



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**IONE MARLY AROUCHE LIMA**

**BIOMARCADORES EM *Callinectes danae* (CRUSTACEA, DECAPODA,  
PORTUNOIDEA) PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL EM ÁREAS  
PORTUÁRIAS NA ILHA DO MARANHÃO, BRASIL**

**São Luís  
2018**



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO

**BIOMARCADORES EM *Callinectes danae* (CRUSTACEA, DECAPODA, PORTUNOIDEA) PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL EM ÁREAS PORTUÁRIAS NA ILHA DO MARANHÃO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Orientador:** Ricardo de Macêdo Chaves

**Co-orientadora:** Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta

São Luís

2018

A Edilson, meu pai, enviado  
por Jesus Cristo por um breve  
tempo para me ensinar sua  
bondade.

*In memoriam*

## AGRADECIMENTOS

Deus enviou seu filho um dia para que pudesse ser visto pelos homens, pois é impossível uma mente finita, compreender o infinito. Esse Deus, que criou o universo e tudo que há, teve que se esvaziar, a ponto de assumir uma forma humana, Jesus Cristo.

Até que o “novo dia” comece, pra nunca mais ter fim, O Criador continua se manifestando através do Seu Filho em Espírito, que agora age por meio dos homens quando O permitem.

Por meio da graça de Deus, muitas pessoas foram dirigidas para que esse trabalho chegasse à reta final, por isso louvo e agradeço ao meu Senhor Jesus Cristo:

Pela pessoa que está mais próxima de mim, meu esposo Lacídio, em quem eu tenho visto uma face do Cristo; a da abnegação, que abriu mão de sua vida pelos outros. Tenho sido constrangida pela capacidade de Lacídio abrir mão de seus projetos, de se preocupar em suprir todas as necessidades dos nossos filhos e do que fosse necessário para que meus projetos se realizassem.

Pelo meu orientador Ricardo de Macêdo Chaves, em quem o Senhor me deu um voto de confiança, como ele mesmo disse no início do mestrado, foi meu resgatador (na ocasião de seleção quando me tirou do grupo dos alunos que ficaram sem orientador) e que durante minha trajetória fez o necessário para remover todos os obstáculos que apareceram. Foi muito bom encontra-lo sempre com um sorriso que nos contagia.

Pela minha orientadora Raimunda Fortes, em quem o Senhor me mostrou sua face gentil, que me acolheu e me trouxe paz e segurança. Que conseguiu me fazer lembrar o que é ser doutora, alguém que tem prazer de tornar o incompreensível, em algo que exprimimos em uma frase: *então é só isso?* Que também sabe quem realmente é, portanto não precisa se impor, dá sempre lições sem palavra alguma do que é ser humilde.

Pela professora Ana Clara Gomes, em quem o Senhor me ensinou a tê-la como referencial para buscar compromisso como professora, ética na pesquisa e disciplina e ao mesmo tempo cuidar dos meus como ela cuida da sua família.

Pela professora Mariana Basso Jorge, do Curso de Graduação e Pós- Graduação em oceanografia da Universidade Federal do Maranhão –UFMA. Que se dispôs a me ajudar com

toda simplicidade, demonstrando prazer em ensinar, sou grata pelas dúvidas eliminadas e pelas sugestões que muito enriqueceram este trabalho. Também agradeço por ter me concedido a utilização do Laboratório Central Analítica para as análises de metalotioneínas.

Por ter proporcionado a oportunidade de encontrar a bióloga Jucymary Sousa, quem me deu uma lição em serviço ao próximo, sem ela não teria conseguido aprender o processo de análise enzimática e histologia deste trabalho.

Pela vida da bióloga Carmem Hellen, quem doou seu tempo e disposição para me ensinar as análises de metalotioneínas.

Pela vida de Katherine, minha companheira de coletas durante todo o ano, com quem vivi momentos muito prazerosos à bordo do barco de coleta.

Pelo socorro da bióloga Wanda e toda equipe do Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos – LABOAQ e do Grupo pesquisa em Ecotoxicologia e Monitoramento de Ambientes Aquáticos – GPEMAAQ, sou grata pelo apoio de todos vocês.

Pelo socorro enviado para que as coletas fossem possíveis; o motorista Nilson que muitas vezes me animou quando presenciou as coisas dando errado, aos pescadores seu Ribamar, seu “Quatro horas” e Francinaldo, pelas histórias e pelos fritos. Ao seu Zequinha e seu João do Coqueiro, que diante da dificuldade de encontrar os siris nunca desanimaram, sempre demonstraram alegria no trabalho que realizavam.

Pelos momentos vividos em sala de aula com meus colegas (Turma 2016) do mestrado em Ciência Animal e a todos os professores pelo incentivo e pelas preciosas aulas ministradas.

Pela professora Ana Lúcia, que me concedeu gentilmente o acesso ao laboratório de Anatomopatologia da UEMA, pela técnica Renata do Laboratório de Bioquímica da UFMA, pela amiga Santana e Jenilson do Laboratório de Genética da UFMA, por Bruno Chung e toda equipe do Laboratório de Reprodução Animal (LABRA–UEMA).

Pela Fran, da secretaria do mestrado, quem foi sempre o socorro nos dias de tribulação, que sempre teve nos lábios uma palavra do céu pra mim.

Pela professora Alana que me deu carta de aceite para concorrer ao processo de seleção e que sempre demonstrou preocupação com o bom andamento deste trabalho; por meio dela e a equipe da coordenação e dos professores deste mestrado, o Senhor concedeu a graça de lutar e vencer muitas batalhas para o sucesso do PPG - Ciência Animal.

Pelo alento que tenho por meio da minha mãe Marlene, minha vó Neuza e tia Helena em todas os meus projetos de vida.

Por ter Livia como irmã, minha amiga, sempre vibrou com minhas vitórias como se fossem dela.

Ao meu irmão Léo, que em nossas conversas e orações, me proporcionou momentos de oásis em dias de deserto.

Pela alegria de viver que sinto em ter Milca e Aristarco como filhos.

Pelos diretores Edalton Reis, Jorge Renato e Márcia Santos do IFMA - câmpus Alcântara, que tiveram muita compreensão me dando o apoio que precisei para concluir este trabalho.

Pelas amigas leais Antônia Andrade e Daisy, que vivenciaram essa experiência comigo desde o processo seletivo até a leitura crítica dos textos.

Pelos amigos e amigas que me suportaram nos dias de desalento, em especial minha amiga e irmã do coração Gabrielle Carvalho.

Pelos irmãos que me sustentaram em oração, em especial minha mãe na fé, a irmã Faraíldes.

*Pois dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre!  
Amém (Romanos 11:36).*

**IONE MARLY AROUCHE LIMA**

Biomarcadores em *Callinectes danae* (Crustacea, Decapoda, Portunoidea) para Monitoramento Ambiental em Áreas Portuárias na Ilha do Maranhão, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves (Orientador)**

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

---

**Profa. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta (Coorientadora)**

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

1º membro

---

**Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa**

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

2º membro

## RESUMO

No presente estudo, objetivou-se comparar biomarcadores bioquímicos e histológicos em espécimes de *Callinectes danae* coletados em uma área próximos ao complexo portuário de São Luís – MA, e uma área de referência localizada no município da Raposa (MA). Os exemplares foram coletados trimestralmente durante o ano de 2017. Os dados de biometria utilizados na análise estatística foram: Largura da Carapaça – LC; – Largura da Carapaça com espinho – LCe; Comprimento da Carapaça- CC; Comprimento do Quelípode Direito – CQD; e Peso - P. As amostras de hepatopâncreas foram homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas, sendo o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática da glutathione-S-transferase (GST) e da catalase (CAT). As brânquias foram desidratadas em uma série crescente de álcoois e incluídas em parafina. Em microscopia de luz, as alterações foram identificadas e quantificadas. Os resultados das análises biométricas indicaram que os siris da área de referência são maiores que os siris da área portuária. Quanto às alterações histológicas observadas, quantificou-se um maior número de lesões branquiais nos espécimes da área portuária. A atividade enzimática da GST nos siris oriundos da área de referência apresentou valores altos na maioria dos períodos de coleta; já na área portuária a atividade da GST nos siris foi nula em todas as coletas, indicando um sistema enzimático exaurido. A atividade da CAT mostrou-se nula na segunda e última coleta da área portuária, enquanto na área de referência a maior atividade foi na segunda coleta do período chuvoso. Os dados biométricos e os resultados dos biomarcadores (bioquímicos e histológicos) indicam que os siris da área portuária estão sofrendo estresse oriundo de impactos provocados por substâncias xenobióticas.

**Palavras-chave:** Siris; alterações histológicas; Glutathione-S-Transferase; Catalase; Modelo preditivo.

## ABSTRACT

In the present study, the objective was to compare biochemical and histological biomarkers in *Callinectes danae* specimens collected in an area near the port facilities of São Luís-MA, and a reference area located in the municipality of Raposa (MA). The specimens were collected quarterly during the year 2017. The biometrics data used in the statistical analysis were: Width of Carapace - LC; Carapace Width with Thorn - LCe; Carapace Length – CC; Length of Right Quelipod – CQD; and Weight - P. The hepatopancreas were homogenized in phosphate buffer and centrifuged, and the supernatant was used to determine the enzymatic activity of glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT). The gills were dehydrated in a growing series of alcohols and embedded in paraffin. In light microscopy, the alterations were identified and quantified. The results of the biometric analyzes indicated that the siris of the reference area are larger than the siris of the port area. Regarding the gill injury, a greater amount of alterations were found in the specimens of the port area. The GST activity in the crabs from the reference area presented high values in most of the collection periods; already in the port area the activity of the GST in the crabs was null in all the collections, indicating an exhausted enzymatic system. The CAT activity was null in the second and final collection of the port area, while in the reference area the greatest activity was in the second collection of the rainy season. Biometric data and biomarkers results (biochemical and histological) indicate that the crabs of the port area are suffering stress from impacts caused by xenobiotic substances.

Keywords: Crabs; histological changes; Glutathione-S-Transferase; Catalase; Predictive model.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Equação geral da reação catalisada pelas GSTs .....   | 34 |
| <b>Figura 2</b> – Mapa do Golfão Maranhense .....   | 39 |
| <b>Figura 3</b> - Localização da área de referência (A1) e potencialmente contaminada (A2).....   | 40 |
| <b>Figura 4</b> - Pesca do siri com rede arrasto.....   | 41 |
| <b>Figura 5</b> - Dissecção do organismo: retirada das gônadas e brânquias e hepatopâncreas.....  | 41 |
| <b>Figura 6</b> - Biometria, macho; Medida - CC- B; Medida LCe- C Medida CQD- D.....  | 43 |
| <b>Figura 7</b> - Atividade da GST nas áreas portuárias e de referência.....  | 47 |
| <b>Figura 8</b> - Atividade da Catalase nas áreas portuárias e de referência.....   | 48 |
| <b>Figura 9</b> - Fotomicrografia das lamelas secundárias em <i>C.danae</i> coletados na área de referência. Setas = inchaço na extremidade próximo ao canal marginal. Barra = 50 µm.....   | 50 |
| <b>Figura 10</b> - Fotomicrografia das lamelas secundárias das brânquiais de exemplares de <i>C. danae</i> coletados na área de referência. Seta amarela = deformação do canal marginal. Seta preta = rompimento do canal marginal..... | 50 |
| <b>Figura 11</b> - Fotomicrografia das lamelas secundárias das brânquias de exemplares de <i>C.danae</i> coletados na área portuária. Setas = indicam colapso lamelar. Barra = 50 µm.....   | 51 |
| <b>Figura 12</b> - Fotomicrografia das lamelas branquiais de exemplares de <i>C. danae</i> coletados na área portuária. Seta preta= Detalhe de filamentos branquiais mostrando aneurisma em lamelas secundárias. Barra = 20 µm.....     | 51 |
| <b>Figura 13</b> - Fotomicrografia da lamela primária das brânquiais de exemplares de <i>C. danae</i> coletados na área portuária. Seta preta = inchaço da lamela primária.....   | 52 |
| <b>Figura 14</b> - Fotomicrografia das lamelas secundárias de <i>C.danae</i> coletados na área portuária. Seta preta = detalhe de filamentos branquiais mostrando deslocamento da cutícula. Barra = 50 µm .....                         | 53 |
| <b>Figura 15</b> - Fotomicrografia das lamelas secundárias de <i>C.danae</i> coletados na área portuária. Seta preta = parasito em corte longitudinal. Barra = 50 µm.....   | 53 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> -Média e Desvio padrão das medidas dos espécimes coletados no período chuvoso.....      | 45 |
| <b>Tabela 2</b> - Média e Desvio padrão das medidas dos espécimes coletados no período de estiagem..... | 46 |
| <b>Tabela 3</b> - Patologias observadas, fator de importância (w) e percentual de lesões (%).....       | 52 |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 13 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 14 |
| <b>2.1 Geral</b> .....  | 14 |
| <b>2.2 Específicos</b> .....  | 15 |
| <b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 15 |
| <b>3.1 Um breve histórico do desenvolvimento da atividade portuária no Maranhão</b> ..... | 15 |
| <b>3.2 O Monitoramento Ambiental de regiões portuárias</b> .....                          | 18 |
| <b>3.3 Bioindicadores para avaliação no monitoramento ambiental</b> .....                 | 23 |
| 3.3.1 Siris como modelo animal para bioindicadores.....                                   | 26 |
| <b>3.4 Biomarcadores no monitoramento ambiental</b> .....                                 | 29 |
| 3.4.1 Alterações enzimáticas como biomarcadores bioquímicos.....                          | 30 |
| 3.4.1.1 <i>Reações de fase I</i> .....  | 31 |
| 3.4.1.2 <i>Reações de fase II</i> .....   | 31 |
| 3.4.1.3 <i>Glutathiona-S-Transferase</i> .....  | 33 |
| 3.4.1.4 <i>Catalase</i> .....   | 35 |
| 3.4.2 Lesões branquiais como biomarcador histológico.....                                 | 36 |
| <b>3.5 Modelos preditivos de impacto</b> .....  | 38 |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 39 |
| <b>4.1 Área de estudo</b> .....   | 39 |
| 4.1.2 Raposa - área de Referência (A1).....   | 39 |
| 4.1.2 Região de influência do complexo portuário - Coqueiro (A2).....                     | 40 |
| <b>4.2 Amostragem</b> .....   | 41 |
| <b>4.3 Biometria</b> .....  | 42 |
| <b>4.4 Análises bioquímicas</b> .....   | 43 |
| <b>4.5 Análises histológicas</b> .....  | 44 |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 44 |
| <b>5.1 Biometria dos siris das duas áreas analisadas</b> .....                            | 44 |
| <b>5.2 Atividade enzimática dos siris</b> .....   | 46 |
| <b>5.3 Histopatologias identificadas nos siris</b> .....                                  | 48 |
| <b>6 CONCLUSÃO</b> .....  | 52 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>  |    |

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a relação entre a economia e a indústria no Maranhão reproduzem para a região o quadro de poluição gerada por atividades ligadas ao setor portuário. Entende-se que seria necessário um resgate histórico para a compreensão do processo de ocupação do território maranhense em estudo, bem como os fatores que propiciaram a transição de um modelo econômico exclusivamente agroexportador para inclusão de um setor industrial siderúrgico e todos seus desdobramentos.

Com o intuito de ampliar a compreensão sobre a relação causal do crescimento econômico por meio de empreendimento industriais e atuação no ecossistema marinho, discute-se a presença de contaminantes e o estudo de espécies bioindicadoras para esclarecimento dos efeitos de xenobióticos. Neste caso, a espécie analisada é *Callinectes danae*, um siri da família Portunidae, que apresenta grande tolerância à salinidade e pode ocupar áreas estuarinas, principalmente áreas com sedimento lodoso, até regiões costeiras e de mar aberto (MELO, 1996). Possui importância socioeconômica como recurso alimentar de muitos brasileiros que moram no litoral e são considerados indicadores biológicos de massas de água (TAISSOUN, 1973).

As áreas de estudo localizam-se no município da Raposa (área utilizada como controle) e em São Luís, próximo ao complexo portuário de São Luís. Diversos trabalhos de monitoramento nesta área portuária tem indicado que os organismos aquáticos estão constantemente expostos a um grande número de substâncias que podem ser tóxicas no ambiente (ANDRADE, 2016; PINHEIRO-SOUSA, 2015). De um modo geral, nos ambientes marinhos, as atividades antrópicas tem acarretado grande degradação ambiental; a fonte de contaminação é muito diversa, indo desde efluentes industriais, processos de drenagem agrícola (fertilizantes, agrotóxicos), derrames acidentais e não acidentais de resíduos químicos (metais pesados, compostos orgânicos e inorgânicos) e até mesmo resíduos domiciliares comprometendo a manutenção da biodiversidade aquática bem como do próprio ser humano (RASHED, 2001; VELEZ, 2015).

Estudos de monitoramento ambiental em ambientes aquáticos tem utilizado biomarcadores; definidos como as medições de fluidos corporais, células, ou tecidos que indicam em termos bioquímicos ou celulares a presença de contaminantes, permitindo

identificação precoce de mudança, antes dos efeitos deletérios chegarem aos mais alto níveis de organização biológica (MONSERRAT et al., 2003).

Os biomarcadores utilizados no presente trabalho são do tipo histológico e bioquímico (enzimático). O primeiro tem sido considerado como uma metodologia sensível para se diagnosticar efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetem tecidos animais, reconhecido como um excelente método de avaliação de biomarcadores de impacto ambiental causado por agentes tóxicos sobre os animais constituintes de uma determinada fauna (JIMENEZ; STEGEMAN, 1990).

Isoladamente, a histopatologia gera dados sobre lesões em níveis teciduais não especificando a causa pontual da lesão, ou seja, não diagnostica contaminação, mas apresenta resposta biológica à agressão, ao estresse, mas quando associados a outros métodos de análises podem auxiliar na compreensão profunda de determinadas situações (LINS et al., 2010). Para isso, a escolha dos órgãos que serão alvos de estudo é crucial para a relevância dos dados obtidos. Segundo Jimenez e Stegeman (1990), órgãos de contato direto com o agente toxicante, como as brânquias, o fígado que é o principal órgão de biotransformação de xenobióticos, e outros órgãos detoxificantes como os rins, podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos animais.

As análises enzimáticas (incluindo enzimas de estresse oxidativo e de biotransformação), por sua vez, constituem-se em metodologia capaz de indicar sinais muito iniciais de danos causados aos organismos pelos diferentes xenobióticos (VAN DER OOST, 2003). Estas respostas biológicas somadas a outros biomarcadores, como os histológicos, podem tornar os estudos (que analisam contaminação aquática em regiões portuárias) mais completos. Nesse sentido, o presente trabalho pretende acrescentar conhecimentos que possibilitem ações de monitoramento aos ecossistemas costeiros e estuarinos do litoral maranhense frente às mudanças que vem ocorrendo em toda região da costa brasileira.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Obter um modelo preditivo dos efeitos dos impactos ambientais em siris *Callinectes danae* da região portuária de São Luís-MA a partir da comparação de biomarcadores histológicos e bioquímicos.

### **2.2 Específicos**

- Quantificar atividade da Glutathione-S-Transferase (GST) e da Catalase (CAT) em *C.danae* como biomarcadores bioquímicos.
- Identificar tipos de lesões branquiais em *C. danae* como biomarcadores histológicos;
- Comparar dados biométricos com os resultados dos biomarcadores bioquímicos e histológicos identificados nos siris.
- Obter um modelo metodológico com a combinação de análises de biomarcadores bioquímicos e histológicos para siris.

## **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Um breve histórico do desenvolvimento da atividade portuária no Maranhão**

A existência de sambaquis na costa brasileira, em especial no Maranhão e Pará, corrobora a presença humana nestas terras muito antes da chegada do colonizador europeu (DIEGUES, 1983). O litoral amazônico, por possuir a maior área contínua de mangue do planeta, e uma rica diversidade de alimentos, há pelo menos 6000 anos atraiu para seu território um número significativo de povos que lá se fixaram (SILVEIRA; SCHAAN, 2005). Com a implantação do sistema colonial, estabeleceu-se uma nova comunidade litorânea no Brasil, formada por índios e negros fugidos, que buscavam ali espaços de liberdade (MADRUGA, 1992).

Nesse contexto surgem as primeiras comunidades de pescadores do litoral brasileiro, que passaram a representar uma ameaça a estrutura de poder formada pela chegada dos primeiros colonos, pois dificultavam a livre utilização da força de trabalho pelo capitalismo emergente (DIEGUES, 1983).

O território do Maranhão surgiu em 1534, quando o governo português dividiu o Brasil em 15 lotes que receberam a denominação de capitânicas hereditárias (FERREIRA, 2008). Em 1621, a coroa portuguesa criou o Estado do Maranhão (47% do território do Brasil) que durou até 1652. Em seguida ocorreram mais seis divisões. Somente em 1920 o Maranhão alcançou a atual configuração territorial (FERREIRA, 2008).

Os franceses de La Ravardière, ao se estabelecerem em São Luís em 1612, construíram a Praça do Forte (Pedro II) e o caminho que interligava o Forte ao Convento (atual rua dos Afogados) e o porto Santa Maria (Praia Grande) que serviu a cidade praticamente até o início das operações do Porto do Itaqui em 1974 (LABTRANS, 2015). Da área do antigo Porto da Praia Grande, hoje restou apenas o Cais da Sagração, que inclui a Rampa Campos Melo, então parte importante do conjunto construído em 1860. A região da Baía de São Marcos, próxima ao antigo porto, está bastante assoreada, mas ainda tem um terminal hidroviário no Cais da Praia Grande, que transporta passageiros para a cidade histórica de Alcântara. Desde sua fundação, o desenvolvimento da cidade dependeu do porto que, de fato, condicionou a evolução do centro comercial antigo e as atividades do porto relacionadas com a exploração econômica referente à produção de cana-de-açúcar, do algodão e do babaçu, desde o período colonial até os primeiros anos da República” (FERREIRA, 2008).

De acordo com o histórico relatado no plano mestre do porto em 2015, o porto, que antes recebia um ou dois navios, chegou a receber 150 navios num mesmo ano (LABTRANS,2015). Um novo ciclo comercial local ocorreu no início do século XX com a industrialização maranhense, via o setor têxtil, acompanhando um fenômeno similar em vários estados brasileiros, aumentando a movimentação de carga geral. Houve depois um longo período de baixo crescimento econômico do Estado, com a perda de competitividade da indústria têxtil.

No Maranhão, a partir da década de 1940, foram implantados projetos com o intuito de preencher vazios demográficos. Com o Programa de Desenvolvimento Integrado da Amazônia Oriental, com a implantação do projeto Ferro Carajás e o Consórcio de alumínio do Maranhão pelos idos de 1980, esse esforço empreendedor chega ao litoral. No Estado não havia/há nenhuma mina expressiva de minério de ferro, a importância de tal empreendimento em terras golcalvinas estava na formação de um corredor de exportação através do projeto Ferro Carajás, abrigando assim, uma parte significativa da força de trabalho empregada pela Companhia Vale do Rio Doce (MORAES, 2007).

O modelo econômico agroexportador, que há séculos caracterizava a economia maranhense, mudou para o industrial baseado em empreendimentos siderúrgicos. Em 1996 a exportação residia em ferro-gusa e ligas de alumínio, o que por sua vez elevou o PIB maranhense. Há uma substituição das importações para a massiva entrada do capital transnacional. Vários dos ramos industriais importantes em instalação, vão sofrer uma grande dependência do abastecimento de insumos externos, o que condiciona sua localização à proximidade dos sítios portuários. (MORAES, 2007). Esse “progresso” que chegou ao Maranhão também traz consigo novos problemas ambientais, a entrada de novos resíduos e mudanças nos habitats marinhos.

A decisão nacional de exportar minérios, principalmente da província ferrífera de Carajás e de alumínio do Pará, por um porto do Maranhão, motivou o término das obras do Porto do Itaqui e depois o da Alumar, que, por sua vez, iniciou suas operações nove anos mais tarde. Isso integrou a economia da região ao atual superciclo internacional de *commodities*, motivado pela demanda dos países asiáticos. Tais *commodities* incluem também a comercialização de grãos, especialmente soja e milho (LABTRANS, 2015).

Atualmente o complexo portuário de São Luís é constituído pelo Porto do Itaqui, dois terminais de uso privativo, o Terminal Ponta da Madeira pertencente à empresa Vale, constituído de dois piers de acostagem para navios de até 450.000 toneladas de porte bruto (TPB), um pátio descoberto de 125.000 m<sup>2</sup> para estoque de minério de ferro e manganês, e um silo horizontal para grãos com capacidade estática de 25.000 t, e o Terminal Alumar pertencente a Alcoa Alumínio S.A. – Billiton Metais e Alcan, localizado no Estreito dos Coqueiros, onde atracam navios graneleiros em um cais de 252 m de comprimento (ANTAQ, 2010)

Dados sobre o desenvolvimento do estado, mostram que a movimentação de cargas do complexo portuário maranhense finalizou 2016 com 166,2 milhões de toneladas exportadas. Em 2016, o volume de exportações movimentou US\$ 2,1 bilhões, enquanto as exportações somaram US\$ 2,2 bilhões (MARANHÃO, 2017). O Porto do Itaqui fechou o ano com o maior crescimento das exportações de grãos em relação aos demais portos do Arco Norte, formada também pelos estados de Rondônia, Amazonas, Amapá e Pará (EMAP, 2017).

O Porto do Itaqui também é líder no escoamento de soja e milho produzidos no MATOPIBA, região considerada como grande fronteira agrícola nacional da atualidade, que reúne espaços dos estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia. A região produziu 12,7

milhões de t entre 2015 e 2016, produção escoada em boa parte via Porto do Itaqui. Com os incentivos e o estímulo ao setor produtivo e ao modal portuário maranhense, a projeção para os próximos dez anos é que o número dobre para 24,4 milhões de t (EMAP, 2016).

Para 2017, as estimativas apontam ainda mais crescimento do valor das exportações, espera-se ainda o crescimento nas exportações do complexo bovino, sobretudo na cadeia de couros que cresceu significativamente em 2016 e já possui projetos logísticos para transporte portuário (MARANHÃO, 2017). O embarque de gado vivo, em 2015, injetou R\$ 42 milhões em aproximadamente um mês de operação com gado maranhense, em maio deste ano, quando foram exportadas cerca de 11 mil cabeças. Essas operações beneficiaram aproximadamente 200 pequenos e médios produtores de vários municípios maranhenses, entre os quais Açailândia, Imperatriz, Bacabal, Amarante, Itinga, Buriticupu, Santa Inês, Presidente Dutra, Grajaú, Arame, Lagoa Grande e Pedreiras.

A celulose é outro produto exportado, cuja cadeia começa no sul do Maranhão. O eucalipto cortado é carregado até a fábrica, em Imperatriz, em caminhões, em uma média de 250 mil metros cúbicos de madeira por mês. É essa carga de celulose pronta para exportação que segue da fábrica até o Porto do Itaqui de trem, percorrendo 630 quilômetros. Cada trem carrega 5.760 t em 72 vagões. Isso equivale a mais de 120 caminhões de 48 t cada, que são tirados das estradas (EMAP, 2016).

Os dados nos conduzem a inferir que a atividade portuária na área de estudo tende a um incremento cada vez maior, o que exigirá um biomonitoramento constante da área. Concordando com Sousa et al. (2013), que defende estudos que possam esclarecer o potencial e a dinâmica dos xenobióticos ou de outros contaminantes são de grande importância econômica para o estado do Maranhão, uma vez que a pesca artesanal ainda é realizada próximo ao complexo portuário de São Luís, MA, onde esses organismos podem estar sujeitos a condições fisiológicas desestabilizadoras em função dos contaminantes oriundos da carga e descarga de navios.

A Baía de São Marcos é considerada a porta mais importante do Estado do Maranhão, recebendo sua água principalmente do Rio Mearim. Na última década, a contaminação por bioquímicos desta baía se deu devido à descarga de esgoto e o escoamento de nutrientes, pesticidas, e outros resíduos agrosilvopastoris. Também há presença de resíduos industriais, bioinvasão e outros impactos ambientais graves, levam a uma crescente ameaça à sanidade de organismos aquáticos. Os principais poluentes, como metais pesados, derivam de atividades

industriais através de seus respectivos terminais marítimos (CARVALHO-NETA; ABREU-SILVA, 2010).

### **3.2 O Monitoramento e Gestão Ambiental em Áreas Portuárias**

A partir da década de 1970, o olhar sobre os problemas ambientais se ampliou, antes as atenções estavam voltadas apenas para os desequilíbrios encontrados no continente, agora as alterações que o ambiente marinho sofria passou a também interessar aos estudiosos do assunto.

A visão que se tinha era que descarregar lixo no ambiente marinho não era prejudicial, porque os oceanos eram tão vastos que sua capacidade de absorver o desperdício era infinita, essa ideia foi desconstruída na Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente Humano (ESTOCOLMO, 1972).

Os estudos realizados no golfo do México, são exemplos dessa nova perspectiva de análise, lá os ecossistemas são afetados por atividades humanas, interações entre espécies locais, a introdução de novas espécies e as incertezas advindas de eventos naturais como furacões, tornam o progresso dos esforços de restauração desiguais e imprevisível de ano para ano. Em geral, as atividades de monitoramento são subfinanciadas e poucos programas de gestão ambiental, incluindo restauração, com monitoramento dos resultados ecológicos ou sociais (por exemplo, uma revisão dos programas de conservação mostrou apenas 20 a 26% dos projetos estabeleceram monitoramento de programas (NAP, 2017).

A extensão da costa brasileira, a rápida industrialização e o desenvolvimento econômico nas regiões costeiras resultam na utilização dos estuários para despejo de efluentes urbanos e industriais, esse fato representa uma contínua introdução desses poluentes em ambientes estuarinos e costeiros oriundos de rios, lixiviação, escoamento das águas de regiões industrializadas, com conseqüente contaminação dos organismos marinhos e do ser humano que os consome (FERREIRA et al., 2013).

Williams (1996), definiu poluição como a produção e emissões de poluentes, que são geralmente derivados de assentamentos humanos, do uso de recursos e intervenções, como infra-estrutura, desenvolvimento e construção, atividades agrícolas, empreendimentos industriais, urbanização, turismo etc. Destacam-se os resíduos de origem industrial, como dioxinas e furanos, compostos nitroaromáticos, metais pesados e diversos tipos de pesticidas,

(polycyclic aromatic hydrocarbons - PAHs), bifenilas policloradas (polychlorinated biphenyls - PCBs) (VAN DER OOST et al., 2003).

No início da década de 1960 vários países começaram a se preocupar com os efeitos adversos desses compostos químicos e o risco potencial que eles representam para os ecossistemas aquáticos, e, em vários países, a produção, comercialização e utilização de muitos compostos, em especial aqueles considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) foram proibidos. Entretanto, em muitos países em desenvolvimento os poluentes orgânicos persistentes POPs ainda são utilizados na agricultura, no controle de vetores de doenças, bem como para fins industriais (STAP, 2004).

No Brasil, a mais recente resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, proíbe o lançamento dos POPs nos efluentes e determina que, quando apropriado, a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas (BRASIL, 2005).

A poluição nas áreas costeiras marinhas também é considerada a partir de fontes terrestres pontuais e não-pontuais, como rios, valas de drenagem, quedas submarinas e cidades costeiras. A porção de poluentes nas regiões costeiras é determinada pela combinação de três mecanismos: (a) Advecção por correntes; (b) Difusão turbulenta e (c) Interações químicas, biológicas ou outras (VIKAS; DWARAKISH, 2015).

Atualmente, os ecossistemas aquáticos tropicais estão entre os mais ameaçados pelas atividades humanas e pela degradação ambiental, mas ainda são poucas as pesquisas realizadas para avaliar e monitorar o impacto de contaminantes nesses ecossistemas tropicais e em sua biota aquática (BOZZETTI ; SCHULZ, 2004).

Os estudos que mostram conceitos de fluxos de serviços ecossistêmicos e estoques do capital natural tornam-se cada vez mais úteis de destacar, medir e valorizar o grau de interdependência entre os seres humanos e toda a natureza (DE GROOT, 2010). Esta abordagem é complementar, precisa-se cruzá-la com outras informações, sua importância está em fornecer ferramentas conceituais e empíricas que faltam às outras. Estimativas da contabilidade global sobre o valor dos serviços ecossistêmicos expressados em unidades monetárias são úteis para aumentar a conscientização sobre a magnitude dos mesmos em relação a outros serviços prestados pelo capital construído pelo homem na atualidade (DE GROOT, 2010).

Constanza et al. (2014) revelaram estimativas que mostram que as mudanças globais no uso da terra entre 1997 e 2011 resultou em perda de serviços ecossistêmicos entre US \$ 4,3 e US \$ 20,2 trilhões / ano, deve-se levar em consideração que essas estimativas são conservadoras. Não se deve subestimar a importância da mudança de consciência e visão de mundo que essas estimativas globais podem facilitar - é um precursor necessário para a aplicação prática do conceito usando mudanças nos fluxos de serviços para a tomada de decisões em escalas múltiplas. Isso nos permite construir uma imagem abrangente e equilibrada dos ativos que suportam o bem-estar humano e sua interdependência com toda a vida no planeta. Abordagem como estas incentivam a valorização e conseqüentemente investimentos em monitoramento ambiental.

O monitoramento fornece informações que são úteis na gestão do meio ambiente, seus recursos ou atividades humanas que os afetam. Os dados de monitoramento ambiental documentam as condições existentes e, se coletados repetidamente, detectam mudanças crônicas nas condições anteriores à interferência. Em áreas onde não se conhece as condições ambientais anteriores, o monitoramento estabelece um ponto de partida para futuras comparações. O monitoramento é mais benéfico quando resulta em um gerenciamento mais efetivo para tomada de decisões, assim que se detecta que uma área foi contaminada, uma série de parâmetros é monitorada para se compreender a dinâmica e a interação de seus contaminantes com o meio, como o monitoramento poder-se-á dizer se as medidas de intervenção estão apresentando o desempenho esperado (CETESB, 2005).

Um exemplo de monitoramento eficaz foi a escolha de bactérias coliformes como indicador de contaminação fecal humana, tornou-se uma medida efetiva de saúde pública há décadas, propiciando ações de gestão para impedir o uso de praias para nadar ou pescar, ou ainda para eliminar ou melhorar o tratamento das descargas de esgoto (BOESCH *et al.*, 1990).

O “novo modelo portuário brasileiro” instituído pela Lei de Modernização dos Portos (Lei no 8.630/93), não trouxe mudanças na questão ambiental, mesmo passados tantos anos da promulgação da Lei de Modernização dos Portos, poucas autoridades portuárias têm unidades ambientais adequadamente estruturadas, e os processos de gestão ainda são fragmentados, uma situação bem aquém do ideal em termos globais que defendem a necessidade de se ter pessoal qualificado e em número suficiente, orçamento próprio e políticas consistentes e continuadas para poder atender suas demandas (PORTO; TEIXEIRA, 2002). Da mesma forma, poucas empresas privadas do sistema portuário tratam as questões ambientais no âmbito do planejamento, como uma estratégia proativa, que podem reduzir custos e diminuir impactos

ambientais, evitando assim, as ações de comando e controle que são reativas, dispendiosas e ineficazes em termos socioambientais. Em muitos setores ainda prevalece a ideia que as medidas de controle ambiental são barreiras ao desenvolvimento, pois demandam custos elevados de adaptação, que acabam refletindo nos preços dos produtos e serviços. Há questões ainda não modernizadas, em desacordo ao novo modelo portuário, como as trabalhistas (já que a mecanização se faz com a dispensa de mão-de-obra portuária), a qualificação profissional (ainda aquém das necessidades dos tomadores de serviço) (KITZMAN; ASUS, 2006). O quadro 1 resume as atividades portuárias e seus impactos negativos, o que mostra que é imprescindível que haja uma boa gestão no sistema portuário.

**Quadro 1-** Atividades Portuárias e Impactos Ambientais Gerados.

| Atividades Portuárias   | Impactos Ambientais Negativos  |
|---|--|
| Implantação de infraestrutura marítima e terrestre                            | Supressão de vegetação, modificação no regime e alteração no fundo dos corpos d'água, agressão a ecossistemas, poluição da água, do solo, do subsolo e do ar.  |
| Resíduos das embarcações  | Perdas de grãos no transbordo e outras matérias primas transportadas, poluição do ar, da água, do solo   |
| Operações com as embarcações  | Consumo de madeira   |
| Serviços correlatos, como abastecimento de embarcações e outros atendimentos; | Geração de efluentes sanitários, geração de água de lastro (introdução de organismos exóticos, nocivos ou patogênicos por meio das águas de lastro, alteração da qualidade da biota aquática)  |
| Obras de acostagem;   |  |
| Serviços de dragagem;   | Retirada de sedimento, ressuspensão do sedimento, aumento da turbidez, diminuição da penetração da luz, mudança do tipo de sedimento, matéria orgânica, alteração da profundidade da coluna de água, altura da onda, liberação de contaminantes, caso estes ocorram, mudanças nas concentrações de nutrientes, mudanças na temperatura, oxigênio dissolvido, sais, entre outros; |
| Geração de resíduos pela atividade portuária;                                 | Geração de resíduos perigosos e não perigosos  |
| Operação de máquinas e veículos portuários;                                   | Perdas de grãos no transbordo, Emissão de Material Particulado   |
| Manuseio de cargas perigosas;   | Poluição acidental   |
| Abastecimento e limpeza de embarcações;                                       | Geração de resíduos sólidos e efluentes  |

Fonte: Elaborado pela autora (baseado em ANTAQ, 2017 E EMAP, 2017)

A gestão ambiental provoca mudanças profundas, tanto estruturais quanto culturais, que definem um novo *modus operandi* portuário. Políticas de prevenção ambiental foram e não são consideradas um fator estratégico na grande complexidade das reformas pretendidas, que muitas vezes foram resultantes de demandas do Ministério Público (KITZMAN; ASUS, 2006).

A valorização das questões ambientais tornou-se uma vantagem no mercado empresarial, especialmente quando somada às ações de responsabilidade social corporativa. É importante ressaltar que essa iniciativa foi tomada quando os problemas ambientais atingiram as cadeias produtivas.

Como exemplo do que aconteceu no comércio globalizado, o controle ambiental influencia todas as práticas de exportação de poluição. No Brasil, por exemplo, desde 2001 foi proibida a importação dos gases clorofluorcarbonos (CFCs). O Programa recebeu recursos financeiros do Fundo Multilateral do Protocolo, que, até 2010, investiu US\$ 26,7 milhões para auxiliar o governo brasileiro a alcançar resultados positivos na área, substâncias que destroem a camada de ozônio, outros caso são de países ditos energético eficientes, mas que exportam as indústrias altamente consumidoras de energia, como o alumínio, por exemplo. Diversos incentivos surgiram para que haja essa mudança, a exemplos certificação ambiental de empresas exportadoras e importadoras (FORNASARI FILHO; COELHO, 2002).

### **3.3 Bioindicadores para avaliação no monitoramento ambiental**

Em uma proposta de monitoramento para reservas marinhas e áreas protegidas nos Estados Unidos, levantou-se que quatro categorias de informações podem ser incluídas em um programa de monitoramento: (1) estrutura das comunidades marinhas (abundância, estrutura etária, diversidade de espécies, e distribuição espacial); (2) manutenção ou recuperação do habitat; (3) indicadores de qualidade da água ou degradação ambiental (por exemplo, poluentes, níveis de nutrientes, sedimentação); e (4) atributos e impactos socioeconômicos. Para cada categoria, é importante que os sites de pesquisa de programas de monitoramento representativos da MPA, incluam sites replicados e comparáveis com diferentes níveis de proteção e empregar técnicas de amostragem padronizadas (National Research Council, 2001).

É necessário conhecer e utilizar mais indicadores biológicos sensíveis para monitorar os efeitos de fatores ambientais antes de se tornarem extremos, monitorar a coluna de água, bem como comunidades bentônicas, e a recuperação do ecossistema (BOUDOU; RIBEYRE, 1997)

A seleção adequada de indicadores requer alguma compreensão do fluxo de material e da composição das espécies dentro de um ecossistema e indicadores podem diferir entre diferentes estressores ambientais. Há também uma necessidade de desenvolvimento de indicadores que: detectem efeitos agudos subliminares de substâncias tóxicas, bem como manifestações de efeitos letais crônicos de longo prazo, além de medir e prever disponibilidade biológica de produtos químicos tóxicos em água e sedimentos (National Research Council, 1994).

Bioindicadores são organismos de uma espécie, ou parte de um organismo, ou ainda uma comunidade de organismos, cuja função e/ou status da população podem ser usados para monitorar a sanidade ambiental do lugar que eles vivem (MCGEOCH, 1998), levando-se em consideração sua sensibilidade ou tolerância às alterações ambientais (WASHINGTON, 1984).

Alterações no status da população, comportamento e fisiologia de cada organismo são usados para prever a ocorrência de um problema ambiental dentro de um dado ecossistema (MARKERT et al., 1999).

Conti e Cecchetti (2001) diferenciam bioindicador de biomonitor, este último fornece informações do ambiente no aspecto quantitativo, enquanto aquele no aspecto qualitativo. Markert et al. (2003), expõem a problematização existente por não haver uma linguagem internacional comum entre bioindicador e biomonitor. Um biomonitor também é um bioindicador, mas um bioindicador não cumpre necessariamente os requisitos para um biomonitor.

Em geral, bioindicadores são organismos que podem ser usados para identificação e determinação qualitativa de fatores ambientais de importância para o ser humano, enquanto biomonitor são organismos usados para determinação quantitativa de contaminantes e podem ser classificados como sendo sensíveis ou acumulativos (TONEIJK; POSTHUMUS, 1987).

Pela nomenclatura e aplicação nos mais diversos monitoramentos, que seja conveniente a compreensão de que quando o organismo apresenta tolerância às alterações ambientais, ele pode ser usado no biomonitoramento, acompanhando as mudanças no decorrer dos anos, portanto pode ser considerado um biomonitor (CONTI; CENCHETI, 2001).

O uso de bioindicadores provê um número significativo de vantagens na avaliação da qualidade da água, do que medi-la diretamente (COOPER et al., 2009). Metodologias tradicionais de monitoramento aquático, principalmente em áreas de fontes de poluição não

pontuais, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas, são questionados há algum tempo. Metcalf (1989) afirmou que as avaliações biológicas deveriam ser incluídas, pois ofereceriam vantagens importantes sobre medições químicas, visto que os organismos integram o meio ambiente, estão expostos às condições durante longos períodos de tempo, enquanto os dados químicos são de natureza instantânea e exigem um grande número de medidas. Outra desvantagem é que se as medições químicas forem feitas longe da fonte poluente, não serão capazes de detectar perturbações sutis sobre o ecossistema (BAPTISTA et al., 2003; BUSS et al., 2003). Para a realização de avaliações eficientes, é de fundamental importância a aplicação de análises integradas da qualidade da água, unindo as repostas das metodologias tradicionais de avaliação aos aspectos biológicos do sistema (BAPTISTA et al., 2003).

A resposta que se pretende obter no monitoramento, depende do sucesso da escolha do bioindicador, visto que nenhum organismo pode ser usado para todos os fins. Cairns et al. (1993), afirmam que “*basicamente, tudo é um indicador de alguma coisa, mas nada é um indicador de tudo*”.

Segundo Klumpp (2001), os organismos bioindicadores podem ser classificados ou agrupados em: 1) organismos apontadores e indicadores ecológicos - indicam o impacto da poluição através de mudanças no tamanho de sua população, ou através de sua presença ou desaparecimento sob certas condições ambientais; 2) organismos testes - indicadores padronizados, utilizados em testes toxicológicos e ecotoxicológicos; e 3) organismos monitores - mostram, qualitativa e quantitativamente, o impacto da poluição ambiental sobre organismos vivos utilizados para monitorar a qualidade do ar ou da água. Podem ser utilizados no monitoramento passivo, em que as espécies já se encontram no ecossistema estudado, ou no monitoramento ativo, em que os organismos são introduzidos de forma padronizada.

Para Mouillot et al. (2002) as espécies são identificadas como bioindicadores quando sua presença ou abundância em locais de um habitat particular, ou uma área de conservação, são altas.

Um bioindicador deve ter as seguintes características (JOHNSON et al., 1993; COOPER et al., 2009): 1) a *especificidade* é a medida em que as mudanças no bioindicador respondem às mudanças em qualidade da água, e não a outras condições ambientais. 2) a *monotonicidade* é a medida em que o aumento das mudanças no bioindicador é proporcional à intensidade e duração das mudanças na qualidade da água, que se torna evidente na relação causa/efeito. 3) a *variabilidade* é a extensão de variação natural do bioindicador na ausência de mudanças na

qualidade da água. 4) a *praticidade* é a extensão que as mudanças no bioindicador são facilmente quantificadas, e depende do custo, independência do observador, nível de expertise e as escalas espaciais e temporais necessárias para aplicação. 5) a *relevância* refere-se à importância ecológica bem como a participação pública., o que auxilia na divulgação dos resultados.

Para serem biologicamente relevantes, as espécies de bioindicadores devem apresentar alterações em resposta a um estresse (sensibilidade), ter baixa variabilidade natural, exibirem alterações persistentes que são provavelmente atribuíveis aos estresses (especificidade), abrangerem variações em escala e complexidade e exibem biologicamente importantes e mudanças mensuráveis (REZENDE; LACERDA, 1986).

Burger e Gochfeld (2001) afirmam que alterações agudas e crônicas podem afetar a qualidade da água e atingir os organismos. Um indicador útil é aquele que responde aos estresses e pode servir de alerta precoce de potenciais efeitos adversos, nesse caso, também pode-se considerar uma alteração aguda (por exemplo, dragagem ou eventos de inundação). No entanto, a resposta não deve ser tão sensível que indica falsamente variações triviais ou biologicamente sem importância. Para ser de máxima utilidade, as mudanças devem ser mensuráveis antes que o dano seja irreversível (BURGER E GOCHFELD, 2001).

Um outro tipo de alteração na qualidade da água pode ser crônica (por exemplo, alterada regime de escoamento) ou então uma característica importante na seleção de qualquer bioindicador é o tempo necessário para a resposta biológica manifesto na comunidade genética / colônia, população ou comunidade nível. Tanto a duração do início da resposta como a período de recuperação pode variar de quase instantâneo para décadas (MAGALHÃES E FERRÃO FILHO, 2008).

Muitos crustáceos decápodos têm sido utilizados como bioindicadores para monitoramento portuário, Entre as 26 espécies identificadas nos trabalhos analisados por Andrade (2016), o biomonitor mais utilizado foi o decápodo *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758), que foi utilizado em 11 estudos, seguidos por *Ovalipes trimaculatus* (De Haan, 1833), *Macrophtalmus* ( *Hemiplax*) *hirtipes* (Heller, 1865), *Heloccius cordiformis* (Milne Edwards, 1837), *Paradorippe granulata* (Haan, 1841), *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758), *Palaemonetes pugio* (Holthuis, 1949). Nesse mesmo trabalho de revisão, Andrade (2016) afirma que outros crustáceos utilizados são: 1) Amphipoda; 2) Isopoda; 3) Maxilipoda.

### 3.3.1 Siris como modelo animal para bioindicadores

Os siris pertencem a Classe Malacostraca, Subclasse Eumalacostraca Superordem Eucarida, Ordem Decapoda, Subordem Pleocyemata, infraordem Brachyura (MARTIN ; DAVIS, 2001). De acordo com Brusca e Brusca (2007), é estimado um total de 67.000 espécies de crustáceos descritas. Os crustáceos representam um dos grupos de invertebrados mais populares devido ao fato de incluírem espécies com grande interesse econômico as quais são consideradas importantes itens alimentares). Constituem um grupo extremamente importante, pois ocupam posições ecológicas fundamentais como elos tróficos entre produtores primários (fitoplâncton) e consumidores em níveis tróficos superiores (RUPPERT et al.; 2005).

Dentre as ordens, a Decapoda apresenta maior diversidade de espécies registradas que atualmente contém uma estimativa aproximada de 15.000 espécies. Devido sua diversidade, estudos dos decápodes tem sido um “campo fértil” para os pesquisadores e novas descobertas requereram alterações na classificação que melhor refletissem suas mudanças e relacionamentos evolutivos (DE GRAVE et al., 2009).

Na infraordem Brachyura estão os siris e caranguejos, A infraordem Brachyura é representada por cerca de 6.835 espécies (DE GRAVE et al., 2009) e, de acordo com Stenberg (1996), constitui um dos grupos mais diversificados morfológica e ecologicamente. Segundo Melo (1996), o litoral brasileiro é composto por mais de 330 espécies de Brachyura.

Dentre os Brachyura, os membros da superfamília Portunoidea têm merecido destaque nas investigações relacionadas aos parâmetros distribucionais, devido, provavelmente, à sua abundância e importância econômica (SANTOS et al., 1994).

Na superfamília Portunoidea está inserida a família Portunidae, que inclui todos os siris: são comumente descritos como caranguejos que possuem o hábito de nadar, proporcionado pela forma hidrodinâmica do corpo e pela posse de um artigo achatado, em forma de remo, no último par de apêndices locomotores.

Segundo Melo (1996), a família Portunidae é representada nas Américas por mais de 300 espécies. No Brasil são registradas 21 espécies de siris desta família. Possuem importância socioeconômica como recurso alimentar de muitos brasileiros que moram no litoral, outrossim são considerados indicadores biológicos de massas de água (TAISSOUN, 1973).

Nesta família encontra-se o gênero *Callinectes* com 16 espécies descritas mundialmente das quais 6 são encontradas no Brasil: *C. bocourti* A. Milne-Edwards, 1879; *C. danae* Smith,

1869; *C. exasperatus* (Gerstaecker, 1856); *C. larvatus* Ordway, 1863; *C. ornatus* Ordway, 1863 e *C. sapidus* Rathbun, 1895 (Melo, 1996).

Dentre as dez espécies que compõem o gênero *Callinectes*, oito já foram registradas para a costa brasileira, a saber: *Callinectes bocourti* A., *Callinectes danae*, *Callinectes exasperatus*, *Callinectes larvatus*, *Callinectes ornatus*, *Callinectes sapidus* e *Callinectes affinis* (SANKARANKUTTY et al., 1999).

A diagnose de *C. danae* (MELO 1996; CALADO; SOUSA, 2003), é: carapaça com 4 dentes frontais, área metagástrica com largura que varia de 2 a 2,5 vezes o comprimento, largura posterior 1,5 vezes o comprimento; margens ântero-laterais pouco arcadas, os dentes variam por ter margem externa convexa ou serem espiniformes, sendo a margem anterior mais curta que a posterior; quelípodes com cristas granuladas; carpo com forte dente lateral e forte proeminência; gonópode do macho alcançando além do ponto mediano do esternito VI, se cruzando entre si perto da base; os quelípodes são azuis, o cefalotórax e as patas possuem tonalidades parda a azul; a face interna na metade distal dos dedos apresenta uma coloração lilás, no entanto essa coloração pode variar de acordo com o ambiente.

Os habitats bentônicos costeiros estão entre mais produtivos do planeta. Segundo Pereira e Soares-Gomes (2002), dentre os ecossistemas presentes na região entre-marés e habitats da zona costeira, os substratos duros, no geral, são considerados alguns dos mais importantes por abrigarem um grande número de espécies de grande importância ecológica e até econômica, tais como mexilhões, ostras, crustáceos e algumas espécies de peixes. Por receberem grandes quantidades de nutrientes de sistemas terrestres, estes ecossistemas apresentam uma grande biomassa, assim como uma elevada produção primária de microfitobentos e de macroalgas. Como consequência, estes habitats são locais de alimentação, crescimento e reprodução de um grande número de espécies.

Mesmo com aspectos tão relevantes desses organismos, existem diversas pressões, como a coleta indiscriminada, contaminação por poluentes, diminuição das áreas de mangue, e a relação de competição ou predação com espécies exóticas como o siri africano *Charybdis hellerii*, registrado pela primeira vez por Feres et al. (2007), presente em todo o litoral da Ilha do Maranhão, principalmente em áreas rochosas.

As espécies exóticas invasoras são organismos que, introduzidos fora da sua área de distribuição natural, ameaçam ecossistemas, habitats ou outras espécies. São consideradas a

segunda maior causa de extinção de espécies no planeta, afetando diretamente a biodiversidade, a economia e a saúde humana (MMA, 2003).

O despejo de água de lastro vinda de outro continente contribuiu sobremaneira para quebra de barreiras ecológicas, tendo como uma de suas consequências o aumento expressivo das ocorrências de introduções de espécies exóticas (MEYERSON; MOONEY, 2007) e perda da biodiversidade local. No caso da Ilha do Maranhão, a via de entrada tem sido os navios em direção ao Porto do Itaqui, um problema que atinge todas as cidades onde há atividade de movimentação portuária, e tem sido apontado como o vetor de transferência mais importante na atualidade. Tal mistura global de organismos contribui para a perda mundial de diversidade no ambiente aquático e nas comunidades terrestres (SILVA et al., 2002).

### **3.4 Biomarcadores no monitoramento ambiental**

Os biomarcadores são definidos como componentes biológicos, células, processos bioquímicos, estruturas e funções biológicas, que se alteram em contato com compostos xenobióticos (KENDALL et al., 1996). O uso de biomarcadores é especialmente útil no diagnóstico inicial da contaminação, podendo captar mudanças sutis no ambiente, que somente tempos depois seriam detectadas em populações e comunidades (HYNE; MAHER, 2000).

De acordo com WHO (1993), os biomarcadores podem ser subdividido em três classes: a) *biomarcadores de exposição*: cobrindo a detecção e medição de uma substância exógena ou seu metabólito, ou ainda o produto de uma interação entre um agente xenobiótico e alguma molécula ou célula alvo que é medido em um compartimento dentro de um organismo; b) *biomarcadores de efeito*: incluindo bioquímicos mensuráveis, alterações fisiológicas ou outras dentro dos tecidos ou fluidos corporais de um organismo que pode ser reconhecido como associado a uma saúde estabelecida ou possível deficiência ou doença; c) *biomarcadores de susceptibilidade*: indicando o inerente ou capacidade adquirida de um organismo para responder ao desafio de exposição a uma substância xenobiótica específica, incluindo fatores genéticos e mudanças em receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo para essa exposição.

Atualmente, a análise de deformidades morfológicas em macroinvertebrados bentônicos é uma medida qualitativa da presença de contaminantes em um ecossistema, ainda estando restrita a alguns grupos taxonômicos. Para ampliar os estudos e incluir abordagens quantitativas, é necessário expandir o número de espécies estudadas e aprofundar os estudos experimentais. As deformidades provocadas por agentes químicos ou classes de contaminantes

específicas devem ser identificadas, e as relações entre dose e tempo de exposição e a frequência e severidade das deformidades devem ser estabelecidas.

Sousa et al. (2013) ressalta a importância de estudos que esclareçam o potencial e a dinâmica dos xenobióticos ou de outros contaminantes em espécies de importância econômica, como aquelas que são utilizadas na alimentação.

Alterações histológicas em tecidos de peixes constituem uma metodologia sensível para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo e, portanto, são indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (SCHWAIGER et al., 1997). A histopatologia traduz a lesão integrada em função da duração e da intensidade da exposição ao elemento tóxico e a capacidade adaptativa de um determinado tecido (FERREIRA, 2004; ALBINATI et al., 2009).

#### 3.4.1 Alterações Enzimáticas como biomarcadores bioquímicos

Geralmente, uma vez que os animais são expostos a contaminantes, uma cascata de respostas biológicas são ativadas, mas cada resposta pode ser considerada um biomarcador (STEGEMAN et al., 1992). O uso de biomarcadores de contaminação aquática em peixes em Unidades de Conservação (UCs) é particularmente importante, uma vez que mostra respostas biológicas iniciais, podendo ser útil para subsidiar ações de monitoramento e de gestão ambiental (CARVALHO-NETA; ABREU-SILVA, 2010).

O uso de biomarcadores bioquímicos em monitoramento ambiental oferece algumas vantagens: são normalmente os primeiros a serem detectados, são bastante sensíveis à presença de determinados poluentes, apresentam alta especificidade, possuem baixo custo de análise e fornecem informações a respeito do efeito metabólico causado pelo xenobiótico (STEGEMAN et al., 1992; VAN DER OOST et al., 2003).

A maioria dos xenobióticos que entra no organismo é lipofílica, uma propriedade que permite que esses compostos exógenos penetrem as membranas lipídicas e sejam transportados por lipoproteínas nos fluidos corpóreos. Os efeitos tóxicos de um xenobiótico ou seus metabólitos podem se manifestar quando o composto se liga a macromoléculas celulares levando à ruptura da membrana, danos celulares ou efeitos genotóxicos que, por sua vez, podem levar ao desenvolvimento ou à progressão de doenças (VAN DER OOST et al., 2003).

##### *3.4.1.1 Reações de fase I*

A biotransformação desses xenobióticos usualmente consiste de duas fases: durante a fase I, um grupo polar (tais como -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH) é introduzido na molécula através da

ação de oxidases, redutases, hidrolases, etc., e, embora isto aumente sua solubilidade em água, o efeito mais importante é tornar o xenobiótico um substrato adequado para as reações de fase II. Estas reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise), para a maioria dos xenobióticos, são catalisadas por enzimas que compõem o sistema de oxidases de função mista (mixed function oxidase - MFO) e incluem o citocromo P450, o citocromo b5 e o NADPHcitocromo P450 redutase (HODGSON; GOLDSTEIN, 2001).

A reação básica catalisada pelo citocromo P450 é a monooxigenação, na qual um átomo do oxigênio molecular é incorporado ao substrato lipofílico RH, que corresponde ao xenobiótico, e o outro é reduzido à água, sendo os elétrons necessários para a redução fornecidos pelo NADPH. Nessa reação, o xenobiótico (RH) é convertido para um produto mais solúvel em água (ROH) após a incorporação de um átomo de oxigênio proveniente do oxigênio molecular (HODGSON; GOLDSTEIN, 2001).

O contaminante associado a mecanismos de biotransformação, podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), estas são normalmente geradas no metabolismo celular, como decorrência do processo de transferência de elétrons na respiração mitocondrial das células principalmente aqueles relacionados à fase I (reações de CYP450) (STEGEMAN et al.1992).

#### *3.4.1.2 Reações de fase II*

De acordo com Van Der Oost e Vermeulen (2003) os componentes da defesa antioxidante são funcionalmente divididos em enzimas de biotransformação da fase II e enzimas de estresse oxidativo (SOD, CAT, GPX E GR.), por isso são os mais extensivamente investigados (SIES et al., 1993). A enzima antioxidante glicose -6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é conhecida como enzima auxiliar (BONILLA –VALVERVERDE et al., 2004).

O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de EROS excede a taxa de decomposição em seus sistemas antioxidantes, o que conduz a um aumento do dano oxidativo a níveis celulares (ALMEIDA, et al 2005)

A biotransformação de xenobióticos é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs), que correspondem aos produtos da redução do oxigênio molecular, como o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (STEGEMAN et al.1992).

Essas espécies reativas de oxigênio são oxidantes extremamente potentes, capazes de reagir com macromoléculas celulares críticas, causando diferentes tipos de danos biológicos que podem levar à morte celular.

Assim, a geração de ERO, mediada pelo citocromo P-450 durante o processo de biotransformação, pode ser considerada uma “reação colateral” indesejada das enzimas de biotransformação de xenobióticos (MARTINEZ, 2006).

Os organismos aeróbicos, entretanto, apresentam diferentes mecanismos, enzimáticos e não-enzimáticos, de defesa antioxidante que podem prevenir a formação das EROs, reagir com esses intermediários reativos, bem como reparar os danos causados pelos mesmos (STOREY, 1996).

As enzimas-chave que fazem parte do sistema de defesa antioxidante são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), todas elas abundantes nos tecidos de peixes (MARTINEZ, 2006).

SOD, CAT e GPx são criticamente importantes na detoxificação dos oxiradicaís para moléculas não-reativas. Desde que a atividade dessas enzimas é induzida pelas espécies reativas de oxigênio, elas podem ser indicadores úteis de estresse oxidativo.

Os efeitos mediados pelos oxidantes com potencial para biomarcadores incluem tanto as respostas adaptativas, a exemplo do aumento da atividade das enzimas antioxidantes e a concentração de compostos antioxidantes não-enzimáticos, como as manifestações de toxicidade, tais como a oxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos. (VAN DER OOST et al., 2003).

Caso o sistema de defesa antioxidante esteja comprometido, pode ser estabelecido um desequilíbrio pró-oxidante celular, denominado estresse oxidativo, que, por sua vez, está associado a vários processos patológicos e danos às suas macromoléculas (GUERREIRO et al., 2002).

Detecção de alterações nas enzimas antioxidantes é um dos mecanismos propostos como biomarcador de contaminação, visto que estas enzimas atuam de maneira a “neutralizar” as EROs, visando prevenir danos celulares. (WINSTON, 1991).

Nas reações de fase II, o composto previamente alterado combina com um substrato endógeno para produzir um produto de conjugação solúvel em água que seja prontamente excretado, mas em alguns casos os produtos intermediários ou finais podem ser ainda mais tóxicos que os compostos originaís, e, a seqüência, nesse caso, pode ser denominada de bioativação (DI GIULIO et al., 1995).

Sheehan et al. (2001) em um trabalho de revisão, considera uma fase III, A fase III ou fase de eliminação é representada por mecanismos de transporte. Diversos sistemas de transporte existem para eliminar conjugados de glutatona, incluindo a bomba GSX ATP-dependente, transportador multi-específico de ânions orgânicos (MOAT), multi específico

transportador de ânions de dinitrofenol S-GSH conjugados (bomba Dnp-SG) e P-glicoproteína (Pgp).

Pelo conceito clássico de defesas oxidantes, elas podem ser enzimáticas (catalase – CAT, glutathiona peroxidase – GPx; glutathiona redutase – GR; superóxido dismutase – SOD; glutathiona- s – transferase - GST) e não enzimáticos (CADENAS, et al 1989).

Destaca-se neste trabalho a atuação das enzimas Glutathiona – S – Transferase e Catalase, dando-se ênfase à uma descrição da sua atuação, funções e reações.

#### 3.4.1.3 *Glutathiona-S-Transferase (GST)*

Existe muito interesse em pesquisas sobre GST, devido principalmente ao envolvimento destas enzimas na proteção dos organismos contra compostos tóxicos presentes no meio ambiente (CLARK, 1989).

As glutathiona – S- transferases (GST) representam uma importante família de enzimas, primariamente citosólicas, que catalisam a conjugação de vários compostos com o tripeptídeo glutathiona. Essas proteínas também desempenham papéis adicionais no processo de detoxificação, atuam na conjugação dos compostos remanescentes da fase I, formando compostos conjugados com glutathiona na forma reduzida (GSH).

Diversos estudos indicam que o grau de expressão de GST é um fator crucial para a determinação da sensibilidade de células a um amplo espectro de contaminantes e a indução da GST é parte de um mecanismo de resposta adaptativa a estresse químico o qual é amplamente distribuído na natureza (GOWLAND et al., 2002). As GSTs foram propostas como biomarcadores de contaminação pelo ICES e MED-POL.

As GSTs solúveis aumentam a disponibilidade de agentes tóxicos lipofílicos para as enzimas de fase I, servindo como proteínas carreadoras. Também, por meio de ligações covalentes com os compostos tóxicos, as GSTs reduzem a probabilidade desses compostos se ligarem a outras macromoléculas celulares, como o DNA (STEGEMAN et al., 1992).

O fígado é a principal fonte de GST em peixes, onde essa enzima corresponde a uma grande fração das proteínas hepáticas solúveis. A atividade da GST também já foi descrita em órgãos extra-hepáticos de peixes, entretanto sua atividade nesses tecidos é geralmente menor do que no fígado ( MYERS et al., 1998). Nos siris, o hepatopâncreas ou a glândula digestiva são os principais órgão da reserva e desintoxicação de xenobióticos e é altamente sensível a fatores fisiológicos e ambientais mudanças (VIRGA et al., 2007).

A maioria dos estudos determina a atividade da GST total, utilizando o substrato artificial CDNB (1 cloro 2,4 dinitrobenzeno) fig.1, que é conjugado com a glutathiona reduzida por três das quatro isoformas da GST já descritas para peixes (VAN DER OOST et al., 2003).

Alguns trabalhos também já mostraram um aumento significativo na atividade da GST em peixes expostos ao sedimento coletado em locais poluídos (ALMEIDA et al., 2005) e em peixes mantidos em locais conhecidamente impactados, quando comparados com animais mantidos em locais de referência (CAMARGO; MARTINEZ, 2006).

Essa atividade aumentada da GST pode estar associada a um processo adaptativo do organismo à presença de uma variedade de compostos orgânicos no ambiente (GALLAGHER et al., 2001).

Entretanto, existem relatos na literatura de redução da GST em peixes de locais poluídos e peixes expostos a PAHs, pesticidas e dioxinas (VAN DER OOST et al., 2003), indicando que os resultados da GST devem ser analisados de forma cuidadosa e sempre associados com os resultados de outros biomarcadores bioquímicos.

Estas enzimas catalisam a conjugação de moléculas orgânicas, com um centro eletrofílico reativo, com o grupo tiol do tripeptídeo glutathiona na forma reduzida (GSH) (Fig.1). Geralmente o resultado desta reação é a formação de uma molécula mais polar e menos reativa, de maior facilidade de excreção ( CLARK, 1989).

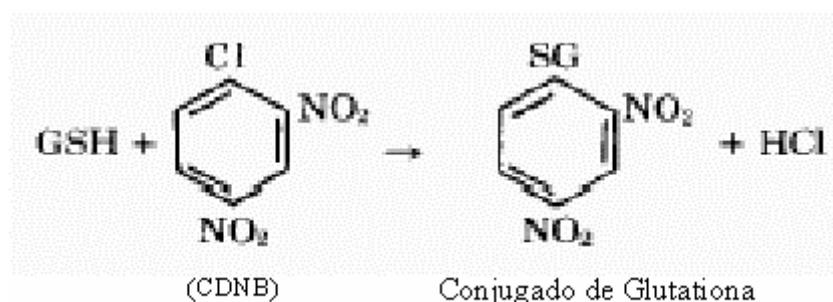


Figura 1 - Equação geral da reação catalisada pelas GSTs. Neste exemplo o substrato utilizado é CDNB (1 cloro 2,4 - dinitrobenzeno) (Keen; Jackoby, 1978).

Além disto, foi verificado que as GSTs apresentam muitas outras funções. Estas enzimas possuem atividade de peroxidase e isomerase, podem inativar espécies reativas de oxigênio, regenerar proteínas S-tioladas, catalisar reações de vias metabólicas não associadas às vias de biotransformação, e ainda são capazes de ligar, não cataliticamente, uma variedade de ligantes

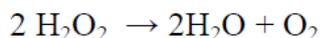
endógenos e exógenos potencialmente tóxicos ( SHEEHAN et al., 2001). Elas são proteínas diméricas, podendo ser homodiméricas ou heterodiméricas (CLARK, 1989).

Estudos indicam que a estrutura dimérica é essencial para a função catalítica, pelo menos em algumas isoformas. O dímero é formado por interações hidrofóbicas entre os monômeros, através de um sistema “chave-fechadura”. Mutações dirigidas para resíduos envolvidos neste sítio de ligação da proteína podem comprometer a interação dos monômeros, influenciando na estabilidade do dímero e do sítio ativo, podendo resultar em uma menor interação com o substrato (ALVES et al., 2006).

O CDNB (1-cloro 2,4–dinitrobenzeno) é utilizado para analisar a atividade de todas as isoformas de GST. Portanto a atividade detectada com este substrato é denominada atividade da GST total.

#### 3.4.1.4 Catalase (CAT)

Segundo Frugoli et al. (1996), as catalases são enzimas que contêm ferro e facilitam a remoção do peróxido de hidrogênio, que é metabolizado para oxigênio molecular e água, conforme a reação a seguir:



Essas enzimas reduzem apenas o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ao contrário de algumas peroxidases que reduzem vários peróxidos lipídicos, bem como o hidroperóxido. Muitos estudos sugerem que a catalase é mais efetiva para controlar o estresse oxidativo quando as concentrações intracelulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  são muito elevadas.

Pequenos aumentos no  $\text{H}_2\text{O}_2$  parecem ser mais bem controlados pela glutathione peroxidase (GPx) (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002).

O ensaio mais usado para determinar a atividade da catalase é muito simples e se baseia na taxa de desaparecimento do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 240 nm.

As catalases ocorrem primariamente nos peroxissomos e a proliferação peroxissômica é a principal causa para a elevação da atividade catalásica nos tecidos, sendo que as espécies reativas de  $\text{O}_2$  provavelmente não induzem maiores atividades *per si* (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005).

A catalase está presente em todos os tecidos de vertebrados, com atividade particularmente alta nos eritrócitos e no fígado; em contraste, a atividade catalásica no cérebro é geralmente baixa ( HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2005).

Como as catalases estão localizadas nos peroxissomos da maioria das células e estão envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos, alterações na sua atividade, principalmente no fígado, podem ser de difícil interpretação. Por isso, a atividade catalásica nos eritrócitos pode ser um marcador mais apropriado para a exposição oxidante em peixes (STEGEMAN et al., 1992).

A atividade dessa enzima também se correlaciona com os hábitos alimentares dos peixes, e, diferentemente do que acontece com a SOD, a atividade da CAT tende a ser menor nos herbívoros do que nos onívoros. Foi observado que alguns contaminantes, como o cobre em altas concentrações e o nitrito podem inibir a atividade da catalase em peixes (LACKNER, 1998).

#### 3.4.2 Lesões branquiais como biomarcador histológico

A presença de agentes estressores podem provocar alterações histopatológicas resultantes de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, essas mudanças podem levar a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (HINTON et al., 1992). As análises histopatológicas representam ferramentas úteis para o diagnóstico e monitoramento ambiental. Esse tipo de análise fornece um método para a detecção de alterações morfológicas em múltiplos órgãos, como brânquias, fígado, rins e gônadas (MAHARAJAN et al., 2015).

O ciclo reprodutivo de crustáceos foi amplamente estudado, principalmente das espécies que têm valor comercial ou potencial ecológico. Estudos histológicos são uma forma de entender condições patológicas do animal, ajudando no diagnóstico das anormalidades ou danos dos tecidos exposto ao estresse tóxico dos metais pesados. O estudo histológico fornece uma indicação precoce de risco de poluição, e também dados úteis sobre a natureza e o grau de dano às células e tecidos (MAHARAJAN, 2017). Além dessas características, o baixo custo justifica o uso de análises histopatológicas em estudos ecotoxicológicos (DALZUCHIO, et al 2016).

As brânquias são o órgão respiratório primário em siris, também são responsáveis por outras funções fisiológicas vitais, como excreção, base ácida equilíbrio e regulação iônica (USMAN et al. 2013). Então, quando os siris são expostos a poluentes, essas funções vitais são prejudiciais afetado e o comprometimento funcional das brânquias pode significar danos à saúde do animal (Kumar e Tembhe, 2010).

A análise de brânquias de peixes e crustáceos tem sido amplamente utilizada, devido à sua grande área em contato com água e alta permeabilidade qualquer mudanças nesse órgãos

pode levar ao comprometimento de várias funções, incluindo troca de gás e regulação iônica (ARELLANO et al., 2004).

Diversos trabalhos em peixes mostraram que as brânquias apresentaram lesões e alteração da sua estrutura quando afetadas por contaminantes ou agentes estressores como metais pesados, amônia, fenóis, endo e ectoparasitos (MAHARAJAN et al., 2015). Essas alterações histológicas funcionam como mecanismos de defesa, como um reflexo de adaptações fisiológicas diminuindo a área de superfície vulnerável da brânquia e/ou aumentando a barreira de difusão ao poluente (ERKMEN; KOLANKAYA, 2000).

Alterações encontradas em brânquias podem ser utilizadas como meio de identificar a ação de compostos químicos nos animais, essas alterações morfológicas proporcionam inferir a qualidade do ambiente aquático e quantificar as alterações fisiológicas dos organismos afetados (LUPI et al., 2007). As alterações histológicas nos tecidos dos siris estudados são consideradas como biomarcadores de efeito a exposição de estressores do meio ambiente, sendo reconhecidas cada vez mais como uma metodologia valiosa para a avaliação do campo de poluentes ambientais (CARVALHO-NETA et al., 2014).

Esta categoria de biomarcadores permite um exame específico dos órgãos e das células alvo, e como eles são afetados sob condições *in vivo*. Além disso, em avaliação de campo, a histopatologia é um método eficaz para detectar os diversos efeitos da exposição aguda ou crônica nos vários tecidos e órgãos (HINTON et al., 1992).

As lesões em tecidos de brânquias tem sido frequentemente estudadas em peixes e crustáceos coletados em ambientes naturais poluídos para avaliar a degradação do ambiente aquático ou validadas em animais expostos a substâncias em testes de laboratório.

O levantamento do epitélio lamelar é considerado como o primeiro sinal de patologia branquial e caracteriza-se pela elevação de uma lâmina contínua do epitélio de revestimento das lamelas para longe do sistema de células pilares, aumentando assim a distância entre o meio externo e o sangue (THOPHON *et al.*, 2003), comprometendo a função respiratória do órgão.

A hiperplasia é um tipo de alteração incipiente, uma das causas pode ser o aumento na concentração de amônia ambiental, caracterizando-se pelo aumento na proliferação das células no epitélio a qual pode levar à fusão lamelar e rompimento das células pilares (KARASU-BENLI; KÖKSAL, 2005). Também é considerada um tipo de alteração inespecífica que pode ser causada por uma variedade de estressores, bem como a descamação da cutícula lamelar e a fusão lamelar (HINTON et al. 1992).

Outro tipo de alteração é a necrose, que consiste na morte celular por meio da ruptura do epitélio lamelar e aumento da substituição celular e da regeneração epitelial, são lesões que

refletem o efeito direto dos poluentes e que ocorrem em condições de maior toxicidade ((PELGROM et al., 1995; MONTEIRO, 2001; SANTOS, 2007).

Os parasitos podem causar danos estruturais graves, como cistos entre as lamelas e inflamação, o aparecimento dos mesmos está relacionado ao desequilíbrio parasito-hospedeiro-ambiente, geralmente associado a um ambiente de baixa sanidade (MORAES; MARTINS ,2004).

### **3.5 Modelos preditivos de impacto**

Estudos em ecotoxicologia tem sido desenvolvidos com o intuito de desenvolver modelos preditivos para o monitoramento ambiental. A utilização de modelos preditivos no contexto de estudo de impacto ambiental é de grande utilidade uma vez que são dispositivos que se utilizam de um conhecimento prévio para prever tendências e eventos, sendo necessário que sejam utilizadas espécies nativas para cada região (MALTCHIK; MEDEIROS, 2001) .

Os modelos tem a vantagem de prever os efeitos dos agentes tóxicos considerando os efeitos a nível molecular, bioquímico, celular, tecidual e em organismos, chegando até os níveis hierárquicos mais altos (BAZANA et al., 2016). Recentemente, as estratégias clássicas de monitoramento biológico tem sido modificadas, iniciando para considerar os organismos e alguns dos seus peculiares processos para representar novos biomarcadores . Há um aumento significativo da utilização dos invertebrados marinhos na avaliação impactos de poluentes ambientais. Por isso, nos últimos anos grandes esforços tem como objetivo identificar o organismo modelo mais relevante para testar toxicidade olhando primeiro para características como uma abundância na natureza, a importância ecológica e comercial e a posição em cadeias alimentares marinhas , especialmente para o que diz respeito à transferência de energia (ANKLEY; JOHNSON , 2004). Os modelos preditivos têm *a informação, o método e o resultado* como elementos básicos (WARREN, 1990).

Modelos matemáticos (preditivos) de dados biológicos foram utilizados em peixes e caranguejos, para a correlação de biomarcadores bioquímicos e histopatológicos (CARVALHO-NETA et al., 2014); e genotóxicos e histopatológicos (PINHEIRO-SOUSA, 2015) em peixes de diferentes regiões do Maranhão. Outros estudos poderão aplicar tal metodologia para outras espécies bioindicadoras, como é o caso de *Callinectes danae*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

A área conhecida como Golfão Maranhense (Fig. 2) é formada por duas grandes Baías, a Baía de São Marcos e a Baía de São José. No Golfão desembocam duas drenagens independentes; o sistema Mearim/ Pindaré/ Grajaú, na baía de São Marcos, e o rio Itapecuru, na Baía de São José. As duas baías que constituem o Golfão maranhense tem ligação distinta com o mar aberto (NUGEO, 2009).

A baía de São Marcos, a mais longa, é um estuário ativo, com um canal central bem desenvolvido e dominado por correntes de vazante, onde sucedem-se bancos arenosos, em série, desde a foz da baía, até dezenas de quilômetros para o interior. Na baía de São José, não existe canal de maré desenvolvido como na baía de São Marcos. Em frente ao Golfão maranhense, a plataforma continental apresenta uma depressão, que é chamada de “depressão maranhense” (EL-ROBRINI, 2006).

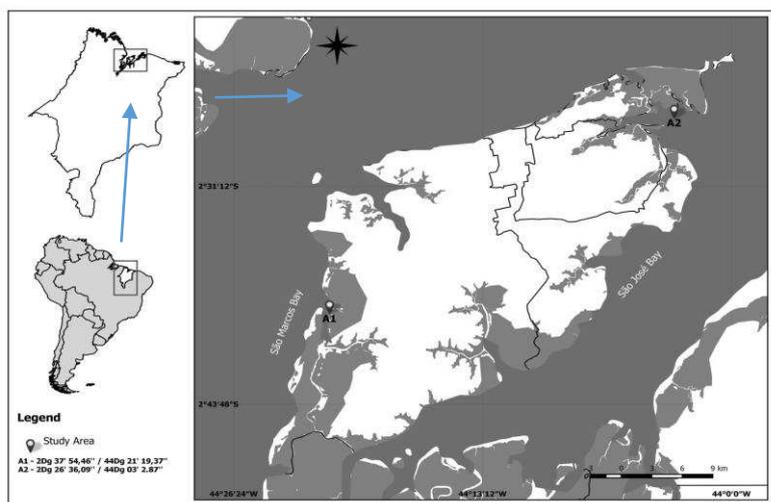


Figura 2 - Golfão Maranhense. Fonte: Andrade (2016).

#### 4.1.1 Raposa - área de Referência (A1)

A área de referência (A1) utilizada neste estudo (Fig. 3), localiza-se no município de Raposa, que fica na faixa litorânea, trecho central da costa maranhense e extremo nordeste da ilha de São Luís, estando situado entre as coordenadas geográficas 02°21' - 02°32'S e 44°00' - 44°12'W. O município possui uma população de 26.327 habitantes, com uma densidade demográfica de 409,10 hab/Km<sup>2</sup> (IBGE, 2010), e está inserido na bacia hidrográfica do Rio Paciência que drena uma área de 171,74 km<sup>2</sup>.

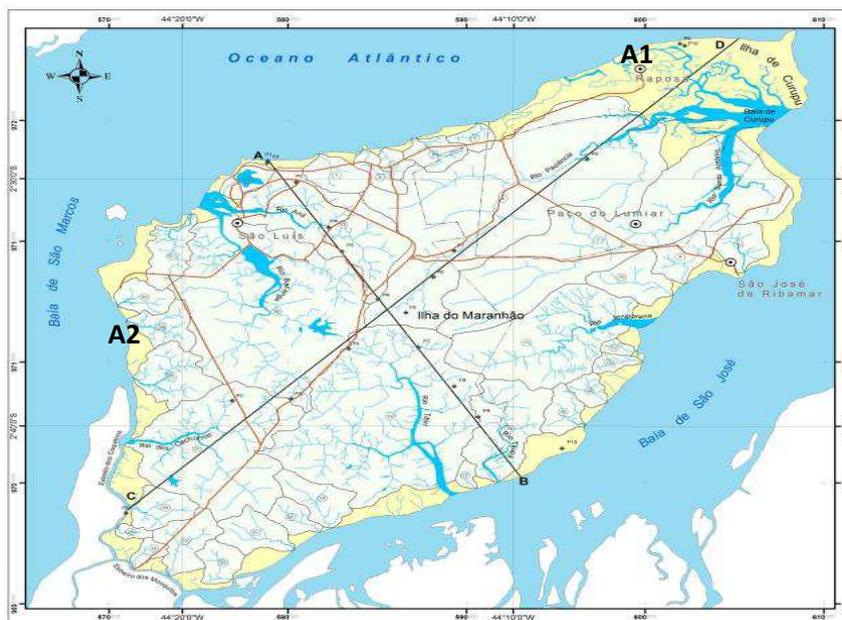


Figura 3 - Localização da área de referência (A1) e potencialmente contaminada (A2). Mapa elaborado por SILVA (2012).

#### 4.1.2 Região de influência do complexo portuário - Coqueiro (A2)

A região de influência do Complexo Portuário de São Luís foi considerada impactada em virtude de estudos anteriores realizados na região (CARVALHO NETA et al., 2014). As coletas foram feitas no estreito dos coqueiros, que apresenta altitudes que variam de aproximadamente 0 a 5 m, declividades de 6 a 12%, gerando estreitas planícies de maré; é uma área protegida da ação das ondas em virtude de sua situação geográfica, na porção frontal para a ilha de Tauá-Mirim, separada desta apenas por um canal denominado estreito dos Coqueiros. Por isso, não há ocorrência de praias arenosas nesta porção costeira da Ilha do Maranhão (SILVA, 2012).

## 4.2 Amostragem

As coletas trimestrais foram realizadas no período chuvoso e de estiagem de 2017 nas áreas portuária e de referência. Com a ajuda de pescadores artesanais, 138 siris foram coletados por arrasto (Fig.4). Os animais foram capturados em pontos aleatórios nos horários de baixamar. Os animais foram imediatamente dissecados com o uso de uma tesoura, amostras de hepatopâncreas, brânquias e gônadas foram removidas com auxílio de pinças esterilizadas (Fig. 4). Para fins de padronização, foram analisados apenas machos em intermuda.



Figura 4 - Pesca do siri com rede arrasto realizada na região.

As amostras de hepatopâncreas (Fig. 5) foram armazenadas em tubos Eppendorf e mantidas em nitrogênio líquido e transportado ao Laboratório de Biomarcadores em organismos aquáticos da UEMA (LABOAq).



Figura 5 - Dissecação do organismo: retirada das gônadas e brânquias e hepatopâncreas.

### **4.3 Biometria**

O peso total (Pt) foi medido em balança eletrônica. Com um paquímetro de precisão (0,05mm) foram aferidas as seguintes variáveis (Fig. 6):

LC – Largura da Carapaça – medida da maior distância entre as duas extremidades laterais da carapaça, excluindo os espinhos laterais;

LCe – Largura da Carapaça com espinho - medida da maior distância entre as duas extremidades laterais da carapaça, incluindo os espinhos laterais;

CQd – Comprimento do quelípode direito - da base do própodo até sua extremidade;

CC – Comprimento da Carapaça.

As medidas da largura do cefalotórax podem ser citadas tanto com os espinhos laterais (LCe) ou sem os espinhos (LC). Decidiu-se levar em consideração as duas medidas (BRANCO; THIVES, 1991; BAPTISTA-METRI et al., 2005, PEREIRA et al., 2009). As médias e desvio padrão dos dados biométricos dos siris das duas áreas e nas duas épocas do ano foram testadas estatisticamente através do Test t (Student).

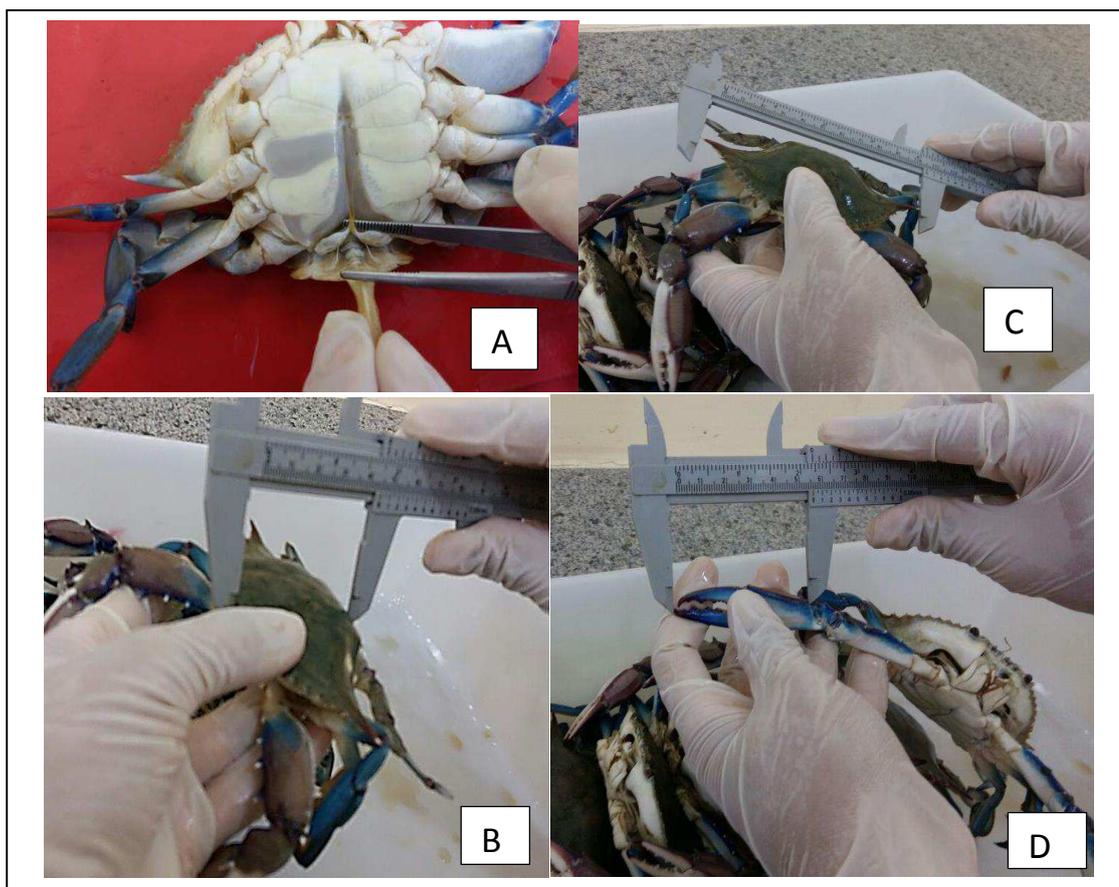


Figura 6 – Biometria. A) macho; B) Medida - CC; C) Medida LCe; D) Medida CQD.

#### 4.4 Análises das enzimas Catalase (CAT) e Glutathiona-S-transferase (GST)

A metodologia para as análises das atividades de GST e Catalase foram realizadas no Laboratório LABOAq da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), enquanto as dosagens de proteínas foram realizadas no laboratório de Genética da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

As amostras de hepatopâncreas foram homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas, sendo o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática da glutathiona-S-transferase (GST) e da catalase (CAT). A atividade da GST foi quantificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm a 25° C, conforme Ken et al. (1976) e modificado por Camargo e Martinez (2006), utilizando-se glutathiona reduzida (GSH) e 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) como substrato, em tampão fosfato de potássio (0,1M), pH 7,0. Já a atividade da CAT foi avaliada, a 240nm, a leitura foi realizada em espectrofotômetro

por 2 min e a atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  consumido/min/mg proteína. de acordo com Tagliari et al. (2004) e Ventura et al. (2002).

#### **4.5 Análises histológicas**

Foram removidos dos espécimes as brânquias e as gônadas com o auxílio de pinças. Os órgãos de cada exemplar foram fixadas em solução de Davidson durante 24 horas. Em seguida, foram lavadas e mantidas em álcool 70% até o processamento histológico usual. Só então os órgãos foram desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol, impregnados e inclusos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em cortes de espessura de  $5\mu\text{m}$  com auxílio de micrótomo (Leica RM 2125 RT), seguidas de secagem à temperatura ambiente no Laboratório LABOAq (UEMA). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Em microscopia de luz, foram analisados dois cortes para cada órgão de cada animal. As alterações foram identificadas com base em Maharajan et al. (2015), Negro (2015), Vasanthi et al. (2014), Rebelo et al. (2000). Após a identificação foram fotomicrografadas com auxílio de microscópio AXIOSKOP - ZEIS.

Uma quantificação aproximada dos efeitos histopatológicos foi realizada conforme Rebelo et al. (2000), através da contagem do número de lamelas afetadas por cada patologia, em relação ao número total de lamelas em cada brânquia. Uma lamela foi considerada afetada (e, portanto, contada) independente da gravidade da lesão (REBELO et al., 2000). Posteriormente foi realizada uma quantificação conforme Rebelo et al. (2000), que leva em consideração a quantidade de lesões por cada brânquia analisada. A severidade das lesões foi classificada de acordo com Poleksic e Mitrovic–Tutundzic (1994) em estágios I (leve), II (moderado) e III (irreversíveis).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Biometria dos siris das duas áreas analisadas**

Foram capturados 138 indivíduos ao longo de 4 coletas trimestrais; no período chuvoso, entre os meses de janeiro a julho de 2017 obteve-se 79 indivíduos, 28 provenientes da área portuária e 51 da área de referência. Em relação ao período seco, nas coletas de agosto a

dezembro de 2017, foram coletados 59 indivíduos; 25 espécimes da área portuária e 34 da área de referência.

Os espécimes foram capturados com menor esforço na área de referência, e a presença da espécie foi registrada todos os meses do ano na área de referência. Esse registro foi diferente na área portuária, visto que nos meses de fevereiro a abril não houve registro da espécie nas pescarias realizadas. Esses dados são importantes e coincidem com informações da pesca realizada na região de Raposa (MA), visto que os siris são considerados parte da fauna acompanhante da pesca camaroneira (ALVERSON *et al.*, 1994).

Nas tabelas 1 e 2 são mostrados os dados biométricos de exemplares de *C.dannae* analisados sazonalmente (época chuvosa e de estiagem). Com a análise estatística, observou-se que não houve diferenças significativas nas médias nos dados biométricos dos exemplares da primeira coleta (Tab.1). Na segunda coleta do período chuvoso, houve diferenças significativas nas medidas do Peso (Pt), Comprimento da Carapaça (CC) e Largura da Carapaça com Espinho (LCe) (Tab.1).

Tabela 1. Média e Desvio padrão das medidas dos espécimes coletados no período chuvoso.

| Coletas           | Área Portuária |         | Área de referência |         |
|-------------------|----------------|---------|--------------------|---------|
| <b>JAN- MAR</b>   |                |         |                    |         |
| <b>Pt (g)</b>     | 60,99          | ± 22,32 | 85,82              | ± 18,75 |
| <b>CC (cm)</b>    | 4,58           | ± 0,59  | 4,85               | ± 0,34  |
| <b>LCe (cm)</b>   | 10,35          | ± 2,04  | 11,14              | ± 1,40  |
| <b>LPQ (cm)</b>   | 1,55           | ± 0,34  | 1,69               | ± 0,20  |
| <b>LC (cm)</b>    | 7,6            | ± 1,4   | 8,77               | ± 0,50  |
| <b>CQD (cm)</b>   | 5,125          | ± 1,2   | 5,77               | ± 0,47  |
| <b>ARIL – JUN</b> |                |         |                    |         |
| <b>Pt (g)</b>     | 82,80*         | ± 20,16 | 89,43              | ± 10,58 |
| <b>CC (cm)</b>    | 5,0*           | ± 0,34  | 4,73               | ± 0,25  |
| <b>LCe (cm)</b>   | 11,26*         | ± 0,69  | 11,43              | ± 0,54  |
| <b>LPQ (cm)</b>   | 1,57           | ± 0,16  | 1,6                | ± 0,23  |
| <b>LC (cm)</b>    | 9,54           | ± 1,18  | 8,78               | ± 0,43  |
| <b>CQD (cm)</b>   | 5,76           | ± 0,52  | 5,53               | ± 0,69  |

Pt – peso total / CC – comprimento da carapaça/ LCe – comprimento da carapaça com espinho/ LC – largura da Carapaça / CQD – comprimento do quelípode direito/ \* indica uma diferença estatística  $p < 0,05$

Os siris coletados na área de referência apresentam medidas maiores que na área potencialmente contaminada também no último trimestre do período de estiagem, a significância da análise estatística foram registrados para Comprimento da Carapaça-CC, Largura da Carapaça com espinho-LCe, Largura da Carapaça - LC e Comprimento do Quelípede Direito – CQD.

Tabela 2. Média e Desvio padrão das medidas dos espécimes coletados no período de estiagem.

| Coletas          | Área Portuária |           | Área de referência |            |
|------------------|----------------|-----------|--------------------|------------|
| <b>JUL- SET</b>  |                |           |                    |            |
| <b>Pt (g)</b>    | 42             | ± 12,02   | 105,3571           | ±33,23402  |
| <b>CC (cm)</b>   | 3,761          | ± 0,8485  | 5,014286           | ±0,636396  |
| <b>LCe (cm)</b>  | 8,23           | ± 3181    | 11,40714           | ±1,626346  |
| <b>LPQ (cm)</b>  | 1,05           | ± 0,494   | 1,721429           | ±0,212132  |
| <b>LC (cm)</b>   | 7,023          | ± 0,989   | 8,807143           | ±1,202082  |
| <b>CQD (cm)</b>  | 3,838          | ± 1,060   | 6,27143            | ± 0,848528 |
| <b>OUT – DEZ</b> |                |           |                    |            |
| <b>Pt (g)</b>    | 59,41667       | ±4,949747 | 89,470             | ±9192      |
| <b>CC (cm)</b>   | 4,233333*      | ±0,070711 | 4,623              | ±0,353     |
| <b>LCe (cm)</b>  | 9,991667*      | ±0,777817 | 11,147             | ±0,989     |
| <b>LPQ (cm)</b>  | 1,325          | ±0,070711 | 1,652              | ±0,282     |
| <b>LC (cm)</b>   | 7,9*           | ±0,565685 | 8,617              | ±0,848     |
| <b>CQD (cm)</b>  |                | ±0,636396 | 5,564              | ±0,282     |
|                  | 4,55*          |           |                    |            |

Pt – peso total / CC – comprimento da carapaça/ LCe – comprimento da carapaça com espinho/ LC – largura da Carapaça/ CQD – comprimento do quelípede direito / \* indica uma diferença estatística  $p < 0,05$

No início da estiagem as médias não apresentaram diferenças significativas, somente no último trimestre, de outubro a dezembro. Nas áreas cujas coletas foram realizadas esperou-se encontrar os maiores tamanhos, pois os siris juvenis abrigam-se no interior do estuário, e os adultos são encontrados mais próximos ao mar. De um modo geral, esses dados indicam que os siris da área portuária são menores ( $p < 0,05$ ) e menos pesados do que os siris da área de referência. Não existem dados comparativos na literatura para essa espécie no estado do Maranhão. Todavia, dados relacionados com o caranguejo *Ucides cordatus* indicaram o mesmo padrão, com indivíduos menores e menos pesados na mesma área portuária (ANDRADE, 2016).

## 5.2 Atividade enzimática dos siris

Pela atividade da glutathiona-S-transferase (GST) representada no gráfico (Fig. 7), observa-se que os siris oriundos da área de referência apresentaram maior atividade enzimática nos três primeiros períodos de coleta. Porém, na área portuária a atividade da GST foi em todas as coletas 0,00  $\mu\text{mol} / \text{mg}$ , indicando um sistema enzimático exaurido. Esses dados indicam maior ocorrência de contaminação nesse local e, conseqüentemente, mais danos sobre os organismos residentes. Resultados semelhantes foram observados por Carvalho-Neta et al. (2012) para bagres da região portuária da Baía de São Marcos e por Andrade (2016) utilizando como bioindicador *Ucides cordatus*. Nesses dois estudos, os valores muito baixos ou nulos para a atividade da GST foram atribuídos à exaustão do sistema enzimático dos peixes em função de contaminantes químicos e orgânicos na área portuária.

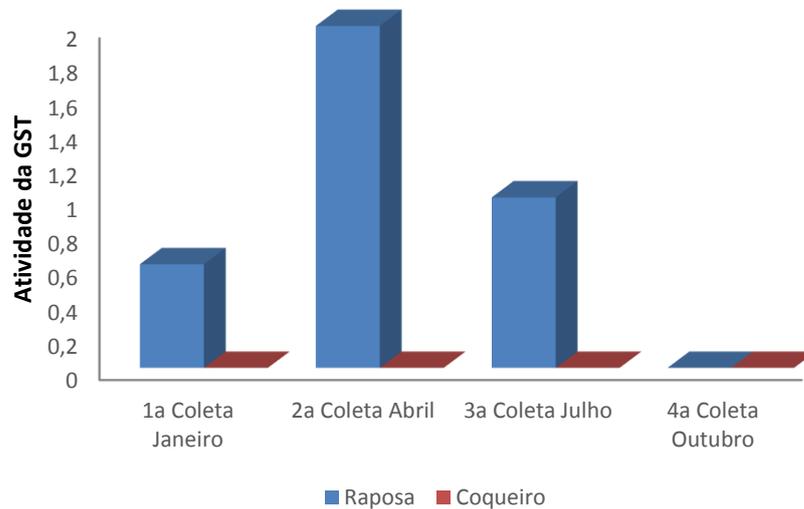


Figura 7 - Atividade da GST nos siris nas áreas portuárias e de referência.

Os níveis de CAT dos siris analisados mostraram-se exauridos na segunda e última coleta da área portuária (Fig.8). O aumento da atividade específica da catalase (CAT) tem sido mencionado como indicador de estresse oxidativo. A intensidade de produção da mesma indica que o organismo apresenta um mecanismo de defesa contra os agentes oxidantes, pois é uma enzima chave para remover peróxido de hidrogênio e evitar a formação de radicais hidroxil que danificam as células (GIULIO et al., 1989; VAN DER OOST et al., 2003).

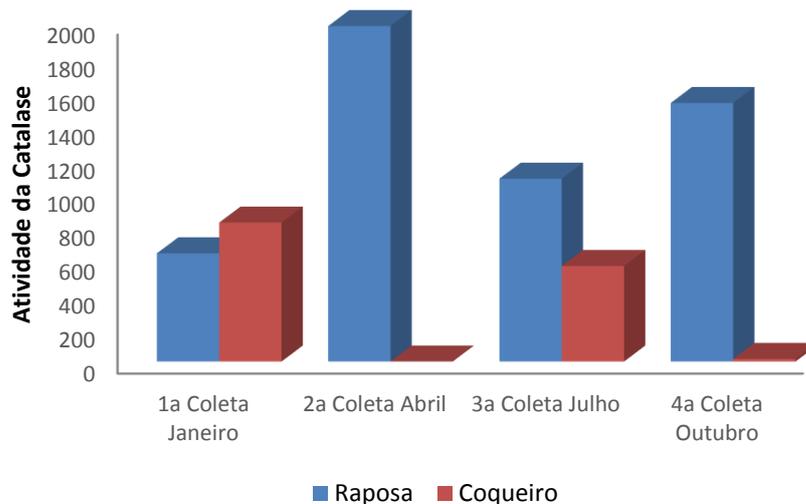


Figura 8 - Atividade da Catalase nos siris nas áreas portuárias e de referência.

Comparando os períodos chuvosos e de estiagem, os níveis de GST e CAT na área de referência foram maiores no segundo trimestre do período chuvoso, provavelmente período em que houve maior índice de pluviosidade. Estudos indicam que no período chuvoso muitos contaminantes podem ser lixiviados para as regiões de manguezais (MMA, 2017).

### 5.3 Histopatologias identificadas nos siris e modelo metodológico

A análise das brânquias dos exemplares coletados indicou a presença de várias alterações morfológicas em indivíduos tanto da área potencialmente contaminada (A1), quanto da área de referência (A2). Os principais tipos de alterações histológicas encontradas foram: hiperplasia, estreitamento lamelar, aneurisma, fusão das lamelas secundárias e descolamento do epitélio das lamelas secundárias (Tab. 3).

Tabela 3: Patologias observadas, fator de importância (w) e percentual de lesões (%) em *Callinectes danae* capturados na área de referência- Raposa (A1) e na área Portuária (A2).

| Órgão            | Alterações                       | % em A1 | % em A2 |
|------------------|----------------------------------|---------|---------|
|                  | Hiperplasia                      | 28,3    | 69,1    |
| <b>Brânquias</b> | Parasitas                        | 10      | 0       |
|                  | Colapso Lamelar                  | 3,65    | 15,7    |
|                  | Inchaço da lamela primária       | 10*     | 50*     |
|                  | Deformação do canal marginal     | 9,8     | 71,41   |
|                  | Rompimento das células pilastras | 60      | 25      |
|                  | Ruptura do canal marginal        | 45      | 12      |
|                  | Deslocamento da cutícula         | 24      | 7,4     |
|                  | Necrose                          | 0       | 0       |

\* percentual calculado do total de brânquias examinadas

Na área de referência as alteração mais comuns foram ruptura do canal marginal (Fig. 9) e deformações nos canais marginais (Fig. 10) dos siris com maiores tamanhos. Em seguida o estreitamento das lamelas ou inchaço nas extremidades próximas ao canal marginal. Estas adaptações contra os distúrbios do ambiente aquático reduzem a área da superfície respiratória ou apresentam sinais de alterações que comprometem as trocas gasosas que ali ocorreriam normalmente, são dificultadas visto o decréscimo na capacidade de difusão podendo levar o animal a asfixia (OJHA, 1999).

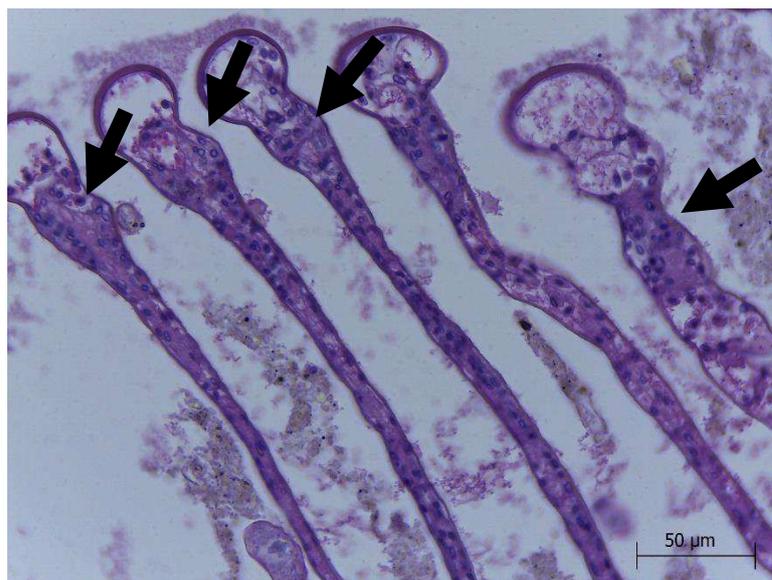


Figura 9 - Fotomicrografia das lamelas secundárias em *C. danae* coletados na área de referência. Setas = inchaço na extremidade próximo ao canal marginal. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

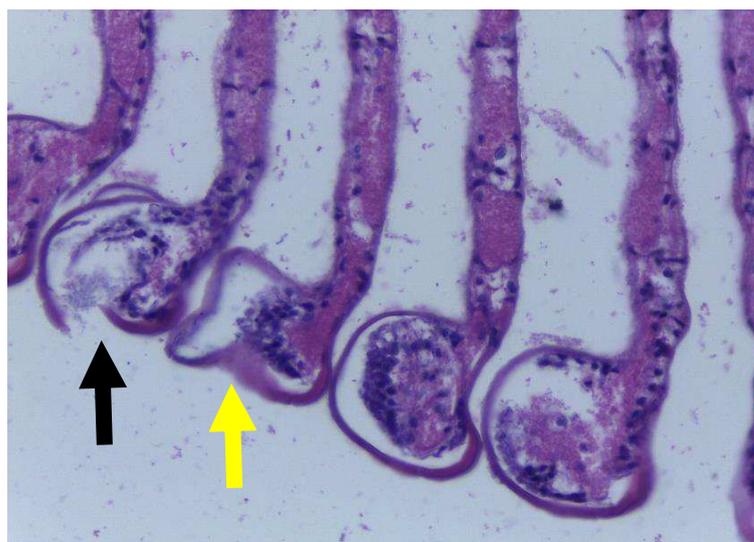


Figura 10 - Fotomicrografia das lamelas secundárias das brânquiais de exemplares de *C. danae* coletados na área de referência. Seta amarela = deformação do canal marginal. Seta preta = rompimento do canal marginal.

Na área portuária ocorreram mais lesões do tipo hiperplasia, colapso lamelar (Fig. 11), aneurismas (Fig. 12), inchaço das lamelas (Fig. 13) nos siris que apresentaram menores tamanhos. Foram observadas alterações vasculares nas lamelas, como aneurismas, estrutura essa que se forma quando os animais estão sob estresse mais severo. Assim, um aumento do fluxo sanguíneo para o interior da lamela ou mesmo a ação direta dos contaminantes pode desestruturar as células pilares ou até mesmo rompê-las, com a liberação de grande quantidade

de sangue, empurrando o epitélio lamelar para fora (HINTON; LAURÉN, 1990), o que pode causar a ruptura do epitélio e consequentemente hemorragia (HEATH, 1987).

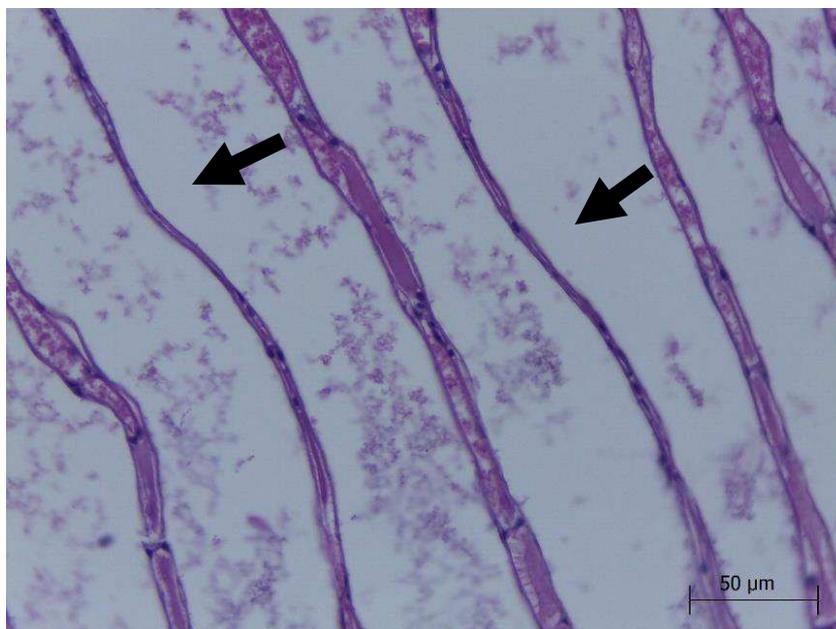


Figura 11 - Fotomicrografia das lamelas secundárias das brânquias de exemplares de *C. danae* coletados na área portuária. Setas = indicam colapso lamelar. Barra = 50 µm.

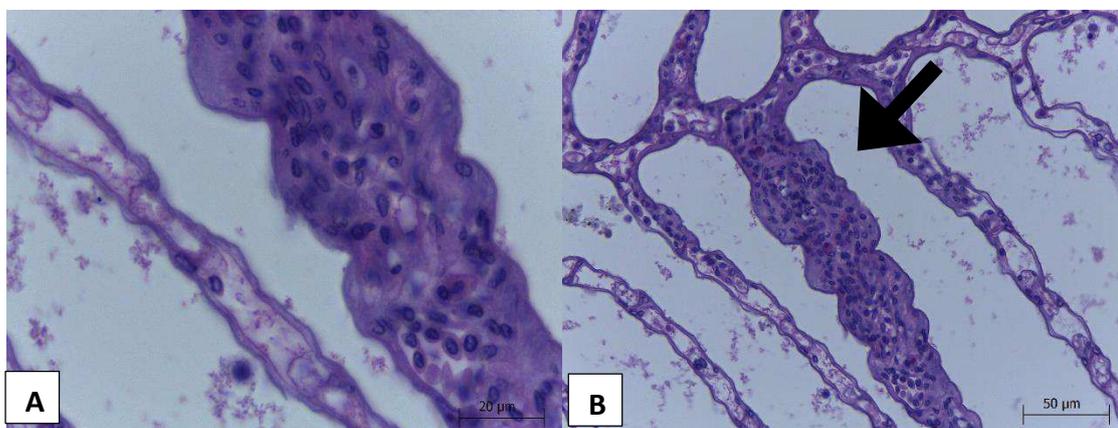


Figura 12 - Fotomicrografia das lamelas branquiais de exemplares de *C. danae* coletados na área portuária. Seta preta= Detalhe de filamentos branquiais mostrando aneurisma em lamelas secundárias. Barra = 20 µm (A).

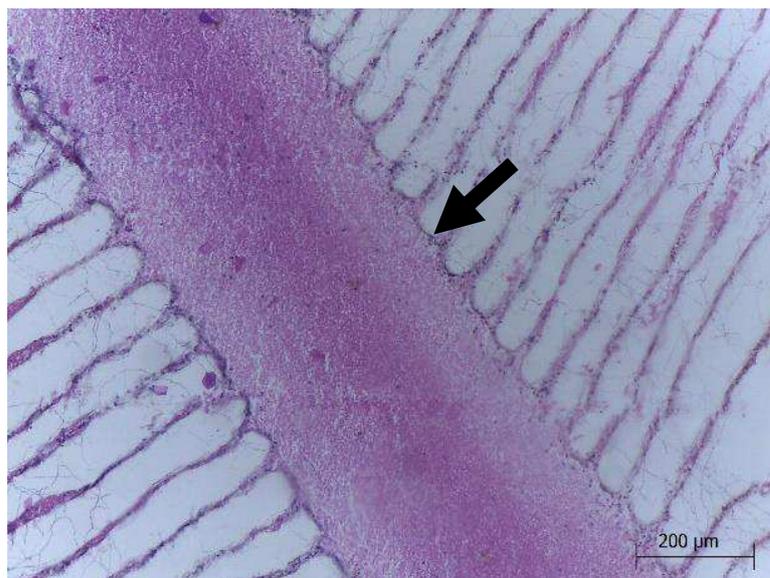


Figura 13 - Fotomicrografia da lamela primária das brânquias de exemplares de *C. danae* coletados na área portuária. Seta preta = inchaço da lamela primária.

O espessamento do epitélio filментар e lamelar ocorre devido à proliferação de células de cloro e de células indiferenciadas (DANG et al., 1999), provavelmente essa lesão é uma resposta adaptativa dos indivíduos para aprimorar as funções branquiais.

De acordo com Poleksic e Mitrovic–Tutundzic (1994), o espessamento do tecido proliferativo filментар e lamelar é uma alteração de estágio II, considerada mais severa e comprometem a função da brânquia; em caso da melhoria da qualidade da água, essas lesões podem ser reparáveis, mas, se o nível de poluição aumentar, podem progredir para o terceiro estágio. As alterações de estágio III não permitem a restauração da estrutura branquial, mesmo em caso de melhoria da qualidade da água.

O levantamento do epitélio lamelar (Fig. 14), alteração classificada como sendo de estágio I, foi encontrada com alta frequência nos exemplares da área portuária. Essas alterações, consideradas lesões leves, permitem a recuperação da estrutura e da função dos tecidos branquiais em caso de melhoria das condições ambientais (POLEKSIC; MITROVIC – TUTUNDZIC, 1994). Esta alteração caracteriza-se pela elevação de uma lâmina contínua do epitélio lamelar para longe do sistema de células pilares, aumentando assim a distância entre o meio externo e o sangue. Ocorre a formação de um espaço que pode ser preenchido por água, podendo levar a formação de um edema ( THOPHON et al., 2003).

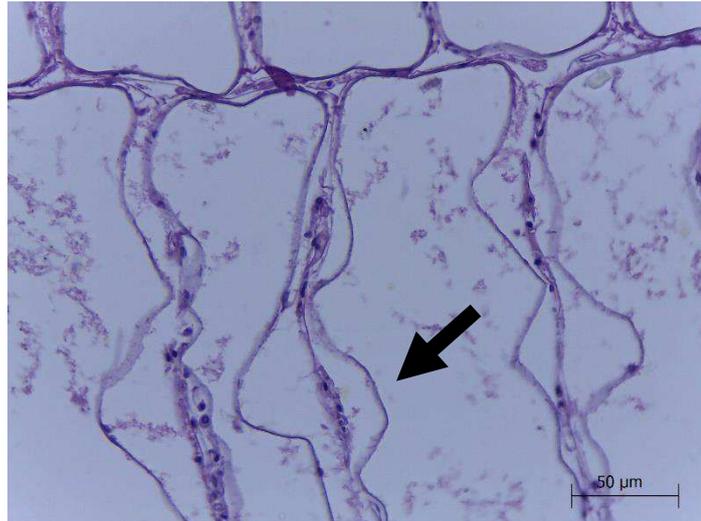


Figura 14 - Fotomicrografia das lamelas secundárias de *C. danae* coletados na área portuária. Seta preta = detalhe de filamentos branquiais mostrando deslocamento da cutícula. Barra = 50 μm

Os parasitos (Fig. 15) foram encontrados somente nos indivíduos coletados na área de referência em um percentual de 10%. Estudos indicam que em áreas ecologicamente equilibradas existe uma relação estreita entre parasito e hospedeiro, especialmente em organismos aquáticos (RICKLEFS, 2005).

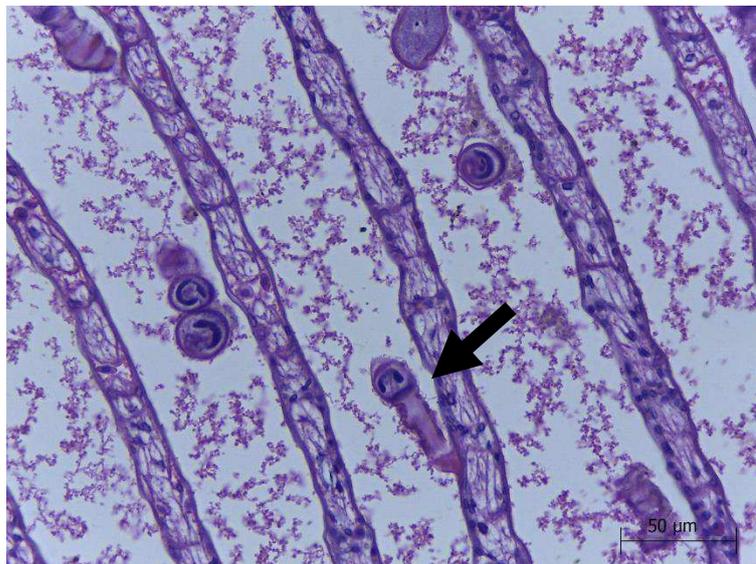


Figura 15- Fotomicrografia das lamelas secundárias de *C. danae* coletados na área portuária. Seta preta = parasito em corte longitudinal. Barra = 50 μm

O modelo metodológico com a combinação de análises de biomarcadores bioquímicos (GST e CAT) e histológicos (lesões branquiais) mostrou que os siris da área portuária apresentam GST nula e várias lesões em todos os estágios de severidade (estágios I, II e III). Esse padrão não foi observado para os siris da área de referência, que apresentaram atividade da GST e lesões branquiais em um estágio leve de severidade.

Esses dados apresentados reforçam a importância do uso das mais diferenciadas metodologias de biomonitoramento com uso de biomarcadores em espécies nativas dos ecossistemas costeiros e estuarinos.

Observa-se que as diferenças observadas nas análises enzimáticas e na biometria dos espécimes da área portuária e área de referência provavelmente são um reflexo do impacto ocasionado por metais pesados e compostos orgânicos a que esta área portuária está submetida. As respostas biológicas alteradas dos siris foram registradas apenas no complexo portuário, em cujas águas e sedimento já foram detectados anteriormente vários poluentes acima dos níveis permitidos pela legislação ambiental brasileira (CARVALHO-NETA et al., 2012). Portanto, o presente trabalho contribui com informações relevantes sobre o uso de biomarcadores bioquímicos em siris *C.danae* para esta área. Corroborar também com uma abordagem integrada, rápida, sensível, e relativamente barata para o monitoramento de manguezais a partir de uma espécie nativa com acentuada importância ecológica e econômica.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho com *C. danae* permitiram concluir que:

- A atividade da Glutathione-S-Transferase (GST) e da Catalase (CAT) em *C. danae* indicou que esses biomarcadores bioquímicos diferenciaram os siris das duas áreas analisadas, indicando que a área portuária apresenta maiores impactos sobre essa espécie;
- as lesões branquiais identificados em *C. danae* foram mais frequentes na área portuária, especialmente hiperplasia, colapso lamelar, aneurismas e inchaço das lamelas.
- os dados biométricos comparados com os resultados dos biomarcadores histológicos indicaram que os siris com lesões branquiais mais frequentes na área de referência eram maiores do que os siris da área portuária;
- o modelo metodológico com a combinação de análises de biomarcadores bioquímicos (GST e CAT) e histológicos (lesões branquiais) mostrou que os siris da área portuária apresentam GST nula e várias lesões em todos os estágios de severidade;
- a utilização de lesões branquiais em espécies nativas como biomarcadores de contaminação aquática podem ajudar na avaliação mais criteriosa da qualidade ambiental, com um baixo custo e rapidez;
- atividade enzimática, biometria e histologia foram sensíveis, indicando respostas biológicas com alterações nos siris, tornando esta abordagem adequada para o monitoramento ambiental sem a pretensão de quantificar o acúmulo de poluentes.

## REFERÊNCIAS

ALBINATI, A.C.L., MOREIRA, E.L.T., ALBINATI, R.C.B., CARVALHO, J.V., LIRA, A.D. DE, SANTOS, G.B., VIDAL, L.V.O. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 61, p. 621-627, 2009.

ALMEIDA, E.A., BAINY, A.C.D., DAFRE, A.L., GOMES, O.F., MEDEIROS, M.H.G., DI MASCIO, P. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n. 318, p. 21-30, 2005.

ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, p.62-72, 1999.

ALVES, C.S.; KUHNERT, D.C.; SAVED, Y.; DIRR, H.W. The intersubunit lock-and-key motif in human glutathione transferase A1-1: role of the key residues Met51 and Phe52 in function and dimer stability. **Biochemical Journal**, n. 15, p. 523-528, 2006.

ANDRADE, T.S.O.M Biomarcadores em caranguejo uçá (*Ucides cordatus*) para monitoramento ambiental em áreas portuárias. Universidade Estadual do Maranhão, 2016. **Dissertação** (Mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca). 2016.

ANKLEY, G.T; JOHNSON, R.D. Small Fish Models For Identifying and Assessing the Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, n. 45, p. 469-483, 2004.

BAINY, A.C.D; SAITO, E.; CARVALHO, P.SM.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gills, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site **Aquatic Toxicology**, n. 34, p. 151-162, 1996.

BAPTISTA, DF, BUSS, DF; EGLER, M. Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F., and MOREIRA, J C., orgs. **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. p. 157-175, 2003.

BAZANA, E.; JABER, M. Y.; ZANONIB, S. A review of mathematical inventory models for reverse logistics and the future of its modeling: An environmental perspective. **Applied Mathematical Modelling**, v. 40, p. 4151–4178, 2016.

BOESCH, D.F, SCHUBEL, J.R., BERNSTEIN, B.B, EICHBAUM, W.M., GARBER, W., HIRSCH ,A., HOLLAND, A.F., JOHNSON, K.S., O´CONNOR, D.J., SPEER,L ;WIRESMA, G.B. **Managing Troubled Waters: The Role of Marine Environmental Monitoring** Committee on a Systems Assessment of Marine Environmental Monitoring, National Research Council. National Academy Press. Washington, D.C.USA.125pp. 1990.

BONILLA-VALVERDE, D., RUIZ-LAGUNA, J., MUÑOZ, A., BALLESTEROS, J., LORENZO, F., GÓMEZ-ARIZA, J.L., LÓPEZ-BAREA, J. Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers.**Toxicology**, v. 197, p. 123–138, 2004.

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. **Environmental Health Perspective**, v. 105, suppl. 1, p. 21-35, 1997.

BRASIL. **Resolução CONAMA** nº 267/ 2000 – “Proibição de substâncias que destroem a camada de ozônio”. Data da legislação: 14/09/2000- Publicação DOU nº 237, de 11/12/2000.

BRASIL, 2005. *Resolução nº. 357*. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Brasília, Diário Oficial da União, 17 de março de 2005.

BRUSCA, R.C. & G.J. BRUSCA. **Invertebrados**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2007.

BURGER, J.; GOCHFELD, M. On developing bioindicators for human and ecological health. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 66, p. 23– 46, 2001.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F. & NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 465-474, 2003.

CAMARGO, M.M.P. & MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology Pharmacology**.v 21, p. 61-69, 2006.

CARVALHO-NETA, RNF., SOUSA, DBP., ALMEIDA, ZS., SANTOS, DMS., TCHAICKA, L. A histopathological and biometric comparison between catfish (*Pisces, Ariidae*) from a harbor and a protected area, **Brazil Aquatic Biosystems**, n.10, 12, 2014.

CARVALHO-NETA, R.N.F.; TORRES JR., A.R.; ABREU-SILVA, A.L. Biomarkers in Catfish *Sciades herzbergii* (Teleostei: Ariidae) from Polluted and Non-polluted Areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, p.1-12, 2012.

CARVALHO-NETA, Raimunda Nonata Fortes; ABREU-SILVA, Ana Lúcia. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: an in situ study of an estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**. São Paulo, v. 58, n.4, p. 11-17, 2010.

CAIRNS Jr., J.; McCORMICK, P. V.; NIEDERLEHNER, B. R. A proposal framework for developing indicators of ecosystem health. **Hydrobiologia**, n.263 ,p.1-44. 1993.

CLARK, A.G. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-invertebrates organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**. n.92, p. 419-446, 1989.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo: Cetesb, 2005.

COSTANZA, R., R. D'ARGE, R. DE GROOT, S. FARBERK, M. GRASSO, B. HANNON, K. LIMBURG, S.NAEEM, R.V. O'NEILL, J. PARUELO, R.G. RASKIN, P. SUTTON, AND M. VAN DEN BELT. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature** n. 387, p.253-260, 1997

COSTANZA, R., DE GROOT, R., SUTTON, P., VAN DER PLOEG, S., ANDERSON, S. J.KUBISZEWSKI, I., FARBER, S., AND TURNER, R. K. Changes in the global value of ecosystem services. **Global Environmental Change**, n. 26,p.152–158. 2014.

DANG, Z.; LOCK, R.; FLIK, G. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. **Am. Journal Physiology**, v.277, p.320-331, 1999.

DALZUCHIO, T., RODRIGUES, G.Z.P., PETRY, I.E. . GEHLEN, G; SILVA, L.B. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review.**International Aquatic Research**, n. 8, p.283–298, 2016.

DE GRAVE, S.; PENTCHEFF, N. D.; AHYONG, S. T.; CHAN, T. Y.; CRANDALL, K. A.; DWORSCHAK, P. C.; FELDER, D. L.; FELDMANN, R. M.; FRANSEN, C. H. J. M.; GOULDING, L. Y. D.; LEMAITRE, R.; LOW, M. E. Y.; MARTIN, J. W.; NG, P. K. L.; SCHWEITZER, C. E.; TAN, S. H.; TSHUDY, D. & WETZER, R. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. **Raffles Bulletin of Zoology**, n.21, p.1-109, 2009.

DE GROOT, R.S., KUMAR, P., VAN DER PLOEG, S., SUKHDEV, P. Estimates of monetary values of ecosystem services. In: Kumar, P. (Ed.), **The Economics of Ecosystems and Biodiversity: Ecological and Economic Foundations**. Earthscan, London, 2010.

DIEGUES, Antonio Carlos. **Ecologia humana e planejamento costeiro**. 2.ed, São Paulo:NUPAUB, 2001.

DI GIULIO, W.H.; BENSON, B.M.; SANDERS, P.A.; VAN VELD. a. biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. RAND, G. M. (ed.) 2ed. USA: Taylor & Francis, 1995.

EL-ROBRINI, M.; MARQUES J. V; SILVA , M. A. M. A.; El-Robrini, M. H. S.; FEITOSA , A. C. ; TAROUCO , J. E. F. ; SANTOS , J. H. S. Maranhão. In: MUEHE, D. (Org.). **Erosão e progradação do litoral brasileiro: Maranhão**. Brasília: MMA. 2006. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=publicacao.publicacoesPorSecretaria&idEstrutura=78>> Acesso em 05/09/ 2017.

EMAP. **Relatório de Impactos Ambientais.2017**. Disponível em: <[http://www.emap.ma.gov.br/\\_files/arquivos/Agenda\\_Ambiental\\_Institucional\\_do\\_Porto\\_do\\_Itaqui\\_04.08.2017.pdf](http://www.emap.ma.gov.br/_files/arquivos/Agenda_Ambiental_Institucional_do_Porto_do_Itaqui_04.08.2017.pdf)>

EMAP.**Imprensa**.2016. Disponível em: <<http://www.emap.ma.gov.br/imprensa/noticia/porto-do-itaqui-geracao-de-riqueza-para-o-ma>> Acesso em: 23/08/2017

ERKMEN, B., KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bulletin of the Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 418-425, 2000.

FERREIRA, A. J.A. Políticas Territoriais e a Reorganização do Espaço Maranhense. São Paulo: USP, 2008. **Tese de Doutorado**. 269 f.

FERREIRA, C.M. Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds). **Sanidade de organismos aquáticos**. p.273-284. São Paulo: Varela, 2004.

FERREIRA, M. S.; MÁRSICO, E.T., CONTE JUNIOR, C. A., MARQUES JÚNIOR, A. N.; MANO, S. B.; CLEMENTE, S. C. (2013). Contaminação por metais traço em mexilhões Perna perna da costa brasileira. *Ciência Rural*, n. 43, p. 1012-1020, 2013.

FERES, S. J. C.; LOPES, A.T,L.L. ; SANTOS, L. A. Primeiro registro de *Charybdis helleri* (Milne Edwards, 1867) para o litoral maranhense – Brasil (Crustacea, Decapoda, Portunidae). **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, n.20, p.77-82, 2007.

FORNASARI FILHO, N.; COELHO, L. R. *Aspectos ambientais do comércio internacional*. Fiesp-Ciesp, dez. 2002.

FRUGOLI, J.A.; ZONGH, H.H.; NUCCIO, M.L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; MCCLUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) **Plant Physiology**. n112, p. 327-336, 1996.

GOVERNO DO MARANHÃO. Agência de Notícias. Desenvolvimento. **Com superávit US\$ 108,2 milhões, balança comercial maranhense tem melhor resultado desde 2008. Publicado em 13.02.2017 Acesso: 23/08/2017. Disponível em:** <<http://www.ma.gov.br/agenciadenoticias/desenvolvimento/com-superavit-us-1082-milhoes-balanca-comercial-maranhense-tem-melhor-resultado-desde-2008>>

GOWLAND, B.T.G., MOFFAT, C.F., STAGG, R.M., HOULIHAN, D.F., DAVIES, I.M. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. **Marine Environmental Research**. 54, p. 169-177, 2002.

GUERREIRO, G.; DI FINIZIO, A.; CIARCIA, G. Stress-induced changes of plasma antioxidants in aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. n. 132: p. 205-211, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3º ed. Oxford, Oxford University Press, 936p, 2005.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology**. p. 537-556, 2002.

HINTON, D.E.; LAUREN, D.J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **In: S. M. ADAMS (Ed) Biological Indicators of Stress in Fish**. Bethesda, Maryland: american fisheries society symposium. p.51-66. 1990

HODGSON, E. & GOLDSTEIN, J.A.. Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics. **In: HODGSON, E. & SMART, R.C. (eds) Introduction to biochemical toxicology**. 3rd ed. New York, Wiley-Interscience, p. 67-113. 2001

JIMENEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. **In: Adams, S.M. (Ed.). Biological Indicators of Stress in Fish**. Bethesda: American Fisheries Symposium, p. 67-69, 1990.

KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B.. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **Journal Biological Chemical**. n.251, p. 6183-6188. 1976

KITZMANN, Dione; ASMUS, Milton. **Gestão ambiental portuária: desafios e possibilidades**. Revista de Administração Pública, Rio de Janeiro , v. 40, n. 6, p. 1041-1060, Dec. 2006.

KLUMPP, A. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. **In: MAIA, N.B.; MARTOS, H. L.; BARRELLA, W. (Org.). Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: EDUC – Editora da PUC. p. 77-94. 2001.

LACROIX, Maria de Lourdes Lauande. **A Fundação Francesa de São Luís e seus Mitos**. 3. ed. São Luís: Editora UEMA, 2008.

LABTRANS. **Plano Mestre Porto do Itaqui**. Elaboração: Laboratório de Transporte e Logística. Florianópolis – SC: UFSC, 2012.

LABTRANS. Cooperação técnica para apoio à sep/pr no planejamento do setor portuário Brasileiro e na implantação dos projetos de inteligência logística plano mestre – porto do itaquí Florianópolis – SC, MAIO DE 2015

LACKNER, R.. “Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (eds.) **Fish ecotoxicology**. Basel, Switzerland, **Birkhäuser Verlag**, p. 203-224. 1998

LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S. M.. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v.8, n.4, p. 469-484, out./dez. 2010.

LOPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. n. 399, p. 3–15, 1998.

LUPI, C. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **R. Fafibe On Line**, n.3, p.1-3, 2007.

MADRUGA, A.M. Litoralização: da busca da liberdade ao consumo autofágico. **Dissertação** (mestrado). FFLHC/USP- São Paulo, 1992.

MAHARAJAN, A; NARAYANASAMY, Y.; GANAPIRIYA, V; SHANMUGAVEL, K. Histological alterations of a combination of Chlorpyrifos and Cypermethrin (Nurocombi) insecticide in the fresh water crab, *Paratelphusa jacquemontii* (Rathbun). **The Journal of Basic & Applied Zoology**. n72. P.104-112, 2015

MAHARAJAN, A. GANAPIRIYA, V. SHANMUGAVEL, K. Histology Biomarkers in Muscle and Ovary of Mangrove Crab, *Perisesarma bidens* Exposed to Profenofos. **International Journal of Biomedical Science and Engineering**. Vol. 5, pp. 1-8.No. 1, 2017

MALTCHIK, L.; MEDEIROS, E. S. Does hydrological stability influence biodiversity and community stability? A theoretical model for lotic ecosystem from Brazilian semiarid region. **Ciência e Cultura**, 53:44-48. 2001.

MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E.U. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura, Jaboticabal – S.P: **Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática**, 81-95, 2006.

MARKERT, B.A., BREURE, A.M., AND ZECHMEISTER, H.G. Definitions, Strategies, and Principles for Bioindication. In: **Biomonitoring of the Environment**. Markert, B.A., Breure, A.M., and Zechmeister, H.G., (eds.) Elsevier, Oxford. pp. 3-39. 2003.

MCGEOCH, M.; RENSBURG, B.J.; BOTES, A. The verification and application of bioindicators: A case study of dung beetles in a savanna ecosystem. **Journal of Applied Ecology** **39**: 661–672p.2002.

MEIRELES, Mario Martins. **França Equinocial**. – São Luís, SECMA, Civilização Brasileira -, Rio de Janeiro, 1982

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

.METCALFE, J. L. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrates communities: history and present status in Europe. **Environmental Pollution**, 60:101-139, 1989.

MEYERSON, L. A.; MOONEY, H. A. Invasive alien species in an era of globalization. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 4, p. 199-208, 2007.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Termo de referência para seleção de propostas para a elaboração de informes sobre espécies exóticas invasoras**. Brasília, DF: Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2003.

MORAES, A.C.R. **Contribuições para a gestão da zona costeira do Brasil**: elementos para uma geografia do litoral brasileiro. São Paulo: Annablume, 2007.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições pré-disponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TEC ART. p.343-386. 2004.

MOUILLOT, D.; CULIOLI, J.M.CHEL; CHI, T.D. Indicator species analysis as a test of non-random distribution of species in the context of marine protected areas; **Environmental Conservation** **ember**.n 29(3): 385-390 p. 2002

MYERS, M.S.; JOHNSON, L.L.; OLSON, O.P.; STHER, C.M.; HORNESS, B.H.; COLLIER, T.K., MCCAIN, B.B. Toxicopathic hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the northeast Pacific Coast, USA. **Marine Pollution Bulletin**. 37, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Priorities for Coastal Ecosystem Science**. Committee to Identify High-Priority Science to Meet National Coastal Needs, National Academy Press, Washington D.C, 1994

NATIONAL ACADEMY PRESS (NAP). The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. **Effective Monitoring to Evaluate Ecological Restoration in the Gulf of Mexico**. Washington, DC: 2017.

NUGEO, Núcleo Geoambiental –Regiões Hidrográficas do Maranhão – 2009. <[http://www.nugeo.uema.br/?page\\_id=233](http://www.nugeo.uema.br/?page_id=233)> Acesso em : 02.10.2017

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Declaração de Estocolmo sobre o Ambiente Humano (**Declaração de Estocolmo**), adotada de 5 a 16 de junho de 1972.

PAOLETTI, M. G. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. **Agriculture, Ecosystems and Environmental** .n.74, p. 1–18. 1999.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. 2.ed. Rio de Janeiro: Interciência,. 631p. 2009.

PINHEIRO-SOUSA, D. B.; ALMEIDA, Z. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes), to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 305-312, 2013.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. **In: MULLER, R.; LLOYD, R. (Ed.).** Sblethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: FISHING NEWS BOOKS, p.339-352. 1994

PORTO, M. M.; TEIXEIRA, Sérgio Grein. **Portos e Meio Ambiente**. São Paulo: Aduaneiras, 2002

RASHED, M.N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**. vol.27P :27–33.2001

REZENDE, C.E.; LACERDA, L.D. Metais pesados em mexilhões Perna perna no litoral do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira Biologia**, v. 46, p. 239-247, 1986.

SHEEHAN, D.; & MEADE, G.; M. FOLEY, V.; DOWD, C.. Structure, function and evolution of glutathione transferases: Implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **The Biochemical journal**. 360. 1-16.2001

SILVA, Q.D. **Mapeamento Geomorfológico da Ilha Do Maranhão**. UNESP, 2012.

SILVA J. S. V.; FERNANDES F. C.; LARSEN K. T. S.; SOUZA R. C. C. L. Água de lastro ameaça aos ecossistemas. **Revista Ciencia Hoje**, n. Vol. 32, N 188, p. 38-43, Novembro, 2002.

SILVEIRA, M. I.; SCHAAN, D. P.2005 Onde a Amazônia encontra o mar: Estudando os Sambaquis do Pará. **Revista de Arqueologia** 18: 67-79. 2005

SOUSA, D.B.P.; ALMEIDA, Z.S.; CARVALHO-NETA, R.N.F.. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da Costa Maranhense, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** , Belo Horizonte , v. 65, n. 2, p. 369-376, Apr. 2013

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical the biological Research**.. 96:1715-1733, 1996.

STEGEMAN, J.J., BROUWER, M., DI GIULIO, R.T., FÖRLIN, L., FOWLER, B.A., SANDERS, B.M., VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr, P.M., Bergman, H.L. (Eds.), **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 235-335. 1992.

TAISSOUN, N. E. Los cangrejos de la familia "Portunidae" (Crustaceos Decapodos Brachyura) en el occidente de Venezuela. **Boletin del Centro de Investigaciones Biologicas**. 1973.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**. v. 121, p. 307 – 320, 2003.

VAN DER OOST R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VENTURA, E. C., GAELZER, L. R., ZANETTE, J., MARQUES, M. R. F., BAINY, A. C. D.. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three estuaries of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**. 54: 775-779. 2002

VELEZ, C., FIGUEIRA, E., SOARES, A.M.V.M., FREITAS, R.. Accumulation and sub-cellular partitioning of metals and As in the clam *Venerupis corrugata*: different strategies towards different elements. **Chemosphere** 156, 128–134. 2016

VIKAS, M; DWARAKISH, G.S. Coastal Pollution: A Review, In Aquatic Procedia, Vol. 4, , Pages 381-388 p. 2015 ISSN 2214-241X, <https://doi.org/10.1016/j.aqpro.2015.02.051>.

WARREN, R. E. Predictive modelling in archaeology: a primer. In: Green, Allen & Zubrow (editors) **Interpreting Sapce: GIS and archaeology London: Taylor & Francis**. p.90-111, 1990.

WASHINGTON, H.G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Research**, v.18, p.653-694, 1984.

WILLIAMS, C. Combating marine pollution from land-based activities: Australian initiatives. **Ocean and Coastal Management**. n.33, p. 87–112. 1996

WINSTON, G. W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 100, p. 173-176, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva; 1993.