, 2017, 2022).

Neste sentido, alguns invertebrados marinhos têm sido confirmados como importantes bioindicadores de contaminação, com destaque à alguns grupos taxonômicos já empregados como espécie sentinela. Entre eles, figuram os crustáceos, que detêm excelente resposta em estudos de biomonitoramento (Livingstone, 1998), em especial aqueles relativos aos macrocrustáceos (p. ex., *Aristeus antennatus* – por Antó *et al.*, 2009; *Nephrops norvegicus* – por Antó *et al.*, 2009; e *Ucides cordatus* – por Pinheiro *et al.*, 2017, 2022).

Entre os crustáceos utilizados como sentinelas ambientais, merecem atenção os organismos que são considerados “espécies-chave” de ecossistemas, devido a sua capacidade de alterar parâmetros físico-químicos utilizados pela biota local (Birkeland, 1989; Jones *et al.*, 1994). Neste sentido, os camarões-fantasma (Callianassidae) são macrocrustáceos bioturbadores dos sedimentos em praias arenosas, alterando sua composição química e textura granulométrica (Berkenbusch & Rowden, 2003; Klerks *et al.*, 2007). Entre elas figura *Callichirus corruptus*, anteriormente reconhecida com a identidade *Callichirus major*, que é endêmica em toda a orla marinha brasileira (Hernández *et al.*, 2022).

O camarão *C. corruptus* possui expressivo potencial como espécie sentinela da qualidade ambiental, pois é considerado um “engenheiro ecossistêmico”, construindo suas galerias em sedimentos arenosos, onde desempenham importantes funções ecológicas (Rodrigues & Shimizu, 1997; Rosa *et al.*, 2018; Hernández *et al.*, 2019). Suas galerias permitem um grande fluxo hídrico e incorporação de matéria orgânica e poluentes aos sedimentos (Berkenbusch & Rowden, 2003), interferindo, portanto, em alguns processos funcionais importantes de praias arenosas marinhas (Souza *et al.*, 1995; Rodrigues & Shimizu, 1997; Constantino *et al.*, 2024). Pelo exposto, o biomonitoramento de seus parâmetros fisiológicos e genéticos, por meio de biomarcadores de efeito, pode ser empregado como um método viável à avaliação do *status* de qualidade ambiental desses ambientes (Livingstone, 1993; Souza *et al.*, 2022; Adam *et al.*, 2023).

O uso de populações de espécies bem-adaptadas e estabelecidas em certo ambiente, pode ser uma importante ferramenta para qualificar a saúde ambiental, permitindo comparar resultados de toxicidade com estudos ecológicos e de biodiversidade (Valbonesi *et al.*, 2003;

Pinheiro *et al.*, 2021). Pelo conhecimento toxicológico genético e fisiológico, muitos autores sugerem o uso de ensaios para estimar, precocemente, os efeitos de contaminantes aos organismos. Isso pode ser obtido com ensaios genotóxicos (Pinheiro *et al.*, 2017; Adam *et al.*, 2023) e citotóxicos (Duarte *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2022).

O ensaio que quantifica o tempo de retenção do vermelho neutro (*NRRT*), também conhecido como avaliação da saúde global, é um biomarcador citotóxico que exprime a saúde geral do animal por assegurar o tempo de funcionamento celular sem que ocorra a apoptose. Assim, os menores valores obtidos estão associados a ambientes contaminados, com o inverso ocorrendo em ambientes preservados, onde o tempo de integridade pode chegar a horas (Buratti *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2022; Nobre *et al.*, 2024).

Outro ensaio quantifica as macrolesões aos DNA, pela frequência de células micronucleadas em relação a mil analisadas (*MN‰*), sendo um ensaio genotóxico, gerando aumento um aumento crescente das células micronucleadas em animais que vivem em ambientes mais contaminados (Bolognesi & Hayashi, 2011; Duarte *et al.*, 2017; Pinheiro *et al.*, 2017; Guimarães *et al.*, 2021), bem como de valores reduzidos (basais) em ambientes preservados (< 2 *MN‰* para caranguejos de manguezal – Pinheiro *et al.*, 2021). Já as Anormalidades Nucleares (*AN‰*), quantifica diferentes categorias de deformações nucleares, oriundas da alteração na posição dos cromossomos, podendo revelar a sensibilidade de uma espécie à exposição agentes estressores ambientais, sendo considerado um teste complementar ao ensaio de micronúcleo (Serov, 2004; Adam *et al.*, 2023).

Os resultados basais para estes três biomarcadores, previamente quantificados em áreas preservadas, são de extrema relevância como ferramenta de análise, por serem valores de referência confrontados àqueles de áreas contaminadas (Pinheiro *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2022; Adam *et al.*, 2023), podendo variar interespecificamente com o estilo de vida e hábito alimentar da espécie (Pinheiro *et al.*, 2021). Até o momento, nenhuma espécie de camarão-fantasma ainda havia sido avaliada neste sentido, em especial *C. corruptus*, o que pode auxiliar o processo de validação de seu uso como espécie sentinela da qualidade ambiental em praias arenosas no Brasil.

Conhecendo a situação ambiental do Litoral Centro de São Paulo, onde se localiza a cidade de Santos, aliada às características bioecológicas do camarão-fantasma *Callichirus corruptus*, espera-se que ela possa ser utilizada como sentinela ambiental de praias arenosas marinhas no Brasil. Isto será possível pela determinação do nível basal desses biomarcadores de efeito na Praia da Juréia, considerada preservada, na Estação Ecológica Juréia-Itatins (ESEC

Juréia-Itatins), contrastando tais resultados aos registrados para uma praia urbana e antropizada, como a Praia de Santos.

2. Objetivos e Hipóteses

2.1. Objetivo Geral

Quantificar o efeito genocitotóxico no camarão-fantasma *Callichirus corruptus*, em duas praias arenosas que contrastam quanto ao seu histórico de impacto antrópico (praia urbana / impactada vs. praia preservada), com identificação dos níveis basais para dois biomarcadores de efeito, com possível validação desse macrocrustáceo como uma espécie sentinela da qualidade ambiental.

2.2. Objetivos Específicos

- Quantificar os danos citotóxicos pelo tempo de retenção do vermelho neutro (*NRRT*), para indivíduos de *C. corruptus* em duas praias arenosas no Estado de São Paulo (Brasil), que contrastam quanto a sua qualidade ambiental (Praia de Santos: urbana e impactada vs. Praia da Juréia: preservada);
- Quantificar os danos genotóxicos pela frequência de células micronucleadas (*MN%*), complementadas pela frequência de anormalidades nucleares (*AN*), para indivíduos de *C. corruptus* em duas praias arenosas no Estado de São Paulo (Brasil), que diferem em relação ao seu *status* ambiental (Praia de Santos: urbana e impactada vs. Praia da Juréia: preservada);
- Avaliar o potencial uso de *C. corruptus* como espécie sentinela de qualidade ambiental em praias arenosas marinhas, comparando valores registrados para dois marcadores de efeito genotóxico (ensaio micronúcleo) e citotóxico (ensaio vermelho neutro), bem como para anormalidades nucleares, pelo confronto dos níveis basais verificados em ambiente preservado (Praia da Juréia), em relação a um ambiente urbano e antropizado (Praia de Santos).

2.3. Hipóteses

- **Hipótese I:** Na Praia de Santos (ambiente urbano e antropizado) o tempo de retenção de vermelho neutro (*NRRT*) para *C. corruptus* apresenta valor médio ≤ 60 min, contrastando significativamente daquele registrado na Praia da Juréia (ambiente prístino) para esta mesma espécie, que minimamente corresponderá ao dobro deste tempo (≥ 120 min);
- **Hipótese II:** A frequência de anormalidades nucleares é significamente maior em um ambiente com estresse ambiental (*STS*), quando comparado a um ambiente com maior preservação (*JUR*);
- **Hipótese III:** A frequência basal de células micronucleadas para *C. corruptus* na Praia da Juréia (ambiente prístino) apresenta valor médio ≤ 2 MN‰, diferindo significativamente do valor médio registrado na Praia de Santos (ambiente urbano e antropizado).

3. Materiais e Métodos

3.1 Área de Estudo

Vide tópico “Introdução Geral e Descrição da Área de Estudo”.

3.2 Delineamento Amostral

O projeto foi delineado para duas praias arenosas, sendo uma delas urbana e antropizada (STS: Praia de Santos) e a outra preservada (JUR: Praia da Juréia). Para cada praia foram estabelecidos três setores amostrais (A, B e C – vide Fig. 2 – **Capítulo I**). Em cada setor foi efetuada uma amostragem aleatória com reposição, para uso de 12 camarões destinados às análises do biomarcador citotóxico (NRRT, Ensaio Vermelho Neutro). Para o biomarcador genotóxico (MN%, Ensaio de Micronúcleo), como também para a análise complementar de anormalidades nucleares (AN%), foram selecionadas as lâminas de cinco animais por setor, conforme realizado no trabalho de Duarte *et al.* (2016), compreendendo duas lâminas/exemplar/ensaio.

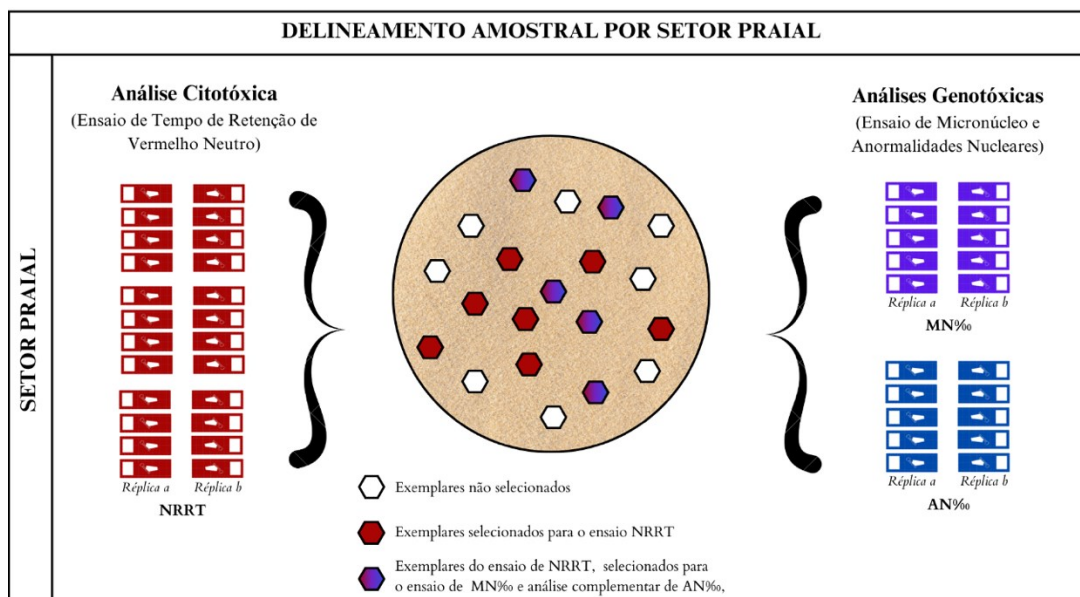


Figura 1. Delineamento amostral empregado em cada um dos três setores praias amostrados nas duas praias arenosas (Santos e Juréia). Siglas: AN%, Anormalidades Nucleares; MN%, Ensaio Micronúcleo; NRRT, Ensaio do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro. Formas: Hexágonos brancos, exemplares não selecionados; Hexágono Vermelho, exemplares selecionados para o ensaio NRRT; e Hexágonos Multicoloridos, exemplares do ensaio de NRRT, selecionados para os ensaios MN%, bem como AN%.

3.3. Amostragem de *Callichirus corruptus*

Vide tópico “3.4. Amostragem de *Callichirus corruptus*”, presente no **Capítulo I** “Contaminação por metais no Camarão-Fantasma *Callichirus corruptus* e nos sedimentos de duas praias arenosas do Estado de São Paulo, com diferentes níveis de antropização.”

3.4. Biometria de *Callichirus corruptus*

Vide tópico “3.5. Biometria de *Callichirus corruptus*”, presente no **Capítulo I** “Contaminação por metais no Camarão-Fantasma *Callichirus corruptus* e nos sedimentos de duas praias arenosas do Estado de São Paulo, com diferentes níveis de antropização.”

Quadro 1. Classificação do estado de saúde dos exemplares de *Callichirus corruptus*.

Estado de Saúde (%)	Classificação	Postura do Exemplar	Batimento / Movimento dos Pleópodos	Movimento dos Pereiópodos
100 – 75%	Ótima	Região Dorsal para cima	Muito frequente	Muito frequente
75 – 50%	Boa	Região Lateral para cima	Pouco frequente	Pouco frequente
50 – 25%	Regular	Região Lateral ou Ventral para cima	Fraco	Fraco
25 – 0%	Péssima	Região Lateral ou Ventral para cima	Ausente	Ausente

3.5. Preparação para as Análises Citogenotóxicas

As lâminas de microscopia utilizadas nos dois ensaios foram previamente lavadas com solução de detergente (Extran Ácido® 10%) e, em seguida, com água deionizada em abundância, para a remoção da solução anterior. Posteriormente, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e reservadas para uso.

Para o desenvolvimento da análise de Genotoxicidade (Ensaio Micronúcleo, MN%), complementado pela análise de Anormalidades Nucleares (AN%), foram realizadas 02 lâminas com esfregaço de hemolinfa/exemplar, considerando cinco exemplares/setor (n=15 lâminas/praias). Cada lâmina foi devidamente identificada com o nome da praia (STS, Santos; ou

JUR, Juréia), setor praial (*A*, *B* ou *C*), número do animal (1 a 5) e réplica amostral (lâmina: *a* ou *b*), resultando em um código (p. ex., *STS-B-3a*), sendo selecionada no final apenas cinco lâminas para análises desses ensaios.

Para a análise de citotoxicidade (Ensaio Vermelho Neutro, *NRRT*), cada lâmina já lavada e seca recebeu em sua face de trabalho 10 µL de Poly-L-lisina diluída em água destilada (proporção 1:10), espalhados homogeneamente por toda a superfície, com posterior secagem em temperatura ambiente. Para essa análise foram realizadas 02 lâminas com esfregaço de hemolinfa/exemplar, considerando 12 exemplares/setor (n=36 exemplares/praia).

Para cada setor praial foram selecionados, aleatoriamente, 12 exemplares por setor (*vide* item “*Delineamento Amostral*”), que foram submetidos à punção de 0,25 mL de hemolinfa com o auxílio de seringa (1 mL), munida de agulha 21 Gauge (0,8x40mm), para evitar danos aos hemócitos. Em cada seringa também foram colocados 0,25 mL de solução anticoagulante (*vide* Adam *et al.*, 2023), adaptada a partir da formulação de Durliat & Vranckx (1981) e Söderhäll & Smith (1983), para crustáceos decápodos.

Para cada animal em análise, após leve homogeneização da hemolinfa (0,25 mL) e solução anticoagulante (0,25 mL), a agulha da seringa foi removida e uma gota utilizada para o teste de genotoxicidade – *vide* o tópico “*Ensaio Micronúcleo (MN%)*” – enquanto o conteúdo restante da seringa (~ 0,45 mL) foi transferido para um *Eppendorf* (2 mL), para análise da citotoxicidade deste mesmo exemplar – *vide* tópico “*Ensaio Vermelho Neutro (NRRT)*”.

3.6. *Ensaio Micronúcleo (MN%)*

Após os preparativos iniciais para o *Ensaio Micronúcleo - MN%* (*vide* item “*Preparação para as Análises Citogenotóxicas*”), as lâminas seguiram o processamento modificado de Scarpato *et al.* (1990), já empregado com sucesso para o caranguejo de manguezal *Ucides cordatus* por Nudi *et al.* (2010) e Pinheiro *et al.* (2013, 2017 e 2021).

Uma gota da hemolinfa de cada animal foi depositada próxima a uma das extremidades da lâmina histológica (n=2 lâminas/exemplar – réplicas *a* e *b*), sendo imediatamente submetidas a um esfregaço com uma lâmina de arrasto. Em seguida, as lâminas com esfregaços foram dispostas sobre a bancada, para secagem à temperatura ambiente (30 min). Na sequência foram fixadas em Solução Carnoy (metanol + ácido acético, na proporção 3:1, por 20 min) e,

novamente, dispostas para secagem ao ar (~ 30 min). A coloração das lâminas ocorreu em cubetas de histologia (12 min), com solução de Azul Eosina de Metileno segundo Giemsa (*Merck*® 1.09204.1022), sendo em seguida lavadas com água deionizada em abundância, finalizando com nova secagem (30 min). Se necessário a lâmina recebeu uma lamínula (24x32mm), aderida com *Entellan*® *Merck*®, sendo guardadas em laminário após totalmente secas ($\approx$ 48 h).

A identificação e quantificação das células micronucleadas por 1.000 analisadas (*MN*‰) foi efetuada para cada animal, por observação de suas duas lâminas, que foram levadas a um microscópio óptico comum (*Axiolab*® *Zeiss*®), sob o aumento de 1.000x. Durante as análises cada lâmina o esfregaço foi percorrido num trajeto em *zig-zag*, com a contabilização do total de hemócitos micronucleados em relação a 1.000 hemócitos avaliados, com auxílio de um contador manual. Os micronúcleos foram reconhecidos segundo as características propostas por Countryman & Heddle (1976) e Souza *et al.* (2022), a saber: **(1)** tamanho < 1/3 do núcleo celular; **(2)** ausência de ligação ao núcleo celular; e **(3)** coloração (roxa) similar à do núcleo, mas podendo possuir tonalidade mais clara. Além disso, esses autores recomendam desconsiderar na contagem as células micronucleadas que apresentem mais do que três micronúcleos.

Embora a frequência basal das células micronucleadas em crustáceos decápodos possa diferir interespecificamente, segundo o estilo de vida e hábito alimentar (Pinheiro *et al.*, 2021), geralmente é ≤ 2 *MN*‰. Tal informação, associada a uma gradação dos valores assumidos por este biomarcador gênico, pode ser utilizada para categorizar a qualidade ambiental de um local, conforme proposto por Duarte *et al.* (2017) e Pinheiro *et al.* (2017), neste caso utilizando *Ucides cordatus* como espécie sentinela de manguezais.

3.7. Anormalidades Nucleares (*AN*‰)

As lâminas citadas no tópico anterior também foram empregadas na quantificação de anormalidades nucleares (*AN*‰), cada uma delas quantificada e expressa como frequência em relação a 1.000 hemócitos analisados.

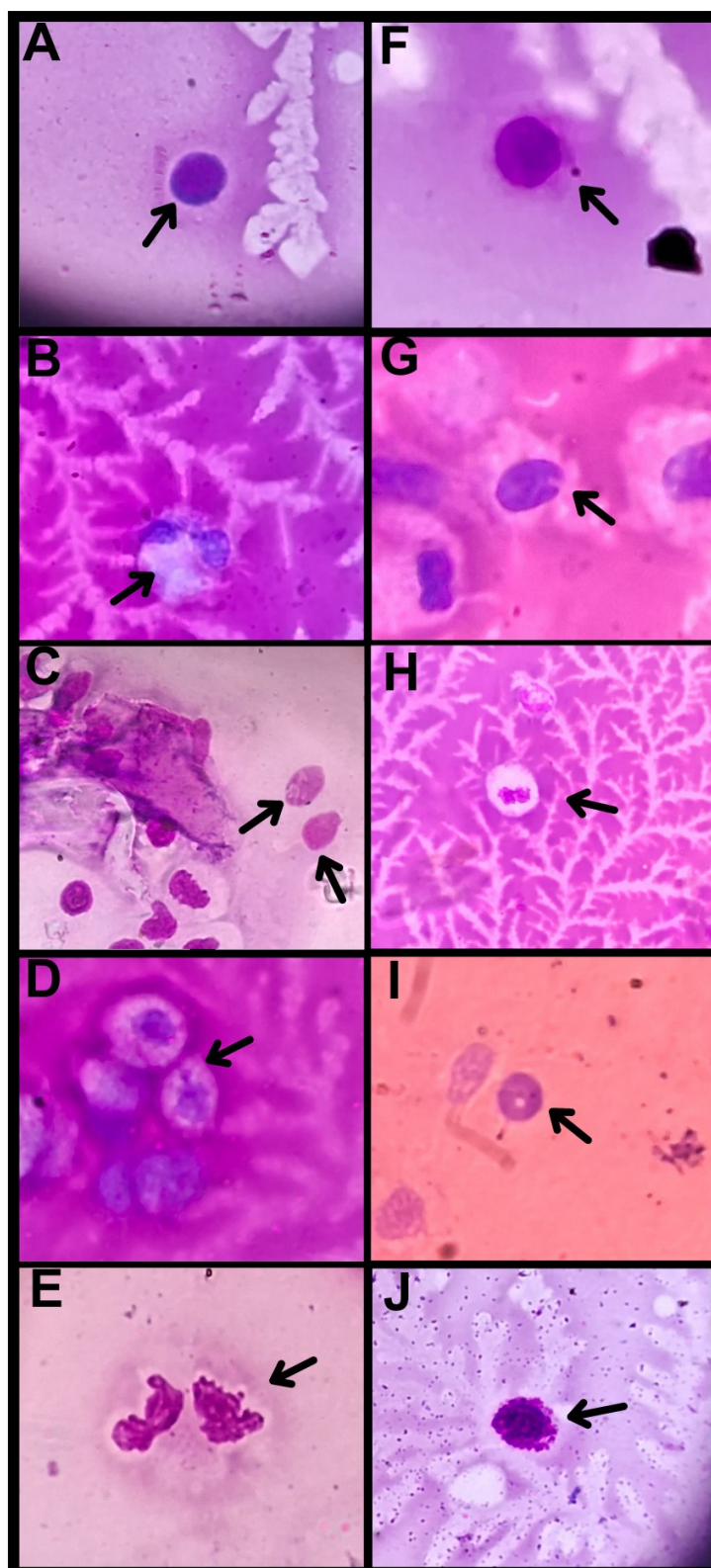


Figura 2. Anormalidades nucleares encontradas nos indivíduos de *C. corruptus*. Onde: **A**, Núcleo Normal (*NO*); **B**, Binucleada (*BI*); **C**, Núcleo Bolhoso (*BL*); **D**, Broto Nuclear (*NB*); **E**, Núcleo Lobado (*LB*); **F**, Micronúcleo (*MN*); **G**, Núcleo Entalhado (*NN*); **H**, Retração Nuclear (*RN*); **I**, Núcleo Vacuolado (*VN*); **J**, Núcleo Fragmentado (*FN*).

Segundo Carrasco *et al.* (1990), Souza & Fontanetti (2006) e Adam *et al.* (2023), tais anormalidades nucleares são apresentadas com diferentes morfotipos gênicos em função do estresse sofrido pelos indivíduos, conforme seguem: **(1) Núcleo Normal (NO)**, núcleo sem alterações quanto a sua delimitação, condição interna ou associação a outras estruturas em base de DNA; **(2) Binucleada (BI)**, presença de dois núcleos; **(3) Núcleo Bolhoso (BL)**, núcleo com pequena evaginação do envelope nuclear, contendo eucromatina ou heterocromatina mais densa (escura); **(4) Broto Nuclear (NB)**, núcleo apresentando prolongamento nuclear em uma direção; **(5) Núcleo Lobado (LB)**, núcleo com evaginações maiores em relação a BL, mas sem o mesmo detalhamento estrutural; **(6) Núcleo Entalhado (NN)**, núcleo apresentando uma fenda de largura uniforme, que se estende até o interior do núcleo; **(7) Núcleo Vacuolado (VN)**, núcleo apresentando em seu interior um vazio bem definido (cor branca ou similar), desprovido de qualquer material; e **(8) Núcleo Fragmentado (FN)**, núcleo extremamente fragmentado, apresentando várias evaginações ou com o material nuclear disperso no citoplasma adjacente (Fig. 2).

3.8 Ensaio de Tempo de Retenção de Vermelho Neutro (NRRT)

A integridade lisossomal foi observada por adaptação do método descrito inicialmente por Lowe *et al.* (1995), para moluscos bivalves, já tendo sido aplicado com sucesso para macrocrustáceos, como o *Ucides cordatus* (vide Pinheiro *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2017; e Souza *et al.*, 2022).

As amostras de hemolinfa nos *eppendorfs* passaram por um período de descanso (~ 15 min), quando foi preparada uma *solução de trabalho de vermelho neutro* (vide Adam *et al.*, 2023). Após o tempo de descanso, foram pipetados 40µL da solução de hemolinfa do *eppendorf*, em cada lâmina previamente tratada com Poly-L-lisina (02 lâminas por animal: réplicas *a* e *b*), as quais foram mantidas em câmara úmida escura. Em seguida, 40µL da solução de trabalho de vermelho neutro foi adicionado à cada lâmina, sendo misturado aos 40µL de hemolinfa, seguido de mais um tempo de descanso (~ 15 min). Decorrido este prazo, cada lâmina recebeu uma lamínula (24x32mm) com a solução extravasada pelas laterais da lamínula absorvidos com auxílio de um papel de filtro.

As lâminas foram dispostas sob microscópio ótico comum e avaliadas a cada 15 minutos, durante a primeira hora, e, se necessário, a cada 30 minutos, numa segunda hora de análise, até no máximo duas horas de avaliação. No início da observação, as células foram focalizadas sob

o aumento de 10_x, passando, em seguida, para 400_x. A observação também contou com redução na luz incidente, para melhor visualização celular e menor degradação fótica do vermelho neutro. O tempo de retenção do vermelho neutro (*NRRT*) pelos lisossomos, foi estabelecido até ser detectado algum efeito deletério do *DMSO* combinado ao vermelho neutro, sempre sendo considerado o período temporal anterior ao de apoptose celular.

Durante as análises foram avaliados somente hemócitos dos tipos granulócito e semi-granulócito, por critérios que caracterizam o estresse celular aos contaminantes, conforme estabelecido por Lowe *et al.* (1995) e Souza *et al.* (2022), a saber: **(1) Células saudáveis**, mais alargadas, apresentando formato irregular e com um elevado número de lisossomos pequenos e rosados; e **(2) Células estressadas**, mais pequenas e com formato arredondado, apresentando um baixo número de lisossomos grandes, que podem apresentar variação cromática, desde tons de laranja, vermelho e marrom.

3.9. Matriz de Associação

Com intuito de realizar a análise de componentes principais (PCA) e os testes de correlações adequado (*Pearson* ou *Spearman*), foram construídas duas matrizes com as variáveis de biomarcadores e concentrações metálicas (animal e sedimento). Para a construção da **Matriz I – Metais no Sedimento e Biomarcadores (06x10)**, os dados foram organizados em 06 linhas (01 amostra por setor: 03 setores JUR + 03 setores STS) *vs.* 10 colunas (07 variáveis metálicas: As, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V, Zn; tempo de retenção de vermelho neutro *NRRT*; micronúcleo: *MN*; e anormalidades nucleares: *AN*). Por outro lado, a **Matriz II – Metais no *C. corruptus* e Biomarcadores (30x11)**, teve sua construção através de 30 linhas (05 por setor= 15 indivíduos JUR + 15 indivíduos STS) *vs.* 11 colunas (08 variáveis metálicas: As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, V, Zn; tempo de retenção de vermelho neutro: *NRRT*; micronúcleo: *MN*; e anormalidades nucleares: *AN*).

Devido às diferentes ordens de grandeza das variáveis de cada matriz, elas foram inicialmente log-transformadas por $Y = \text{Log}(X+1)$, para uma padronização anterior às análises.

3.10. Análises Estatísticas

Os dados coletados foram digitados e organizados em planilhas eletrônicas do *Microsoft Excel*® 2019, enquanto o *R Studio* v. 1.4.1106 (Ihaka & Gentleman, 1996) foi empregado para as análises estatísticas e construção de gráficos.

As variáveis de biomarcadores de efeito (*MN%* e *NRRT*), assim como o teste complementar (*AN%*) foram previamente submetidas aos testes de pressupostos de homogeneidade das variâncias de Levene (*L*) e de normalidade de Shapiro-Wilk (*SW*). Para os dados confirmados como homocedásticos e normais ($p > 0,05$), foram submetidos a testes paramétricos ANOVA (*F*) ou teste-t de *Student* (*t*), para confronto das médias de um mesmo parâmetro entre indivíduos ou numa abordagem entre as duas praias (*STS* vs. *JUR*), respectivamente. Porém, os dados confirmados como não normais e heterocedásticos ($p < 0,05$), foram sujeitos a testes não paramétricos Kruskal-Wallis (*H*) ou Wilcoxon (*W*), confrontando as medianas de uma mesma variável.

O efeito genotóxico para *C. corruptus* também foi avaliado para cada praia, em função do valor basal registrado por Pinheiro *et al.* (2021), para crustáceos decápodos em uma área preservada (≤ 2 *MN%*), sendo outras áreas consideradas contaminadas se os valores obtidos forem superiores a este. Os mesmos procedimentos foram realizados com os dados de citotoxicidade (*NRRT*), neste caso confrontando os dados às categorias propostas por Duarte *et al.* (2017), visando, assim, qualificar ambientalmente as praias analisadas.

Foi realizado uma análise de componentes principais (PCA), para identificar as possíveis relações entre as variáveis, seja quanto a sua intensidade (tamanho do vetor) como direção (sinergia ou antagonismo). As relações também foram avaliadas, tendo sempre a variável dependente (eixo Y), em função da variável independente (eixo X). Dessa forma, temos as seguintes relações (n=30 cada), como seguem: **(1) *NRRT* vs. *MN%***; **(2) *NRRT* vs. *AN%***; e **(3) *MN%* vs. *AN%***. Os pontos empíricos foram representados pelo modelo matemático de melhor ajuste, avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2), possibilitando a interconversão entre variáveis, caso o modelo gerado apresente $R^2 \geq 0,70$.

O valor citotóxico (*NRRT*) (variável dependente) para cada um dos exemplares de *C. corruptus* (n=72) também foi relacionado à respectiva concentração total para cada elemento metálico (variável independente), aqui expressa pela soma das concentrações no hepatopâncreas, gônadas e musculatura em cada um desses animais (*vide* Capítulo I da presente dissertação). Estes pares ordenados foram submetidos à uma análise de regressão, seguindo o mesmo procedimento já descrito anteriormente quanto ao ajuste. O mesmo procedimento foi

efetuado quanto aos danos genotóxicos ($MN\%$ e $AN\%$) em relação à concentração dos metais ($n=30$). Além disso, esta mesma matriz de dados foi submetida a uma análise de associação, utilizando como parâmetro de resposta o coeficiente de correlação linear de *Pearson* (r), caso a relação seja melhor expressa por modelo linear, ou o coeficiente de correlação de *Spearman* (ρ), se o modelo não for linear. O mesmo processo também foi realizado contrastando os dados médios de cada biomarcador ($MN\%$ e $NRRT$), assim como o teste complementar de $AN\%$, (variáveis dependentes), de cada setor praial (A, B e C), relacionando com a concentração metálica de cada metal nos sedimentos arenosos ($n=6$) do respectivo setor.

Uma análise de proporção entre as anormalidades nucleares também foi efetuada, utilizando uma análise de proporções multinomiais para cada uma das $AN\%$ (BI , BL , FN , MN , NB , NN , RN e VN), assim como para o total de $AN\%$, seguindo a equação (Total de AN * Total de células) / Total de células analisadas. Para isso, foi comparada a frequência observada entre as variáveis categóricas de cada AN vs. Locais (JUR e STS), comparando cada categoria com a frequência esperada (FE), utilizando o teste de Qui-quadrado de *Pearson*, com posterior teste de correção de continuidade de Yates e ajuste do valor de p pelo método de *Bonferroni*. Para realização do teste ainda foram consideradas algumas restrições, os dados precisam possuir: **(1)** $n > 20$; **(2)** $FE > 1$; e **(3)** quando $20 < n < 40$, a FE tem que ser $FE > 5$.

Todas as análises foram avaliadas considerando um nível de significância estatística mínimo de 5%.

4. Resultados

4.1. Ensaio de Tempo de Retenção de Vermelho Neutro (NRRT)

O tempo médio de retenção do vermelho neutro pelos hemócitos de *C. corruptus* diferenciou significativamente entre as praias ($W = 11,4$; $p \leq 0,01$), com JUR (100 ± 24 min) correspondendo a quase o dobro do tempo registrado em STS (59 ± 29 min) (Fig. 3). Dessa forma, os exemplares da Juréia possuem NRRT, sendo considerados camarões com uma maior resistência lisossômica, apresentando também, uma maior saúde global, quando contrastadas aos indivíduos de Santos.

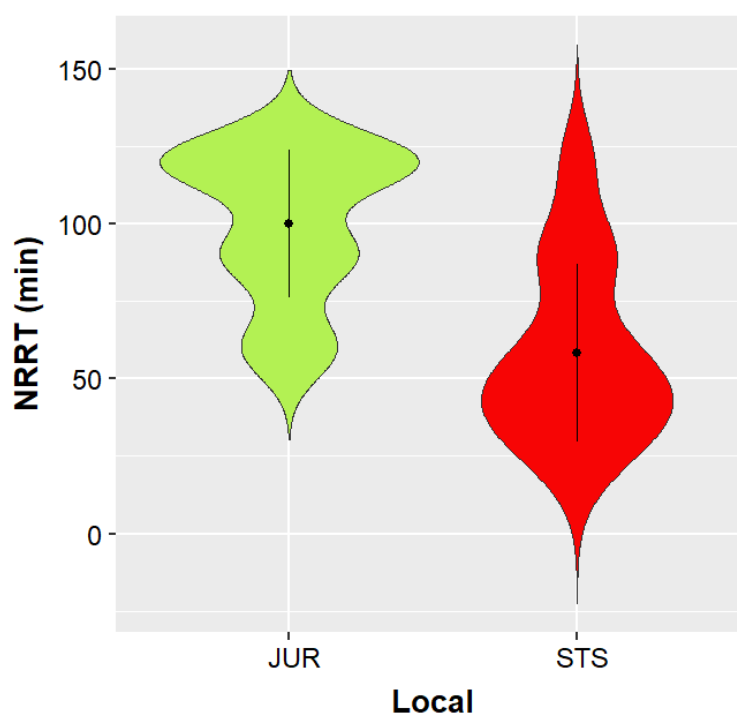


Figura 3. Citotoxicidade de *C. corruptus*, medida pelo tempo de retenção de vermelho neutro (NRRT, em minutos), em hemócitos de fêmeas coletadas na praia da Juréia (JUR, em verde) e de Santos (STS, em vermelho), com registros obtidos em novembro e dezembro/2022, respectivamente.

Quando analisado a diferença do biomarcador NRRT entre os setores praias, através de um teste de Kruskal -Wallis, foi observado que não existe diferença significativa entre os setores (A = 95 min; B = 102,5 min e C = 102,5 min) entre os indivíduos da praia da Juréia ($H = 0,51$; $p = 0,77$). Já para os exemplares da praia de Santos, foi identificado uma diferença significativa (KW = 2,58; $p = 0,01$) entre os indivíduos dos setores A e B (79 e 45 min,

respectivamente), no entanto, não foi observado diferenças entre os outros setores ($H \leq 0,06$; $p \geq 0,06$).

4.2. Ensaio de Anormalidades Nucleares (AN%)

Através do ensaio de anormalidades nucleares foi identificado uma diferença significativa entre oito anormalidades identificadas (*BI*, *LB*, *MN*, *RN*, *VN* e *FN*: $W \leq 54$; $p \leq 0,02$; *BL* e *NN*: $t \geq 2,9$), sendo 89 % superior para os indivíduos de *STS*, quando comparado aos exemplares de *JUR* (Tab. 1), não apresentando diferença apenas para o broto nuclear (*NB*) (*JUR* = 23 ± 9 %; *STS* = 29 ± 16 %) ($t = 1,4$; $p = 0,18$). A maior diferença apresentada foi apontada para as malformações retração nuclear (*RN*), núcleo vacuolado (*VN*) e núcleo fragmentado (*FN*), apresentando frequências de 2,2 a 18 vezes maiores nos camarões de Santos.

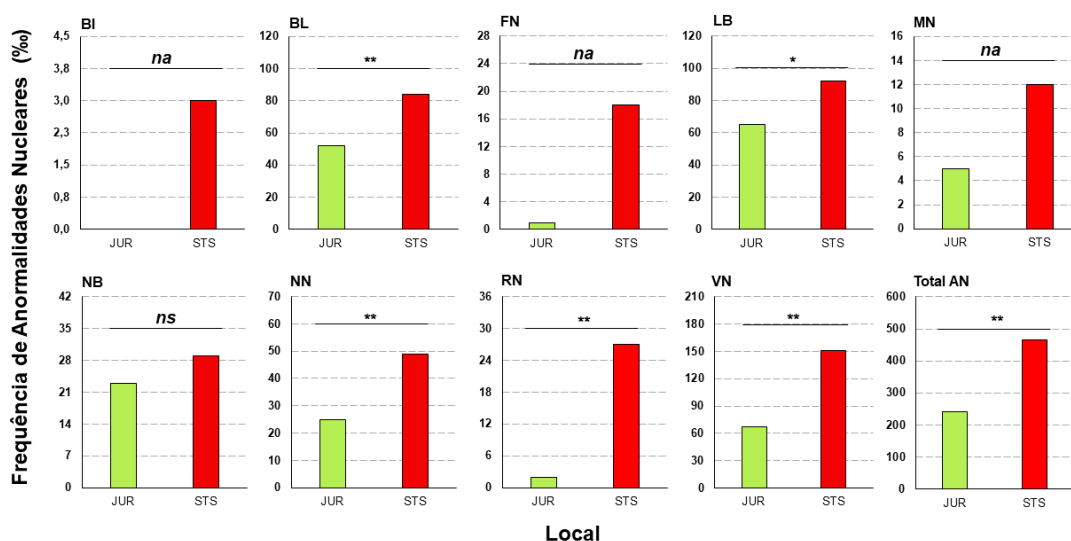


Figura 4. Gráficos de barras comparando as frequências de Anormalidades Nucleares (*BI*, Binucleada; *BL*, Núcleo Bolhoso; *FN*, Núcleo Fragmentado; *LB*, Núcleo Lobado; *NB*, Broto Nuclear; *NN*, Núcleo Entalhado; *RN*, Retração Nuclear; *VN*, Núcleo Vacuolado; *MN*, Micronúcleo; e *AN*, Anormalidades Nucleares;) em 30 amostras de hemolinfa dos camarões *C. corruptus* entre as praias da Juréia (*JUR*: verde) e de Santos (*STS*: Vermelha), em novembro e dezembro/2022, respectivamente. Onde: Não Aplicável (na), representam dados que não possuem os requisitos mínimos para teste do Qui-quadrado; Não Significativo (ns), são os dados cujo valor de $p > 0,05$; *, valor de $p < 0,05$ e **, valor de $p < 0,01$; todos referentes ao teste do Qui-quadrado.

Tabela 1. Comparação entre os biomarcadores Citotóxicos (*NRRT*, Tempo de Retenção de Vermelho Neutro, dado em minutos) e Genotóxicos (*BI*, Binucleada; *BL*, Núcleo Bolhoso; *NB*, Broto Nuclear; *LB*, Núcleo Lobado; *MN*, Micronúcleo; *NN*, Núcleo Entalhado; *RN*, Retração Nuclear; *VN*, Núcleo Vacuolado; *FN*, Núcleo Fragmentado, dado em frequência por %) em amostras de hemolinfa dos camarões *C. corruptus* de duas praias (*JUR*, Juréia; e *STS*, Santos), em novembro e dezembro/2022, respectivamente. Onde: Min, mínimo; Máx, máximo; x, média; s, desvio padrão; t, teste t; W, teste de Wilcoxon; X^2 , Qui-quadrado.

Biomarcadores Citogenotóxicos	Local	N	Min	Máx	x $\pm$ s	Qui-quadrado (X^2)	Test-t (t), Wilcoxon (W)
<i>NRRT</i>	<i>JUR</i>	36	60	120	100 $\pm$ 24 a	-	W: 1111
	<i>STS</i>	36	15	120	058 $\pm$ 29 b		
<i>BI</i>	<i>JUR</i>	15	0	1	0	na	W: 28,5
	<i>STS</i>	15	0	8	03 $\pm$ 03		
<i>BL</i>	<i>JUR</i>	15	20	93	52 $\pm$ 21 a	7,58 **	t: 2,9
	<i>STS</i>	15	39	159	84 $\pm$ 38 b		
<i>NB</i>	<i>JUR</i>	15	11	39	23 $\pm$ 09 a	0,49	t: 1,4
	<i>STS</i>	15	9	60	29 $\pm$ 16 a		
<i>LB</i>	<i>JUR</i>	15	39	103	65 $\pm$ 16 a	4,67 *	W: 56
	<i>STS</i>	15	38	174	92 $\pm$ 38 b		
<i>NN</i>	<i>JUR</i>	15	13	38	25 $\pm$ 08 a	7,42 **	t: 5,9
	<i>STS</i>	15	25	74	49 $\pm$ 14 b		
<i>RN</i>	<i>JUR</i>	15	0	15	02 $\pm$ 04 a	20,15 **	W: 13,5
	<i>STS</i>	15	1	57	27 $\pm$ 20 b		
<i>VN</i>	<i>JUR</i>	15	31	100	067 $\pm$ 26 a	35,47 **	W: 7
	<i>STS</i>	15	74	192	151 $\pm$ 29 b		
<i>FN</i>	<i>JUR</i>	15	0	4	01 $\pm$ 01 a	na	W: 11
	<i>STS</i>	15	1	86	18 $\pm$ 21 b		
<i>MN</i>	<i>JUR</i>	15	3	7	05 $\pm$ 01 a	na	W: 4
	<i>STS</i>	15	6	19	12 $\pm$ 04 b		
<i>Total AN</i>	<i>JUR</i>	15	185	316	240 $\pm$ 46 a	109,92 **	W: 0
	<i>STS</i>	15	344	589	465 $\pm$ 60 b		

Medidas de tendência central de um mesmo biomarcador, seguido por letras distintas, diferiram significativamente entre as praias em estudo ($p \leq 0,05$), em relação ao teste estatístico estabelecido (teste t ou Wilcoxon); na, representam dados que não possuem os requisitos mínimos para teste do Qui-quadrado; *, valor de p significativo a $p < 0,05$ e **, valor de p significativo a $p < 0,01$.

Através do teste do Qui-quadrado, foi possível observar que existe diferença significativa na proporção de cinco anormalidades nucleares (*BL*, *LB*, *NN*, *RN* e *VN*: $X^2 \geq 4,67$; $p \leq 0,03$) entre os exemplares das praias de Santos e Juréia, assim como para o total de *AN*% ($X^2 = 109,92$; $p = 2,2^{10-16}$) (Fig. 4). Para a anormalidade *NB*, não foi identificada discrepância entre as proporções ($X^2 = 0,71$; $p > 0,48$), enquanto para *BI*, *FN* e *MN*, não foi possível aplicar

o teste devido as amostras não atingirem um $N > 20$, requisito mínimo para aplicabilidade do χ^2 .

Quando comparamos o total de $AN\%$ entre os indivíduos das duas praias estudadas, foi observado que os camarões da Juréia ($240 \pm 46 \%$) apresentam uma frequência 1,9 vezes inferior aos valores encontrados nas amostras de hemolinfa os indivíduos de Santos ($465 \pm 60 \%$), sendo assim, os exemplares de STS possuem uma maior genotoxicidade perante essa análise ($W = 0$; $p < 0,01$).

Os camarões da praia de Santos apresentaram a seguinte hierarquia de anormalidades nucleares $VN (32,6 \%) > LB (19,9 \%) > BL (18,1 \%) > NN (10,6 \%) > NB (6,3 \%) > RN (5,8 \%) > FN (3,9 \%) > MN (2,6 \%) > BI (0,2 \%)$, enquanto os exemplares da Juréia possuem a organização hierárquica $VN > LB > BL > NN > MN > RN > FN > BI$, representada pelas porcentagens (27,9 %; 27,1 %; 21,7 %; 10,4 %; 2,1 %; 0,8 %; 0,4 %; 0; respectivamente), ocorrendo a troca das variáveis MN , RN e FN , em relação aos indivíduos de STS. Para ambas as praias, foram registrados maiores níveis de VN , LB e BL , sendo o BI a anormalidade de menor frequência.

4.3. Ensaio de Micronúcleo ($MN\%$)

Quando comparamos a frequência de $MN\%$ entre os camarões *C. corruptus* das duas praias estudadas, foi observado que os exemplares de Santos ($12 \pm 4 \%$) possuem valores significativamente superior ($W = 0$; $p < 0,01$) aos apresentados pelos indivíduos da Juréia ($5 \pm 1 \%$), possuindo uma relação 2,4 vezes maior em STS, apontando assim uma menor genotoxicidade nos animais de *JUR* (Fig. 5).

No que diz respeito ao biomarcador $MN\%$, foi observado através da Análise de Variância (Kruskal - Wallis), que não existe diferença na frequência de micronúcleo entre os indivíduos dos setores amostrais da Juréia (A: 5 %; B: 6 %; e C: 5 %) ($KW = 1,37$; $p = 0,50$), assim como para os exemplares de Santos (A: 14 %; B: 11 %; e C: 9 %) ($KW = 4,74$; $p = 0,09$).

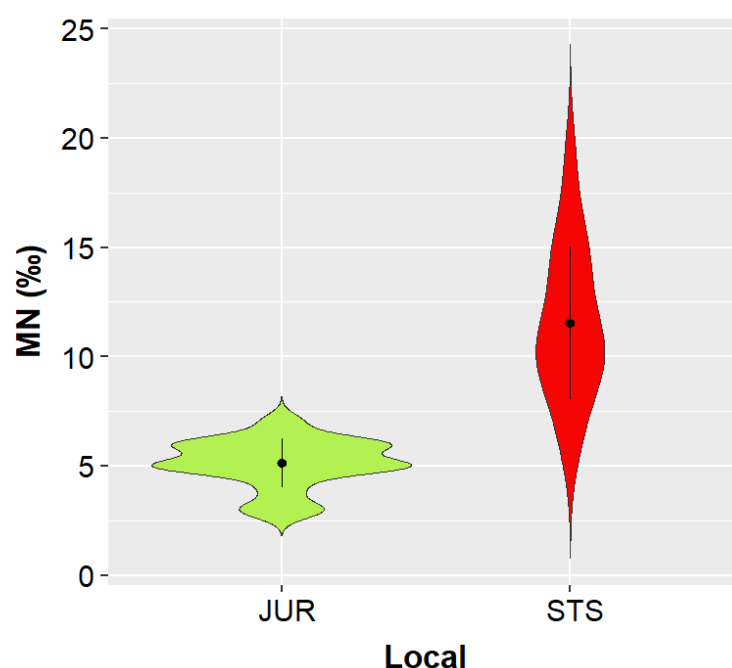


Figura 5. Genotoxicidade de *C. corruptus*, medida pelo ensaio de micronúcleo ($MN\%$), em células da hemolinfa de fêmeas coletadas na praia da Juréia (*JUR*, em verde) e de Santos (*STS*, em vermelho), com registros obtidos em novembro e dezembro/2022, respectivamente.

4.4. PCA e Análise de Associação: Biomarcadores e Metais no Sedimento.

Através da análise de componentes principais (*PCA*), foi identificado que 96,6% da variância dos dados, foram explicados pelas componentes principais *PC1* e *PC2*. A análise revelou que as variáveis $AN\%$ e $MN\%$ possuem ligação com a concentração dos metais (*As*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V* e *Zn*) presentes no sedimento (*vide Capítulo I*), apontando que os danos genéticos estão associados às concentrações metálicas do ambiente antropizado (*STS*). Quando comparamos as variáveis metálicas com o *NRRT*, a análise mostra sua associação inversa com a concentração de metais no ambiente, revelando que os indivíduos de um ambiente preservado (*JUR*), apresentam um maior tempo de retenção, e, conseqüentemente, animais com maior saúde global (Fig. 6).

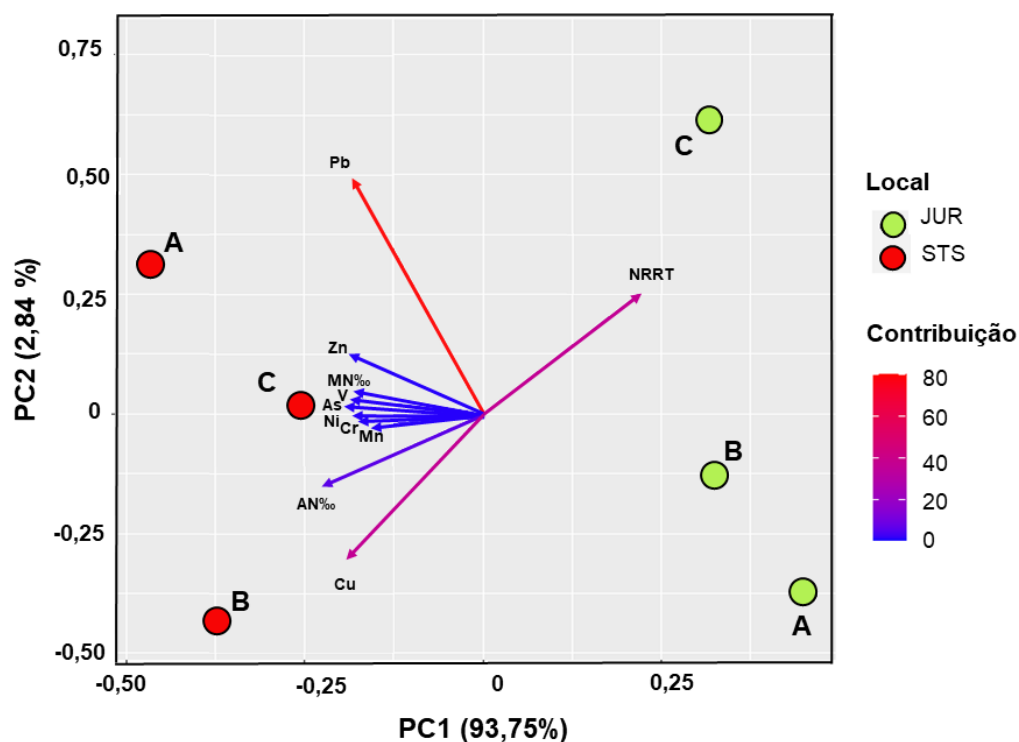


Figura 6: Análise de componentes principais com dados citotóxicos (*NRRT*, tempo de retenção de vermelho neutro), genotóxicos (*AN%*, anormalidades nucleares; *MN%*, micronúcleo) e concentrações metálica (*As*, arsênio; *Cr*, cromo; *Cu*, cobre; *Mn*, manganês; *V*, vanádio; *Pb*, chumbo; *Zn*, zinco), em amostras de sedimento arenoso coletados nas praias da Juréia (*JUR*) e Santos (*STS*) obtidas em novembro e dezembro/2022, respectivamente, em três diferentes setores (A, B, C).

A análise de associação entre os biomarcadores e a concentração de metais no sedimento (*As*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V* e *Zn*) (Fig. 7-A), revelou que *MN%* apresentou associação positiva e significativa com todos os elementos metálicos ($r \geq 0,77$; $p \leq 0,01$), sendo observado o mesmo para a variável *AN%* ($r \geq 0,71$; $p \leq 0,01$). Já no caso do *NRRT*, foi observado uma associação inversa com as concentrações metálicas nessa matriz abiótica ($r \leq -0,67$; $p \leq 0,01$).

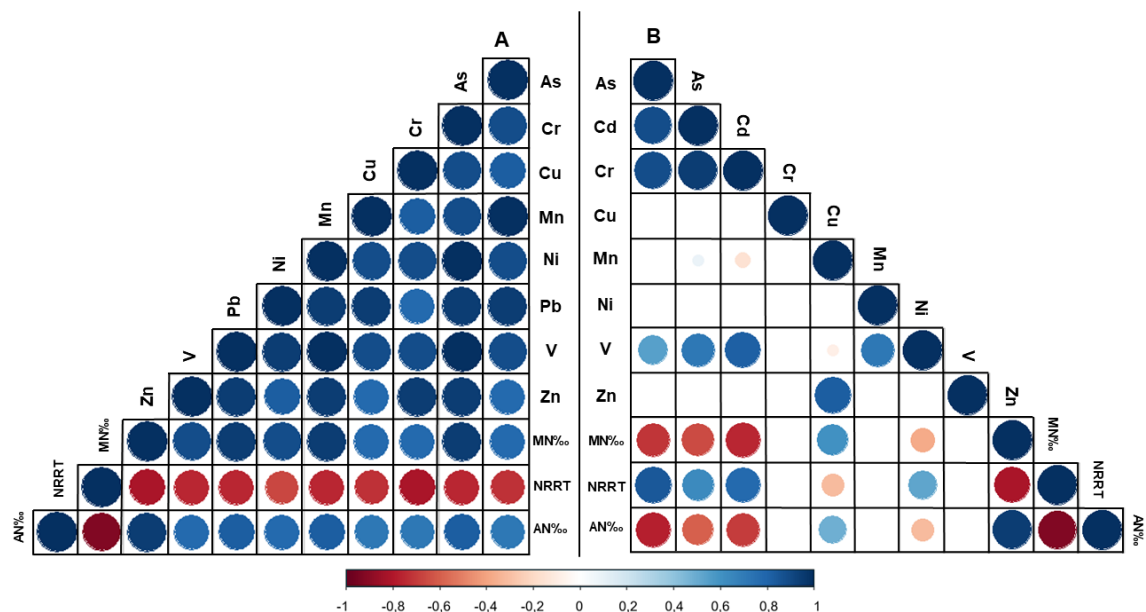


Figura 7. Correlação de *Pearson* entre as variáveis citotóxicas (*NRRT*, tempo de retenção de vermelho neutro) e genotóxicas (*AN%*, anormalidades nucleares; *MN%*, micronúcleo), em amostras de hemolinfa nos indivíduos de *Callichirus corruptus* das praias da Juréia (*JUR*) e Santos (*STS*), obtidas em novembro e dezembro/2022, respectivamente, comparando com: **A:** Concentrações metálicas em amostras de sedimentos arenosos (*As*, arsênio; *Cr*, cromo; *Cu*, cobre; *Mn*, manganês; *Ni*, níquel; *Pb*, chumbo; *V*, vanádio; *Zn*, zinco); e **B:** Concentrações metálicas nos indivíduos *C. corruptus* (*As*, arsênio; *Cd*, cádmio; *Cu*, cobre; *Cr*, cromo; *Mn*, manganês; *Ni*, níquel; *V*, vanádio; *Zn*, zinco). Obs.: espaços em branco representam correlações não significativas, com valor de $p > 0,05$.

4.4. PCA e Análise de Associação: Biomarcadores e Metais nos Tecidos do Camarão

Pela análise de componentes principais (PCA) foi verificado que 80,6 % da variância dos dados foi explicada pelas componentes principais PC1 e PC2 (Fig. 8). A análise revelou que as variáveis genotóxicas (*AN%* e *MN%*) e citotóxica (*NRRT*) foram antagônicas, direcionando o maior tempo de funcionamento lisossomal à *JUR*, consequentemente, onde ocorreu uma maior saúde global dos exemplares. Na análise também se confirma os biomarcadores genotóxicos (*AN%* e *MN%*) dos camarões direcionados à *STS*, onde ocorreu foi registrada a maior genotoxicidade nos indivíduos. O gráfico aponta, ainda, uma associação entre o acúmulo de metais nos tecidos de *C. corruptus* da Juréia e o *NRRT*.

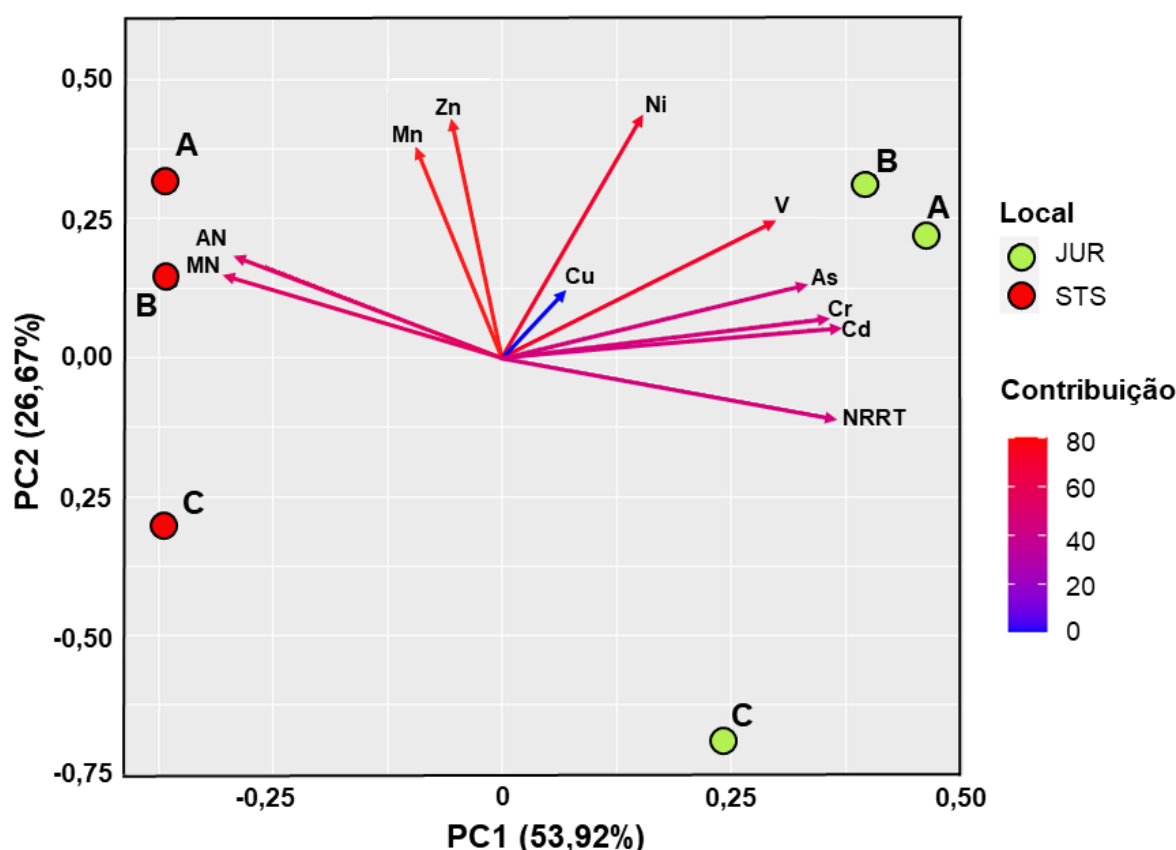


Figura 8. Análise de componentes principais com dados citotóxicos (*NRRT*, tempo de retenção de vermelho neutro), genotóxicos (*AN%*, anormalidades nucleares; *MN%*, micronúcleo) e concentrações metálicas (*As*, arsênio; *Cd*, cádmio; *Cr*, cromo; *Cu*, cobre; *Mn*, manganês; *V*, vanádio; *Zn*, zinco), em amostras de hemolinfa coletadas nos indivíduos de *C. corruptus* das praias da Juréia (*JUR*) e Santos (*STS*) obtidas em novembro e dezembro/2022, respectivamente, em três diferentes setores (A, B, C).

A análise de associação envolvendo o biomarcador citotóxico (*NRRT*) e as variáveis genotóxicas (*MN%* e *AN%*) (Fig. 7-B) revelou uma associação negativa e significativa ($r = -0,81$ e $-0,93$; $p < 0,01$, respectivamente), enquanto as variáveis genotóxicas entre si (*MN%* vs. *AN%*), indicam o inverso ($r = 0,94$; $p < 0,01$). No **Capítulo I**, em análise do efeito citotóxico (*NRRT*) pela concentração de metais (*As*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V* e *Zn*) no camarão, foi confirmada uma correlação positiva e significativa com quatro dos elementos metálicos (*As*, *Cr*, *Cu* e *V*: $r \geq 0,64$; $p \leq 0,01$), sendo observado o inverso quando em análise do efeito genotóxico para micronúcleos (*MN%* vs. Metais no Camarão: $r \leq -0,66$; $p \leq 0,01$) como para o efeito genotóxico para anormalidades nucleares (*AN%* vs. Metais no Camarão: $r \leq -0,60$; $p \leq 0,01$).

5. Discussão

Os resultados do presente estudo indicaram diferenças significativas na saúde dos camarões *Callichirus corruptus* coletados nas praias de Santos e Juréia, refletindo os diferentes níveis de contaminação ambiental entre os locais estudados. O Ensaio de Tempo de Retenção de Vermelho Neutro (*NRRT*) revelou que os camarões da Juréia, apresentaram uma estabilidade celular em relação aos de Santos, sugerindo que nessa primeira área os animais estão sujeitos a uma menor exposição aos contaminantes e maior resistência fisiológica. O ensaio genotóxico (*MN%*), assim como o teste de *AN%*, revelaram frequências mais elevadas de micronúcleos e anormalidades nucleares, respectivamente, nos indivíduos de Santos, indicativos de danos genéticos severos, certamente associados à poluição ambiental, conforme documentado em estudos anteriores. A PCA e análise de associação entre as variáveis genotóxicas e as concentrações metálicas no sedimento apontaram uma correlação positiva, independente do biomarcador ou teste complementar (*MN%* e *AN%*: $r \geq 0,71$; $p \leq 0,01$), comprovando como efeito dos metais as macrolesões ao DNA, mais evidentes no ambiente antropizado (*STS*). Já para o marcador citotóxico (*NRRT*) houve efeito negativo dos elementos metálicos ($r \leq -0,67$; $p \leq 0,01$), mostrando maiores valores e funcionamento celular no ambiente mais preservado (*JUR*). Por outro lado, foi constatada uma associação positiva e significativa do *NRRT*, como efeito da concentração de quatro elementos metálicos (*As*, *Cr*, *Cu* e *V*) em *C. corruptus*, evidenciando que eles não afetaram a saúde dos indivíduos dessa espécie na Juréia. Analisando os mesmos metais, foram observadas associações negativas significativas com as variáveis genotóxicas (*MN%* e *AN%*) e apontando que esses metais não foram os elementos responsáveis pelos danos genéticos registrados em Santos, o que poderia ser explicado por outros metais não avaliados, assim como outros xenobióticos (*p. ex.*, *PCBs*, bifenilos policlorados; *POCs*, pesticidas organoclorados; e *HPAs*, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos). Dessa forma, o estudo destaca a vulnerabilidade do camarão-fantasma em praias localizadas em áreas com maior adensamento populacional humano, demonstrando a importância da preservação de áreas menos impactadas como a Estação Ecológica Juréia-Itatins, aqui denominada *JUR*, a fim de garantir a integridade biológica local. A comparação entre as localidades não apenas evidencia os efeitos adversos da poluição na Praia de Santos, mas também sugere que medidas de gestão ambiental mais rigorosas sejam essenciais para mitigar os impactos negativos sobre a fauna marinha, aqui representada por *C. corruptus*.

5.1. Ensaio de Tempo de Retenção de Vermelho Neutro (NRRT).

A maior toxicidade celular foi registrada nos camarões-fantasma da Praia de STS (área antropizada), identificando um tempo de funcionamento celular nesta praia (58 ± 29 min) correspondendo a quase metade daquele registrado nos exemplares de JUR (100 ± 24 min). Igualmente, um maior tempo de funcionamento fisiológico dos hemócitos (200 ± 48 min) foi registrado para Juréia e Cananéia (SP), Litoral Sul do Estado de São Paulo, quando o NRRT foi quantificado para o caranguejo de mangue *Ucides cordatus* por Duarte *et al.* (2016), sugerindo que estas áreas seriam preservadas e categorizadas como provavelmente não impactadas (PNI). Segundo estes autores, este valor se contrastou àquele obtido em outras três áreas do Litoral Centro de São Paulo (São Vicente, Cubatão e Bertioga) ($NRRT < 60$ min), categorizadas como de alto impacto provável (PHI). Assim, esses autores mencionaram uma hierarquia de citotoxicidade para o caranguejo-uçá (*U. cordatus*) nos manguezais de $CUB > JUR$, semelhante ao verificado para *C. corruptus* nas praias do presente estudo ($STS > JUR$), tendo em vista que Santos e Cubatão são áreas que fazem parte do Sistema Estuarino Santos-São Vicente (SESSV). Este mesmo padrão foi registrado por Souza *et al.* (2022) para *U. cordatus* nos manguezais de JUR ($NRRT: 131 \pm 51$ min), com uma duração de funcionamento celular superior ao do SESSV (34 ± 20 min), o mesmo ocorrendo com Pinheiro *et al.* (2022), para a mesma espécie, nos manguezais de Cubatão (30 ± 9 min). Em relação a outros invertebrados, o tempo de funcionamento celular, pode ser ainda menor (27 ± 13 min), como verificado para o mexilhão *Perna perna* em São Vicente por Pereira *et al.* (2014).

Em trabalhos experimentais, como realizado para o caranguejo portunídeo *Carcinus aestuarii*, por Aliko *et al.* (2015), o tempo de retenção do vermelho neutro nos indivíduos controle (118 ± 28 min) foi três vezes superior ao registrado para aqueles submetidos a doses elevadas de Cu (36 ± 11 min). Nobre *et al.* (2024) constatou o mesmo em experimentos conduzidos com o caranguejo-uçá, com valor de $NRRT \sim 75$ minutos no grupo controle, quando confrontado ao efeito ocorrido naqueles expostos a metais (Al, Fe, Cu, Zr e Nb), que foi ~ 15 minutos, correspondendo em valores cinco vezes superiores nos indivíduos contaminados.

Esse estudo apresenta os níveis basais do biomarcador NRRT para *Callichirus corruptus* em uma área preservada (Praia da Juréia), assim como os valores alterados em outra área antropizada (Praia de Santos). Tais dados se contrastam ao tempo previamente estabelecido para outras espécies, pois este é um ensaio inicialmente estabelecido para moluscos bivalves (*Mytilus galloprovincialis*) por Scarpato *et al.* (1990), para o qual não foi avaliada sua resposta em ambientes contaminados. Desta forma, o registro de variações intraespecíficas, como

verificada no presente estudo para *C. corruptus*, como também para outras espécies, como *Carcinus aestuarii*, por Fossi *et al.* (2000), são de extrema relevância. O confronto destes estudos aos realizados para *U. cordatus* em áreas de manguezal (*vide* Duarte *et al.*, 2016; Pinheiro *et al.*, 2017, 2022; e Souza *et al.*, 2022), indicam que apesar da diferença entre o ecossistema manguezal, em relação ao de praias arenosas marinhas (*C. corruptus*, no presente estudo), existe uma coerência e similaridade nos resultados gerados por esse biomarcador, que não apresentou uma grande variação da resposta gerada entre estas espécies de crustáceos decápodos.

As respostas geradas pelo *NRRT* estão relacionadas ao conjunto de xenobióticos que constituem o histórico de contaminação em Santos, os quais comprometem o sistema de defesa das espécies que ali habitam, podendo levar a danos genéticos, desde os mais tênues aos mais severos em níveis mais basais de organização, como o nível celular (Rohr *et al.*, 2016; Nobre *et al.*, 2024). Outra situação a ser considerada seria, também, a maior resiliência de algumas espécies de invertebrados frente a outras, como verificado numa comparação entre espécies mais resilientes às condições adversas (*p. ex.*, *U. cordatus* e *C. corruptus*), do que outras que são mais sensíveis (*p. ex.*, a craca, *Balanus glândula*) (Laitano & Fernández-Gimenez, 2016). Ao quantificar o tempo de estabilidade da membrana lisossomal se avalia o tempo de funcionamento celular, visto que outras membranas de organelas, bem como a nuclear e citoplasmática passam pelo mesmo processo de degradação, como resposta a maior sensibilidade delas ao estresse ambiental causado por um ou mais contaminantes. Segundo Nobre *et al.* (2024), os lisossomos são organelas celulares responsáveis por importantes processos biológicos (*p. ex.*, digestão celular, desintoxicação e imunoreatividade), portanto, alterações em sua membrana podem impactar direta ou indiretamente a nutrição celular (Pereira *et al.* 2014; Pinheiro *et al.* 2017), podendo, inclusive, trazer prejuízos aos processos reprodutivos e de defesa imunológica (Ringwood *et al.*, 2004), em prejuízo à biota local (Duarte *et al.*, 2017; Nobre *et al.*, 2022).

Dessa forma, o presente estudo confirma a **Hipótese I**, onde os indivíduos de um ambiente antropizado (*STS*), apresentaram um tempo de retenção (*NRRT* < 60 min), apontando assim, uma alta citotoxicidade para os camarões *C. corruptus* deste local, com o inverso ocorrendo na área preservada (*JUR*), com um *NRRT* > 60 min, indicando uma maior saúde destes indivíduos.

6.2. Anormalidades Nucleares (AN%)

A maior frequência verificada para o total de anormalidades nucleares para *C. corruptus* na Praia de Santos (465 ± 60 %) em comparação à Juréia (240 ± 46 %), pode ser explicada pela maior antropização da região onde ela ocorre, em resposta à ampla e expressiva variedade de contaminantes (Cortez *et al.*, 2019). O estudo de Cortez *et al.* (2019), apontam, inclusive, elevadas concentrações de contaminantes emergentes (p. ex., losartana potássica e fluoxetina, utilizadas em medicamentos para controle da hipertensão e depressão, respectivamente), enquanto Medeiros & Bicego (2004) e Torres *et al.* (2012) indicam a presença de hidrocarbonetos alifáticos (alcanos normais e isoprenóides), aromáticos (benzeno alquilado Linear, *LAB*) e policíclicos aromáticos (*PAHs*), além dos elementos metálicos, como expõe os estudos de Bordon *et al.* (2011), Banci *et al.* (2017) e Kim *et al.* (2019).

Quanto aos morfotipos AN%, o presente estudo apontou para os camarões de *STS* a seguinte hierarquia – $VN > LB > BL > NN > NB > RN > FN > MN > BI$ –, muito similar à dos exemplares de *JUR*, onde ocorre apenas a inversão de três anormalidades nucleares (*MN*, *RN* e *FN*). Segundo Ejike *et al.*, (2019), ao realizar a exposição de duas espécies de peixes (*Oreochromis niloticus* e *Clarias gariepinus*) a quatro metais (*Hg*, *Ni*, *Pb* e *Zn*), a hierarquia entre as anomalias nucleares foi similar ($LB > BL > VN > NN > BI$ e $LB > VN > BL > NN > BI$, respectivamente), com uma maior frequência de *LB* e menor para *BI*, o mesmo registrado para o camarão *C. corruptus* no presente estudo.

Para crustáceos decápodos não existem estudos sobre anormalidades nucleares disponíveis para uma comparação mais aprofundada sobre o tema. Neste sentido, foi interessante o confronto dos resultados de um experimento laboratorial para um anfípodo (pulga-da-praia – Classe Malacostraca: Ordem Amphipoda), com aqueles obtidos em campo no presente estudo (camarão-fantasma – Classe Malacostraca: Ordem Decapoda). No estudo laboratorial utilizando *Parhyale hawaiiensis*, realizado por Botelho *et al.* (2022), as anormalidades nucleares *NB* e *MN* foram registradas após a exposição por 20 dias a nanopartículas e nitrato de prata (concentrações de 250 a 750 mg/kg), com a frequência total de AN% registrada variando entre 20 a 60 %, sendo 4 a 12 vezes superior à do grupo controle (5 a 8 %). A soma da frequência dessas duas anormalidades (*NB* + *MN*) foi de 41 % para *C. corruptus* na Praia de Santos, que contrastou à somatória para a Praia da Juréia (28 %), esta última 1,5 vezes menor do que no ambiente antropizado. Além disso, a média da frequência de *MN%* registrada em campo variou de 12 % (*STS*: praia antropizada) a 5 % (*JUR*: praia

preservada) para *C. corruptus* no presente estudo, correspondendo a cerca da metade do efeito verificado em experimentos laboratoriais por Botelho *et al.* (2022) para *P. hawaiiensis*, que foram de 16 ‰ (tratamento com contaminantes), em relação aos 3 ‰ do grupo controle (sem contaminantes).

A maior variação das frequências de algumas anormalidades nucleares é sempre mais bem documentada em estudos que utilizam espécies de peixes, como o de Arslan *et al.* (2015). Estes autores avaliaram o efeito ambiental (antropizado vs. preservado) utilizando exemplares de pandora (*Pagellus erythrinus*) e sargo-safia (*Diplodus vulgaris*), confirmando a diferença entre as frequências das anormalidades *MN* e *NB*, dependendo da espécie e da qualidade ambiental, a saber: em um ambiente preservado foi observado uma frequência média das *AN* para *P. erythrinus* (*MN*: 18 ‰; *NB*: 1 ‰) e *D. vulgaris* (11 ‰; 5 ‰, respectivamente), enquanto em um ambiente contaminado, foram registrados para mesmas espécies, consecutivamente, as médias para *MN* (53 ‰; 35 ‰) e *NB* (33 ‰; 35 ‰). Já para os dados de *C. corruptus*, os camarões de *JUR* apresentaram frequências para *MN* (5 ‰) e *NB* (23 ‰), correspondentes a metade daquela registrada em *STS* (12 ‰ e 29 ‰, respectivamente). Já Fernandez *et al.* (2011), no confronto de anormalidades nucleares para o peixe-rei (*Atherinella brasiliensis*) entre duas praias antropicamente distintas, verificaram diferenças significativas para as anomalias *NN* e *BL* ($p < 5,0 \cdot 10^{-3}$), o que também foi confirmado no presente estudo entre os indivíduos de *C. corruptus* para as praias de Santos e Juréia ($p < 0,01$).

As anormalidades nucleares são geradas pelo deslocamento dos cromossomos no núcleo, sendo causadas por estressores ambientais, como é o caso dos xenobióticos (Eije *et al.*, 2019; Fenech *et al.*, 2020). O estudo de Serov (2004), aponta que o posicionamento dos cromossomos no núcleo é mapeado, sendo a sua posição essencial para a correta expressão gênica. Os estudos de Fenech *et al.* (2020) e Canedo *et al.* (2021), confirmam que a presença de poluentes induz danos ao DNA e às proteínas envolvidas no processo de divisão celular, trazendo perda da integridade genômica dos animais e a formação de anormalidades nucleares. Estes autores afirmaram, ainda, que alguns poluentes possuem grupos eletrofílicos reativos, que podem interagir diretamente com a estrutura do DNA, causando várias anormalidades nucleares, como é o caso da anomalia *NB*, formada quando o DNA amplificado do núcleo é eliminado na fase de síntese, no momento da replicação gênica, enquanto a anomalia *BI* ocorre quando não há divisão citoplasmática durante a mitose.

Dessa forma, o estudo estabelece os níveis basais de oito anormalidades nucleares (*BI*, *BL*, *LB*, *NB*, *NN*, *MN*, *RN* e *VN*), para os camarões de *JUR*, enquanto confirma a **hipótese II**,

apontando uma elevada toxicidade para os exemplares de *STS*, um local com elevado grau de adensamento populacional humano, responsável por gerar uma variedade impressionante de poluentes.

6.3. Ensaio Micronúcleo (MN‰)

Os resultados para o ensaio de micronúcleo apontaram uma maior média e variação de genotoxicidade para os indivíduos de Santos (12 ± 4 ‰; CV = 33,3 %), correspondendo ao dobro da média desta anormalidade nos exemplares da Juréia (5 ± 1 ‰; CV = 20,0 %), além de menor variação destes dados. Estas médias de MN foram superiores às registradas para o caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*), no confronto entre áreas próximas à Juréia (~ 2 ‰) e no Sistema Estuarino Santos-São Vicente (~ 6 ‰), como demonstrado nos estudos de Pinheiro *et al.* (2013), Duarte *et al.* (2016), Souza *et al.* (2022) e Pinheiro *et al.* (2022). Desta forma, verifica-se um contraste expressivo entre locais com diferente histórico e nível antrópico (Juréia: preservado vs. *SESSV*, antropizado), com uma frequência 2 a 5 vezes superior para as áreas próximas ao *SESSV* em relação à Juréia, mostrando uma maior toxicidade nos indivíduos de áreas antropizadas. Anteriormente, em trabalho realizado por Pinheiro & Toledo (2010), foi quantificado a genotoxicidade por MN em um exemplar de *U. cordatus* na região estuarina interna de São Vicente (12 ‰), em área que recebe aporte de chorume (rico em metais) do Lixão do Sambaiaatuba, em média de frequência que se assemelha a encontrada para MN nos camarões *C. corruptus* de Santos (12 ± 4 ‰). Comparando estes dados com aqueles obtidos para o caranguejo-terrestre *Cardisoma guanhumi*, Falcão *et al.* (2020) encontraram em uma área preservada (Estuário do Rio Goiana, em Pernambuco), uma média de MN (4 ± 1 ‰), similar a obtida na Juréia (5 ± 1 ‰) (*vide* Tab. 2).

Importante destacar que a anomalia MN ocorre a partir de fragmentos de cromossomos (ou cromossomos inteiros), que não são incorporados ao núcleo das células-filhas, durante o processo de divisão celular, com posterior encapsulamento desses trechos de DNA (Countryman & Heddle, 1976; Adam *et al.*, 2023). Assim, sua alta frequência pode resultar no impulsionamento da depleção da expressão gênica, podendo ameaçar a produção de proteínas pelas células e gerar macrolesões ao DNA (Pinheiro *et al.*, 2017).

Segundo Pinheiro *et al.* (2021), em análise dos níveis basais da anomalia micronuclear (MN) em três espécies de caranguejos (caranguejo-arborícola, *Aratus pisonii*: herbívoro de

folhas verdes; caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*: herbívoro de folhas senescentes; e maria-mulata, *Goniopsis cruentata*: onívora) nos manguezais preservados da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JUR), verificou uma variação em sua frequência por 1.000, em dependência da alimentação e das matrizes ambientais que estas espécies apresentam contato, com médias de $0,9 \pm 1,1 \text{ ‰} \geq 1,3 \pm 0,9 \text{ ‰} \geq 1,7 \pm 1,2 \text{ ‰}$, respectivamente. Dessa forma, a maior frequência de MN‰ registrada no presente estudo, pode estar relacionada ao ambiente que *C. corruptus* ocupa, uma vez que esses camarões-fantasma são endêmicos de praias arenosas (Hernández *et al.* 2022), possuindo hábitos bioturbadores, vivendo em galerias de até 45 cm de profundidade (Rodrigues & Shimizu, 1997). Essa diferença ainda pode estar relacionada a posição trófica e hábito alimentar desta espécie, visto que é filtradora de matéria orgânica particulada em suspensão na água, como descreve Rosa *et al.* (2018) e Constantino *et al.* (2024).

Tabela 2. Comparação da frequência de Micronúcleos por 1.000 (MN‰) em diferentes espécies de crustáceos decápodos, em ambientes prístinos e antropizados.

Local	Estado de Conservação	Família	Espécie	MN ‰ (CV%)	Referências
Cubatão (SP)*	Antropizado	Ocypodidae	<i>Ucides cordatus</i>	12	Pinheiro & Toledo (2010)
Juréia (SP)	Preservado	Ocypodidae	<i>Ucides cordatus</i>	2 ± 1 (50)	Pinheiro <i>et al.</i> (2013)
Cubatão (SP)	Antropizado			5 ± 2 (40)	
Juréia (SP)	Preservado	Ocypodidae	<i>Ucides cordatus</i>	1 ± 1 (100)	Duarte <i>et al.</i> (2016)
Cubatão (SP)	Antropizado			5 ± 2 (40)	
Estuário Rio Goiana (PE)**	Preservado	Gecarcinidae	<i>Cardisoma guanhumi</i>	4 ± 1 (25)	Falcão <i>et al.</i> (2020)
Estuário Rio Jaguaribe (PE)	Preservado			2 ± 0 (0)	
Estuário Rio Capibaribe (PE)	Antropizado			4 ± 1 (25)	
Juréia (SP)	Preservado	Sesamidae	<i>Aratus pisonii</i>	1 ± 1 (100)	Pinheiro <i>et al.</i> (2021)
		Grapsidae	<i>Goniopsis cruentata</i>	2 ± 1 (50)	
		Ocypodidae	<i>Ucides cordatus</i>	2 ± 1 (50)	
Juréia (SP)	Preservado	Ocypodidae	<i>Ucides cordatus</i>	1 ± 1 (100)	Souza <i>et al.</i> (2022)
São Vicente (SP)	Antropizado			7 ± 1 (14,3)	
Cubatão (SP)	Antropizado	Ocypodidae	<i>Ucides cordatus</i>	6 ± 2 (33,3)	Pinheiro <i>et al.</i> (2022)
Juréia (SP)	Preservado	Callichiridae	<i>Callichirus corruptus</i>	5 ± 1 (20)	Presente Estudo
Santos (SP)	Antropizado		<i>Callichirus corruptus</i>	12 ± 4 (33,3)	Presente Estudo

* Estado de São Paulo; ** Estado de Pernambuco.

Dessa forma, o presente estudo nega em parte a **Hipótese III**, pois os camarões *C. corruptus* em ambiente preservado não apresentaram uma frequência de $MN \leq 2 \text{ ‰}$, como já relatado para outros crustáceos decápodos, como o caranguejo *Ucides cordatus* (Pinheiro *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2016; e Souza *et al.*, 2022), *Aratus pisonii* e *Goniopsis cruentata* (Pinheiro *et al.*, 2021). No entanto, o estudo apontou uma diferença significativa entre os exemplares de

praia preservada (Juréia) vs. praia antropizada (Santos). A maior frequência observada pode ser explicada por uma diferença entre estes ecossistemas quanto aos processos que ali ocorrem e decorrentes do hábito alimentar, estabelecendo o nível basal da anomalia micronucleada dessa espécie em $MN \leq 5 \%$.

6.3. PCA e Análise de Associação: Biomarcadores e Metais no Sedimento.

A correlação positiva confirmada entre as variáveis genotóxicas ($MN\%$ e $AN\%$) e a concentração dos oito elementos metálicos no sedimento (*As*, *Cr*, *Cu*, *Mn*, *Ni*, *Pb*, *V* e *Zn*) eram esperadas, sendo maiores na praia antropizada (*STS*), do que naquela preservada (*JUR*). Tais resultados também se coadunam em relação à outros estudos, como os desenvolvidos entre manguezais para *Ucides cordatus* (vide Pinheiro *et al.*, 2013 e Duarte *et al.*, 2017) e *Cardisoma guanhumi* (vide Falcão *et al.*, 2020). Segundo Pinheiro *et al.* (2017) e Adam *et al.* (2023), a maior frequência de $MN\%$ e $AN\%$ se encontra em animais de áreas de maior contaminação por poluentes, fato confirmado no presente estudo para *C. corruptus*, onde a maior concentração de metais ocorreu associada ao sedimento da Praia de Santos, refletindo numa maior frequência de danos genéticos nesses animais. O Sistema Estuarino de Santos-São Vicente é uma região com elevado grau de antropização, com presença do maior Porto da América do Sul (Angeli *et al.*, 2021), expressivo complexo industrial (Pinheiro *et al.*, 2013), resultando numa expressiva gama de contaminantes já registrados na região, como: **(1) metais** (Buruaem *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016, 2019; Angeli *et al.*, 2021); **(2) contaminantes emergentes** (Cortez *et al.*, 2019); **(3) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos** (Torres *et al.*, 2012); **(4) Microplásticos** (Ribeiro *et al.*, 2023); entre outros (vide relatório de Cetesb, 2023).

Quando o biomarcador *NRRT* foi correlacionado aos mesmos metais presentes nessa matriz abiótica, foi observado uma correlação negativa ($r \leq -0,67$; $p \leq 0,01$), com o maior tempo de funcionamento celular esteve relacionado ao ambiente preservado (*JUR*), com menores concentrações de metais no sedimento. Segundo Duarte *et al.* (2017), o maior tempo de estabilidade lisossômica está diretamente relacionado aos exemplares de um ambiente mais preservado, fato também apontado na atual pesquisa. A Praia da Juréia, por estar localizada na Estação Ecológica Juréia-Itatins (ESEC Juréia-Itatins), se mostra como um modelo de sucesso como área de preservação ambiental, pois ali ocorre um baixo adensamento populacional humano (162 habitantes, segundo Duarte *et al.*, 2016), inclusive gerando resultados de níveis

basais para espécies de peixes (Lima *et al.*, 2019) e crustáceos braquiúros (Falcão *et al.*, 2020; Pinheiro *et al.*, 2021).

Dessa forma, as correlações encontradas entre biomarcadores vs. contaminação ambiental revelam o potencial uso do camarão-fantasma (*C. corruptus*) como espécie sentinela de qualidade ambiental, expressando uma maior genotoxicidade no ambiente antropizado (*STS*), em contraste ao maior tempo de funcionamento celular em ambiente preservado (*JUR*).

6.4. PCA e Análise de Associação: Biomarcadores e Metais nos Tecidos do Camarão

Os resultados obtidos pela Análise de Componentes Principais (PCA), apresenta uma relação conjunta entre as variáveis *NRRT* e quatro dos elementos metálicos (*As*, *Cd*, *Cr* e *V*) direcionados às áreas da Juréia (ambiente preservado). Essa relação foi também confirmada pela significância da correlação positiva entre o biomarcador e estes metais ($r \geq 0,64$; $p \leq 0,01$), apesar do acúmulo desses metais nos tecidos dos camarões de *JUR*, é possível que essas concentrações não estejam interferindo na saúde global desses animais. Certamente esses metais presentes no camarão-fantasma estão sendo adequadamente depurados pela bioquímica e processos do hepatopâncreas, considerado o principal órgão detoxificador dos crustáceos (Zhu *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2022), o que ocorre por ação de seus lipídios (Wu *et al.*, 2008), metalotioneínas (Pourang *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2022) e da glutathione-S-transferase (Lobato *et al.*, 2023).

O presente estudo também verificou proximidade entre os biomarcadores genotóxicos (*MN%* e *AN%*) em Santos, apresentado uma correlação positiva e significativa ($r = 0,94$; $p \leq 0,01$). Essa relação é explicada por Adam *et al.* (2023), que consideram o teste de anormalidades nucleares como um complemento ao estudo genotóxico indicado por *MN%*. Sua ligação com os indivíduos de Santos, é apontada pela frequência das células micronucleadas serem comumente encontradas em animais de áreas mais antropizadas, na maioria dos casos em decorrência do maior adensamento populacional humano e da intensificação das atividades antrópicas, como aponta os estudos de Duarte *et al.* (2016) e Lima *et al.* (2019).

O estudo apontou uma correlação negativa entre a frequência da *MN%* e quatro elementos metálicos (*As*, *Cd*, *Cr* e *V*) ($r \leq -0,66$; $p \leq 0,01$), o mesmo ocorrendo para *AN%* em relação a tais contaminantes ($r \leq -0,60$; $p \leq 0,01$). Tais resultados sugerem que estes elementos metálicos acumulados nos tecidos dos indivíduos não apresentam relação com a genotoxicidade encontrada. Dessa forma, os danos genéticos podem estar associados a outro(s) contaminante(s), como alerta Cortez *et al.* (2018, 2019), sobre a presença de contaminantes

emergentes já detectados em elevadas concentrações no litoral da Baixada Santista, em especial na Baía de Santos, entre os quais figuram medicamentos como a Fluoxetina (anti-drepressivo) e Losartana (anti-hipertensivo), enquanto o estudo desenvolvido por Ribeiro *et al.* (2023), aponta uma expressiva contaminação por microplásticos e seus componentes tóxicos (*PMMA*, polimetilmetacrilato; *PA*, poliamida; *PP*, polipropileno e *PS*, poliestireno), assim como por outros elementos metálicos, conforme sugerido por Duarte *et al.* (2017).

Pelo exposto, os biomarcadores de efeito (*NRRT* e *MN%*) para *C. corruptus* evidenciaram contraste entre Santos e Juréia, esta última localidade com registro dos níveis basais esperados para uma Estação Ecológica (ambiente preservado). Neste sentido, apesar dos biomarcadores para *C. corruptus* não terem associação direta e significativa com alguns elementos metálicos identificados nos indivíduos de *C. corruptus*, o trabalho indica seu uso na categorização ambiental, permitindo identificar um ambiente poluído de outro prístino. Com isso, é possível estabelecer um protocolo de identificação do *status* de conservação de praias arenosas marinhas ao longo da costa brasileira, usando o *Callichirus corruptus* como espécie sentinela da qualidade ambiental.

6. Conclusões

O presente estudo abordou os efeitos da contaminação ambiental nos camarões *Callichirus corruptus*, em duas praias com diferentes níveis de antropização, Santos (praia antropizada) vs. Juréia (praia preservada), utilizando biomarcadores cito- e genotóxicos para avaliar o impacto da poluição nesses organismos. Os resultados revelaram diferenças significativas entre as duas praias, indicando uma maior deterioração da saúde dos camarões em Santos, devido à maior exposição à poluentes. O Ensaio *NRRT*, mostrou uma maior estabilidade das membranas celulares dos hemócitos na Juréia, apontando uma maior saúde global desses animais. Esta diferença sugere um menor tempo de funcionamento fisiológico dos hemócitos nos camarões de Santos, o que pode ser atribuído por instabilidade das membranas celulares nesse ambiente mais impactado por poluentes. O Ensaio Micronúcleo (*MN‰*), mostrou uma maior frequência significativa de hemócitos micronucleados nos camarões de Santos, sendo outro indicativo de danos genéticos. A menor frequência de micronúcleos nos camarões da Praia da Juréia confirma sua qualidade ambiental preservada, visto que ela fica dentro de uma estação ecológica, reforçando a importância das áreas de proteção ambiental para a preservação da integridade genética dos organismos. O estudo das Anormalidades Nucleares (*AN‰*) para *C. corruptus*, revelou uma frequência significativamente maior nos camarões da Praia de Santos, o que confirma danos genéticos desde os mais simples aos mais severos, causados pela contaminação ambiental. Tais dados foram consistentes aos estudos genotóxicos já realizados com outras espécies de invertebrados e vertebrados marinhos. A análise de PCA e correlação de *Pearson* entre biomarcadores, confirmou a relação inversa entre a estabilidade lisossomal (*NRRT*) e a presença de danos genéticos (*AN‰* e *MN‰*). Esses resultados são consistentes com estudos de outros crustáceos, que mostram um efeito negativo dos contaminantes na saúde celular e nos danos genéticos causados aos organismos aquáticos. A correlação entre o biomarcador *NRRT*, com os metais encontrados no sedimento das praias, exprime uma associação negativa, mostrando que camarões com maior tempo de funcionamento celular são oriundos de ambientes mais preservados, sendo o inverso verdadeiro para os parâmetros genotóxicos (*MN‰* e *AN‰*), que foram mais frequentes nos exemplares do ambiente mais antropizado (Praia de Santos). A associação positiva entre *NRRT* e o acúmulo de arsênio, cromo e cobre nos camarões *C. corruptus*, ressalta que a concentração de metais verificada nos indivíduos da Juréia, não interferiram na saúde global desses camarões, já que aponta uma relação negativa pelos parâmetros genotóxicos (*MN‰* e *AN‰*), podendo, portanto, estar associados a outros

contaminantes presentes no ambiente, como a presença de outros metais, contaminantes emergentes, microplásticos, hidrocarbonetos aromáticos, entre outros não avaliados no presente estudo. Portanto, os resultados deste estudo apresentam originalidade por estabelecer pela primeira vez os níveis basais da espécie em uma praia preservada (Juréia) para dois biomarcadores de efeito ($MN\%$ e $NRRT$), assim como avaliar possíveis contrastes segundo os morfotipos de anormalidades nucleares ($AN\%$), para o camarão-fantasma *Callichirus corruptus*, um crustáceo comum em praias arenosas ao longo de todo o litoral brasileiro. Tais informações inéditas exprimem o expressivo potencial desta espécie como sentinela ambiental de praias arenosas marinhas brasileiras, podendo qualificar as praias segundo a miríade de impactos sofridos por esse ecossistema costeiro, além de fornecer dados que possam subsidiar políticas públicas de monitoramento que assegurem a conservação desses ambientes.

7. Referências Bibliográficas

- Abessa, D.M.S.; Sousa, E.C.P.M.; Rachid, B.R.F. & Mastroi, R.R. 2001. Sediment Toxicity in Santos Estuary, SP–Brazil: Preliminary Results. *Ecotoxicology And Environmental Restoration*, 4(1): 6–9.
- Adam, M.L.; Torres, R.A.; Boos, H. & Pinheiro, M.A.A. 2023. Espécies sentinelas: Monitoramento Ambiental com base em biomarcadores de efeito cito–e genotóxico. *Revista CEPSUL–Biodiversidade e Conservação Marinha*, 12: e2023002.
- Adams, S.M. 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *American Fisheries Society Symposium*, 8: 1–8.
- Aguirre-Martínez, G.V.; Buratti, S.; Fabbri, E.; Del Valls, T.A. & Martín-Díaz, M.L. 2013. Stability of lysosomal membrane in *Carcinus maenas* acts as a biomarker of exposure to pharmaceuticals. *Environmental monitoring and assessment*, 185: 3783–3793.
- Ahearn, G.A.; Mandal, P.K. & Mandal, A. 2004. Mechanisms of heavy–metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 17: 439–452.
- Aliko, V.; Hajdaraj, G.; Caci, A. & Faggio, C. 2015. Copper induced lysosomal membrane destabilization in hemolymph cells of Mediterranean green crab (*Carcinus aestuarii*, Nardo, 1847) from the Narta Lagoon (Albania). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(5): 750–756.
- Angeli, J.L.F.; Sartoretto, J.R.; Kim, B.S.M.; Ferreira, P.A.; Mahiques, M.M. & Figueira, R.C.L. 2021. Trace element fluxes during the “Anthropocene” in a large South American industrial and port area (Santos and São Vicente estuarine system, SE, Brazil). *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(9): 594.
- Antó, M.; Arnau, S.; Buti, E.; Cortijo, V.; Gutiérrez, E. & Solé, M. 2009. Characterisation of integrated stress biomarkers in two deep–sea crustaceans, *Aristeus antennatus* and *Nephrops norvegicus*, from the NW fishing grounds of the Mediterranean Sea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5): 1455–1462.
- Arslan, Ö.Ç.; Boyacıoğlu, M.; Parlak, H.; Katalay, S. & Karaaslan, M.A. 2015. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliğa Bay Turkey. *Marine pollution bulletin*, 94(1–2): 48–54.
- Banci, K.R.; Mori, G.M.; Oliveira, M.A.; Paganelli, F.L.; Pereira, M.R. & Pinheiro, M.A.A. 2017. Can environmental pollution by metals change genetic diversity? *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) as a study case in Southeastern Brazilian mangroves. *Marine Pollution Bulletin*, 116(1–2): 440–447.
- Basu, N.; Scheuhammer, A.M.; Bursian, S.J.; Elliott, J.; Rouvinen–Watt, K. & Chan, H.M. 2007. Mink as a sentinel species in environmental health. *Environmental Research*, 103(1): 130–144.
- Berkenbusch, K. & Rowden, A.A. 2003. Ecosystem engineering—moving away from 'just-so' stories. *New Zealand Journal of Ecology*, 27(1): 67–73.

- Birkeland, C. 1989. The Faustian traits of the crown-of-thorns starfish. *American Scientist*, 77(2): 154–63.
- Bolognesi, C. & Hayashi, M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1): 205–213.
- Bordon, I.C.; Sarkis, J.E.; Gobbato, G.M.; Hortellani, M.A. & Peixoto, C.M. 2011. Metal concentration in sediments from the Santos estuarine system: a recent assessment. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22: 1858–1865.
- Botelho, M.T.; Campos, M.J.D.A.R.; Trevizani, T.H.; Figueira, R.C.L.; Umbuzeiro, G.A. & Gomes, V. 2022. Genotoxic effects of silver nanoparticles on a tropical marine amphipod via feeding exposure. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 881: 503527.
- Buratti, S.; Ramos-Gómez, J.; Fabbri, E. & Delvalls, T.A. 2012. Application of neutral red retention assay to caged clams (*Ruditapes decussatus*) and crabs (*Carcinus maenas*) in the assessment of dredged material. *Ecotoxicology*, 21: 75–86.
- Buruaem, L.M.; Castro, Í.B.; Hortellani, M.A.; Taniguchi, S.; Fillmann, G.; Sasaki, S.T. & Abessa, D.M.S. 2013. Integrated quality assessment of sediments from harbour areas in Santos-São Vicente Estuarine System, Southern Brazil. *Estuarine Coastal Shelf Science*, 130: 179–189.
- Canedo, A.; Jesus, L.W.O.; Bailão, E.F.L.C. & Rocha, T.L. 2021. Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. *Environmental Pollution*, 290: 118019.
- Carrasco, K.R.; Tilbury, K.L. & Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 47(11): 2123–2136.
- Cetesb – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2023. **Qualidade das águas costeiras do estado de São Paulo** – São Paulo: Relatório Anual de Águas Costeiras de 2022, 95p.
- Constantino, W.D.; Ferreira, K.A.; Zalmon, I.R. & Soares-Gomes, A. 2024. Short-term changes in the spatial distribution of the ghost shrimp *Callichirus corruptus* (Decapoda: Axiidea, Callichiridae) from southwestern Atlantic. *Marine Biology*, 171(1): 37.
- Cortez, F.S.; Souza, L.S.; Guimarães, L.L.; Almeida, J.E.; Pusceddu, F.H.; Maranhão, L.A. & Pereira, C.D.S. 2018. Ecotoxicological effects of losartan on the brown mussel *Perna perna* and its occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil). *Science of the Total Environment*, 637: 1363–1371.
- Cortez, F.S.; Souza, L.S.; Guimarães, L.L.; Pusceddu, F.H.; Maranhão, L.A.; Fontes, M.K. & Pereira, C.D.S. 2019. Marine contamination and cytogenotoxic effects of fluoxetine in the tropical brown mussel *Perna perna*. *Marine pollution bulletin*, 141: 366–372.
- Countryman, P.I. & Heddle, J.A. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 41(2–3): 321–331.
- Duarte, L.F.; 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, Ucidae) as

- indicators of conservation status in mangrove areas from the western Atlantic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133: 176–187.
- Duarte, L.F.; Souza, C.A.; Pereira, C.D.S. & Pinheiro, M.A.A. 2017. Metal toxicity assessment by sentinel species of mangroves: In situ case study integrating chemical and biomarkers analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 367–376.
- Duarte, L.F.A.; Moreno, J.B.; Catharino, M.G.M.; Moreira, E.G.; Trombini, C.; Nobre, C.R.; Moreno, B.B.; Abessa, D.M.S. & Pereira, C.D.S. 2020. Lead toxicity on a sentinel species subpopulation inhabiting mangroves with different status conservation. *Chemosphere*, 251: 126394.
- Durliat, M. & Vranckx, R. 1981. Action of various anticoagulants on hemolymphs of lobsters and spiny lobsters. *The Biological Bulletin*, 160: 55–68.
- Ejike, C.; Ayoola, S. & Akinola, M. 2019. Cytogenotoxicity Effects of Some Selected Heavy Metals on *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*. *African Journal of Fisheries and Aquatic Resources Management*, 4(1): 51–60.
- Falcão, C.B.R.; Pinheiro, M.A.A.; Torres, R.A. & Adam, M.L. 2020. Spatial-temporal genome damaging in the blue crab *Cardisoma guanhumi* as ecological indicators for monitoring tropical estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 156: 111232.
- Fenech, M.; Knasmueller, S.; Bolognesi, C.; Holland, N.; Bonassi, S. & Kirsch-Volders, M. 2020. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutation Research*, 786: 108342.
- Fernandez, W.S.; Dias, J.F.; Ribeiro, C.A. & Azevedo, J.D.S. 2011. Liver damages and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Atherinella brasiliensis* (Actynopterigii, Atherinopsidade) from two beaches in southeast of Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 59: 163–169.
- Fishelson, L.; Bresler, V.; Manelis, R.; Zuk–Rimon, Z.; Dotan, A.; Hornung, H. & Yawetz, A. 1999. Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment. *Science of the Total Environment*, 226(2–3): 121–131.
- Fossi, M.C.; Casini, S.; Savelli, C.; Corbelli, C.; Franchi, E.; Mattei, N. & Depledge, M.H. 2000. Biomarker responses at different levels of biological organisation in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to benzo (α) pyrene. *Chemosphere*, 40(8): 861–874.
- Goulart, M. & Callisto, M. 2003. Bioindicadores de Qualidade de Água como Ferramenta em Estudos de Impacto Ambiental. *Revista da FAPAM*, 2(1): 156–164.
- Guimarães, A.T.B.; Estrela, F.N.; Pereira, P.S.; Vieira, J.E.A.; Lima-Rodrigues, A.S.; Silva, F.G. & Malafaia, G. 2021. Toxicity of polystyrene nanoplastics in *Ctenopharyngodon idella* juveniles: a genotoxic, mutagenic and cytotoxic perspective. *Science of The Total Environment*, 752: 141937.
- Hernández, P.; Hereman, M.J.; Pimenta, C.E.; Rio, J.P.; João, M.C. & Pinheiro, M.A.A. 2019. La efectividad de una ley de protección al servicio de la conservación de un recurso marino: El ejemplo del camarón fantasma *Callichirus major* (Decapoda, Callianassidae) de la costa de Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*: 109: e2019001.
- Hernaéz, P.; Miranda, M.S.; Rio, J.P.P & Pinheiro, M.A.A. 2022. A new species of the ghost shrimp genus *Callichirus* Stimpson, 1866 (Decapoda: Axiidea: Callichiridae) from the

- southwestern Atlantic, long confounded with *C. major* (Say, 1818), with neotype designation and an illustrated key to the western Atlantic species. *Journal of Natural History*, 56(9–12): 533–563.
- 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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 656(1–2): 44–48.
- Ihaka, R. & Gentleman, R. 1996. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5(3): 299–314.
- Jones, C.G.; Lawton, J.H. & Shachak, M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Nordic Society Oikos*, 69(3): 130–147.
- Kim, B.S.M.; Angeli, J.L.F.; Ferreira, P.A.L.; Mahiques, M.M. & Figueira, R.C.L. 2019. A multivariate approach and sediment quality index evaluation applied to Baixada Santista, Southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 143: 72–80.
- Kim, B.S.M.; Salaroli, A.B.; Ferreira, P.A.L.; Sartoretto, J.R.; Mahiques, M.M. & Figueira, R.C.L. 2016. Spatial distribution and enrichment assessment of heavy metals in surface sediments from Baixada Santista, Southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 103(1–2): 333–338.
- Klerks, P.L.; Felder, D.L.; Strasser, K. & Swarzenski, P.W. 2007. Effects of ghost shrimp on zinc and cadmium in sediments from Tampa Bay, FL. *Marine chemistry*, 104(1–2): 17–26.
- Laitano, M.V. & Fernández-Giménez, A.V. 2016. Are mussels always the best bioindicators? Comparative study on biochemical responses of three marine invertebrate species to chronic port pollution. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97: 50–55.
- Lang, T.; Tam, N.F.Y.; Hussain, M.; Ke, X.; Wei, J.; Fu, Y. & Zhou, H. 2023. Dynamics of heavy metals during the development and decomposition of leaves of *Avicennia marina* and *Kandelia obovata* in a subtropical mangrove swamp. *Science of The Total Environment*, 855: 158700.
- Liao, Z.H.; Chuang, H.C.; Huang, H.T.; Wang, P.H.; Chen, B.Y.; Lee, P.T. & Nan, F.H. 2022. Bioaccumulation of arsenic and immunotoxic effect in white shrimp (*Penaeus vannamei*) exposed to trivalent arsenic. *Fish & Shellfish Immunology*, 122: 376–385.
- Lima, A.R.B.; Torres, R.A.; Jacobina, U.P.; Pinheiro, M.A.A. & Adam, M.L. 2019. Genomic damage in *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 138: 63–69.
- Livingstone, D.R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Jornal Chemical Technology and Biotechnology*, 57(3): 195–211.
- Lobato, R.O.; Nunes, S.M.; Wasielesky, W.; Fattorini, D.; Regoli, F.; Monserrat, J.M. & Ventura-Lima, J. 2013. The role of lipoic acid in the protection against of metallic pollutant effects in the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(4): 491–497.
- Lomartire, S.; Marques, J.C. & Gonçalves, A.M. 2021. Biomarkers based tools to assess environmental and chemical stressors in aquatic systems. *Ecological Indicators*, 122: 107207.

- 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.
- Luoma, S.N. & Rainbow, P.S. 2008. **Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Management**. New York: Cambridge University Press, Vol. 1: 98–99p.
- Medeiros, P.M. & Bicego, M.C. 2004. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP—Brazil. *Marine pollution bulletin*, 49 (9–10): 761–769.
- Nobre, C.R.; Moreno, B.B.; Alves, A.V.; Lima Rosa, J.; Fontes, M.K.; Campos, B.G. & Pereira, C.D.S. 2022. Combined effects of polyethylene spiked with the antimicrobial triclosan on the swamp ghost crab (*Ucides cordatus*; Linnaeus, 1763). *Chemosphere*, 304: 135169.
- Nobre, C.R.; Souza Paço, M.; Duarte, L.F.A.; Ortega, A.D.S.B.; Moreno, B.B.; Camargo, T.F.T. & Pereira, C.D.S. 2024. Systemic effects of settleable atmospheric particulate matter (SePM) on swamp ghost crab *Ucides cordatus*. *Science of The Total Environment*, 938: 173295.
- Nudi A.H.; Wagener L.R.A.; Francioni E.; Sette C.B.; Sartori A.V. & Scofield L.A. 2010. Biomarkers of PAHs exposure in crabs *Ucides cordatus*: Laboratory assay and field study. *Environmental Research*, 110(2): 137–145.
- Pereira, C.D.S.; Abessa, D.M.; Choueri, R.B.; Almagro-Pastor, V.; Cesar, A.; Maranhão, L.A. & Bainy, A.C. 2014. Ecological relevance of sentinels' biomarker responses: a multi-level approach. *Marine Environmental Research*, 96: 118–126.
- Pinheiro, M.A.A.; Duarte, L.F.A.; Toledo, T.R.; Adams, M.A. & Torres, R.A. 2013. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(10): 8273–8285.
- Pinheiro, M.A.A. & Toledo, T.R. 2010. Malformation in the crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Revista CEPSUL – Biodiversidade e Conservação Marinha*, 1(1): 1–5.
- Pinheiro, M.A.A.; Kriegler, N.; Souza, C.A. & Duarte, L.F.A. 2021. Feeding habit and lifestyle influence the baseline micronuclei frequency of crab species in pristine mangroves. *Wetlands*, 41: 30.
- Pinheiro, M.A.A.; Souza, C.A.; Zanotto, F.P.; Torres, R.A. & Pereira, C.D.S. 2017. The crab *Ucides cordatus* (Malacostraca, Decapoda, Brachyura) and other related taxa as environmental sentinels for assessment and monitoring of tropical mangroves from South America. In: Larramendi, M.L. (Ed.). **Ecotoxicology and Genotoxicology Non-traditional Aquatic Models**. London: Royal Society of Chemistry (RSC), Vol. 33: 538p.
- Pinheiro, M.A.A.; Souza, F.V.B.; Boos, H. & Duarte, L.F.A. 2022. Cytotoxicity, genotoxicity, and impact on populations of the mangrove sentinel species, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae) after an environmental disaster at Cubatão, São Paulo, Brazil. *Nauplius*, 30: e2022025.

- Pourang, N.; Dennis, J.H. & Ghourchian, H. 2004. Tissue distribution and redistribution of trace elements in shrimp species with the emphasis on the roles of metallothionein. *Ecotoxicology*, 13: 519–533.
- R Core Team. 2021. **R: A language and environment for statistical computing**. Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rainbow, P.S. 2007. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability, and toxicity. *Environment International*, 33(4): 576–582.
- Ribeiro, V.V.; Nobre, C.R.; Moreno, B.B.; Semensatto, D.; Sanz–Lazaro, C.; Moreira, L.B. & Castro, Í.B. 2023. Oysters and mussels as equivalent sentinels of microplastics and natural particles in coastal environments. *Science of The Total Environment*, 874: 162468.
- Ringwood, A.H.; Hoguet, J.; Keppler, C. & Gielazyn, M. 2004. Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters – *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, 58(2–5): 151–155.
- Rodrigues, P.A.; Ferrari, R.G.; Kato, L.S.; Hauser–Davis, R.A. & Conte–Junior, C.A. 2022. A systematic review on metal dynamics and marine toxicity risk assessment using crustaceans as bioindicators. *Biological Trace Element Research*, 1–23.
- Rodrigues S.A. & Shimizu R.M. 1997. Autoecologia de *Callichirus major* (Say, 1818). *Oecologia Australis*, 3(1): 155–170.
- Rohr, J.R.; Salice, C.J. & Nisbet, R.M. 2016. The pros and cons of ecological risk assessment based on data from different levels of biological organization. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(9): 756–784.
- Rosa, L.C.; Freire, K.M.; & Souza, M.J. 2018. Spatial distribution and population dynamics of *Callichirus major* (Crustacea, Callinassidae) in a tropical sandy beach, northeastern Brazil. *Invertebrate Biology*, 137(4): 308–318.
- 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.
- Schwacke, L.H.; Gulland, F.M. & White, S. 2013. Sentinel species in oceans and human health. Environmental toxicology: selected entries from the encyclopedia of sustainability. In: Laws, E.A. (Ed.). **Environmental Toxicology: Selected Entries form Encyclopedia of Sustainability Science and Technology**. New York: Spring, Vol. 1: 737p.
- Serov, O.L. Genetic and Chromosomal Control of Development. *Russian Journal of Developmental Biology*, 35: 193–200.
- Söderhäll, K. & Smith, V.J. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental & Comparative Immunology*, 7: 229–239.
- Souza, C.A.; Duarte, L.F.A.; Zanotto, F.P.; Ortega, P.; Moreira, R. G. & Pinheiro, M.A.A. 2022. Seasonal effect on biomarker responses in sentinel species: innovation in mangrove conservation status assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194: 425.
- Souza, J.R.B.; Machado, E.C.; Borzone, C.A. & Brandini, N. 1995. *Callichirus major* (Say, 1818) contribuisignificativamente para os fluxos bentônicos de praias arenosas? *Resumos do IV Congresso Latinoamericano de Ciencias del Mar*, 4: 190.

- Souza, T. & Fontanetti, C.S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 605(1–2): 87–93.
- Tavares, T.M. & Carvalho, F.M. 1992. Avaliação de Exposição Humana a Elementos metálicos Pesados no Ambiente: Exemplos do Recôncavo Baiano. *Química nova*, 15(2): 147–152.
- Torres, R.J.; Cesar, A.; Pereira, C.D.; Choueri, R.B.; Abessa, D.M.; Nascimento, M.R. & Mozeto, A.A. 2012. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and mercury in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from two Brazilian estuarine zones. *International Journal of Oceanography*, 2012(1): 838320.
- Truchet, D.M.; Negro, C.L.; Buzzi, N.S.; Mora, M.C. & Marcovecchio, J.E. 2023. Assessment of metal contamination in an urbanized estuary (Atlantic Ocean) using crabs as biomonitors: A multiple biomarker approach. *Chemosphere*, 312: 137–317.
- Valbonesi, P.; Sartor, G. & Fabbri, E. 2003. Characterization of cholinesterase activity in FCUP 14 Biomonitoring of coastal contamination using a biomarker approach: the use of *Pollicipes pollicipes* as a sentinel species three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Science Total Environment*, 312(1–3): 79–88.
- Van der Schalie, W.H.; Gardner, H.S.; Bantle, J.A.; De Rosa, C.T.; Finch, R.A.; Reif, J.S. & Stokes, W.S. 1999. Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107(4): 309–315.
- Wu, J.P.; Chen, H.C. & Huang, D.J. 2008. Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 73(7): 1019–1026.
- Wu, M.; Lin, Y.P.; Ruiz-Fernandez, A.C. & Sahu, B.K. 2023. Coastal environmental and ecological data analysis. *Frontier of Marine Science*, 9: e1126086.
- Xuereb, B.; Noury, P.; Felten, V.; Garric, J. & Geffard, O. 2007. Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology*, 236(3): 178–189.
- Zhong, W.; Zhang, J.; Wang, Z.; Lin, J.; Huang, X.; Liu, W. & Zhang, X. 2022. Holistic impact evaluation of human activities on the coastal fish biodiversity in the Chinese coastal environment. *Environmental Science & Technology*, 56(10): 6574–6583.
- Zhu, Q.H.; Zhou, Z.K.; Tu, D.D.; Zhou, Y.L.; Wang, C.; Liu, Z.P. & Shu, M.A. 2018. Effect of cadmium exposure on hepatopancreas and gills of the estuary mud crab (*Scylla paramamosain*): Histopathological changes and expression characterization of stress response genes. *Aquatic Toxicology*, 195: 1–7.

Considerações Finais

No **Capítulo I** o estudo apontou uma maior concentração metálica no sedimento da Praia de Santos (*STS*: ambiente antropizado), decorrente de um maior teor de *MO%* e menor *TMG*, com o inverso ocorrendo na Praia da Juréia (*JUR*: ambiente preservado). A Praia de Santos está ao fundo de uma baía, onde a matéria orgânica se deposita com maior facilidade, oferecendo mais alimento aos camarões-fantasma, porém existe grande possibilidade deste alimento apresentar contaminação pelas diversas fontes poluentes no local, como resíduos portuários e industriais, descarte de efluentes não tratados e resíduo sólido. Uma elevada concentração desses metais também foi registrada nos tecidos (hepatopâncreas, musculatura e gônadas) dos camarões-fantasma, independente da praia considerada, quanto a três elementos metálicos (*As*, *Cd* e *Cu*) acima dos limites estabelecidos pela Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA). Porém, os camarões *C. corruptus* de *JUR* apresentaram uma maior bioacumulação de três elementos metálicos (*As*, *Cu* e *Zn*), enquanto em *STS* a espécie bioacumulou apenas dois (*Cu* e *Zn*), seguindo uma hierarquia de acumulação metálica nos tecidos representada por: $H > M > G$. O hepatopâncreas foi o órgão com maior concentração de metais, confirmando-se como o principal responsável pela detoxificação e regulação dos elementos metálicos em crustáceos decápodos. Esse capítulo fornece informações inéditas a respeito da concentração metálica de *Callichirus corruptus*, assim como do estado de conservação de duas praias arenosas com diferentes níveis de antropização, confirmando a Juréia como ambiente preservado, enquanto Santos foi categorizado como com contaminação por alguns metais.

O **Capítulo II** apresentou valores de dois biomarcadores (*MN%* e *NRRT*), assim como um teste genotóxico complementar sobre as anormalidades nucleares (*AN%*) para *C. corruptus*, contrastando os resultados de uma praia preservada (*JUR*) aos de uma praia antropizada (*STS*), conforme confirmado nos resultados do capítulo anterior. Os exemplares de Santos, apresentaram reduzidos valores de *NRRT* (≤ 60 min), em comparação aos resultados dos exemplares da Juréia (≥ 100 min), apontando uma maior instabilidade do funcionamento celular para a praia mais impactada e maior saúde global para a praia preservada. Como esperado, este parâmetro de citotoxicidade (*NRRT*) apresentou valores antagônicos aos de genotoxicidade (*MN* e *AN%*), com as respectivas relações apresentando correlação negativa entre as variáveis. Assim, os indivíduos de *JUR* exibiram uma menor genotoxicidade (*AN%* e *MN%*), correspondendo a metade da frequência observada nos exemplares de *STS*. O biomarcador

NRRT, teve correlação negativa com os metais do sedimento nas praias, gerando menores tempo de funcionalidade celular em um ambiente com maiores concentrações desses elementos metálicos (Praia de Santos). Já os parâmetros genotóxicos *MN%* e *AN%* estiveram correlacionados positivamente às concentrações de metais nessa matriz abiótica, promovendo mais danos genéticos no ambiente com maior contaminação metálica (*STS*). Dessa forma, o capítulo II estabelece os níveis basais dos ensaios (*MN%* e *NRRT*), assim como relações entre os morfotipos de *AN%*, que são informações igualmente inéditas para *C. corruptus* para uma praia preservada (*JUR*) em relação àquela antropizada (*STS*). O estudo estabeleceu a correlação entre os biomarcadores de efeito e alguns dos elementos metálicos em estudo, assim como sua significância, estabelecendo uma evidente relação causa-efeito. Portanto, os camarões-fantasma da espécie *Callichirus corruptus*, possuem um elevado potencial para uso como espécie sentinela da qualidade ambiental de praias arenosas marinhas ao longo da costa brasileira, onde ela se distribui, podendo gerar políticas públicas destinadas à melhor conservação desses ecossistemas brasileiros.