



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
MESTRADO EM RECURSOS AQUÁTICOS E PESCA

**TICIANNE DE SOUSA DE OLIVEIRA MOTA ANDRADE**

**BIOMARCADORES EM CARANGUEJO UÇÁ (*Ucides cordatus*) PARA  
MONITORAMENTO AMBIENTAL EM ÁREAS PORTUÁRIAS**

**São Luís – MA**

**2016**

**TICIANNE DE SOUSA DE OLIVEIRA MOTA ANDRADE**

**BIOMARCADORES EM CARANGUEJO UÇÁ (*Ucides cordatus*) PARA  
MONITORAMENTO AMBIENTAL EM ÁREAS PORTUÁRIAS**

Dissertação de mestrado apresentada em  
cumprimento às exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca  
da Universidade Estadual do Maranhão.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata  
Fortes Carvalho-Neta

**São Luís – MA**

**2016**

Andrade, Ticianne de Sousa de Oliveira Mota.

Biomarcadores em caranguejo uçá (*Ucides cordatus*) para monitoramento ambiental em áreas portuárias / Ticianne de Sousa de Oliveira Mota Andrade. – São Luís, 2016.

151f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta.

1. Crustáceo. 2. Dados biométricos. 3. Alterações branquiais. 4. Glutathione-S-Transferase. 5. Catalase. 6. Modelo preditivo. I. Título.

CDU 639.518:57.087.1

**TICIANNE DE SOUSA DE OLIVEIRA MOTA ANDRADE**

**BIOMARCADORES EM CARANGUEJO UÇÁ (*Ucides cordatus*) PARA  
MONITORAMENTO AMBIENTAL EM ÁREAS PORTUÁRIAS**

Dissertação de mestrado apresentada em  
cumprimento às exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da  
Universidade Estadual do Maranhão.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca examinadora**

---

Profª. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta (Orientadora)  
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

---

Profª. Dra. Natilene Mesquita Brito  
Instituto Federal do Maranhão (IFMA)  
2º Examinador

---

Profª. Dra. Débora Martins Silva Santos  
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)  
3º Examinador

---

Prof. Dr. Tiago Moraes Lenz  
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)  
4º Examinador

“Nunca suprima um pensamento generoso”  
(Camilla Kimball).

“Somos seres espirituais passando por uma  
experiência humana” (Thomas S. Monson).

Dedico este trabalho à minha família e amigos que muito contribuíram para a realização desta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu querido Pai Celestial por saber exatamente quem eu sou e por ser o meu alicerce nesse processo de aperfeiçoamento contínuo, chamado: Vida!

Aos meus queridos pais, César e Rosa, que sempre me ofereceram tudo que tinham e por nunca terem reduzido a nossa vida a “possuir coisas”! Eu os amo muito por isso! Vocês são minha inspiração!

Aos meus irmãos: Hilanna, André e Cecília. E minha sobrinha: Kimberly. Obrigada por estarem sempre comigo! Vocês são verdadeiros tesouros para mim! NEOQEAV!

À meu marido Gustavo, que sempre me dá asas para voar! Obrigada por teu apoio espiritual, emocional, operacional e financeiro! Nesses 12 anos você tem sido uma benção em minha vida! Eu amo você!

À meu filho, Benjamim. Que tão orgulhosamente me reconhece como “pesquisadora de caranguejo”. Filho, como eu te amo! Você é a minha maior realização!

À minha querida orientadora, Raimunda Fortes. Obrigada pelos ensinamentos e pelas grandes oportunidades ao longo desses anos de amizade! Foram experiências inesquecíveis!

À minha querida turma (PPGRAP 2015): Adriana, Cássia, Draytiane, Gleison, Giuliana, Jonatas, Marcelo, Rayssa e Wangner. Obrigada pela amizade e companheirismo. Vocês tornaram esse caminho mais doce e alegre! Obrigada pela oportunidade de atuar como representante estudantil! Aprendi muito com esta experiência! Gleison e Jonatas, vocês foram especiais nessa jornada, jamais esquecerei o quanto vocês contribuíram para a produção desta pesquisa!

Às minhas queridas amigas e companheiras de pesquisa, Wanda Batista e Eliane Ribeiro. Obrigada por tudo!

À toda a equipe do Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos – LABOAQ e do Grupo pesquisa em Ecotoxicologia e Monitoramento de Ambientes Aquáticos –

GPMAAq. Obrigada pelo suporte nos trabalhos de campo e laboratório! Vocês são grandes pesquisadores!

À “Seu Norato”, catador de caranguejo e “Seu Ribamar”, pescador. Obrigada por todos os ensinamentos que me levaram além dos livros e artigos!

Ao professor Donald Nelson da *University of Georgia* (USA) e suas orientandas, Ashley Block (*in memoriam*), Emily Horton e Shelly Biesel. Muito obrigada por tudo! Aprendi muito com vocês! Foi uma experiência fantástica! Querida Ashley, foi uma honra conhecer você nesta vida!

*To Professor Donald Nelson from University of Georgia (USA) and his students Ashley Block (in memoriam), Emily Horton and Shelly Biesel. Thank you for everything! I've learned a lot from you all! It was a fantastic experience! Dear Ashley, It was an honor to meet you in this life!*

À minha querida amiga, Vanessa Swenson, por ter sido uma verdadeira irmã durante meu intercâmbio na *University of Georgia*. Você, sem dúvidas, foi o meu anjo da guarda!

*Dear friend Vanessa Swenson, you were a sister to me during my exchange at University of Georgia. You were my guardian angel!*

À minha querida *host family*, Debbie e Scott Johnson. Obrigada por me receberem tão bem e me deixarem fazer parte da sua linda e feliz família!

*Dear host Family, Debbie and Scott Johnson. Thank you for has received me so well and let me be part of your beautiful and happy family!*

Às minhas queridas professoras de inglês, Darcy Souza e Peggy Pollonos. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e amizade!

*Dear english tutors, Darcy Souza and Peggy Pollonos. Thank you so much for teaching, patience and friendship!*

À FAPEMA pelo financiamento desta pesquisa, e pela oportunidade de estágio internacional.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.



À UEMA e ao PPGRAP por me proporcionarem um ensino de alta qualidade, com oportunidades internacionais. Lembrando que enquanto aluna de pós-graduação, o meu compromisso com o programa só será concluído após a publicação dos meus resultados.

À direção do PPGRAP por cuidarem de tudo com tanto zelo e profissionalismo.

Aos professores do PPGRAP, em especial, Raimunda Fortes, Audálio Torres, Zafira Almeida, Débora Santos, Carlos Riedel, Erivânia Teixeira, Lígia Tchaicka, Verônica Oliveira e Marina Figueiredo. Obrigada por todos os ensinamentos!

Às professoras Natilene Brito e Débora Santos, e ao professor Tiago Lenz por suas valorosas contribuições nesta dissertação.

À todos que em algum momento contribuíram para a conclusão desta etapa! MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

Neste estudo objetivou-se comparar biomarcadores bioquímicos (enzimas hepáticas) e morfológicos (lesões branquiais) em *Ucides cordatus* para obtenção de um modelo preditivo de efeitos antrópicos em uma área portuária da Ilha de São Luís-MA. Inicialmente realizou-se um levantamento bibliográfico sobre o uso de biomarcadores em crustáceos para o monitoramento de áreas portuárias. E após esta etapa, os caranguejos foram amostrados bimestralmente em dois manguezais: área portuária na Baía de São Marcos (área potencialmente contaminada) e Ilha de Facão na Baía de São José (área de referência). Foram anotados os dados biométricos como largura (LC) e comprimento da carapaça (CC), comprimento do própodo quelar (CPQ) e peso total (PT). Amostras de hepatopâncreas (biomarcador bioquímico) e brânquias (biomarcador morfológico) foram extraídas ainda em campo e analisadas em laboratório. As brânquias foram desidratadas em uma série crescente de álcoois e incluídas em parafina. Em microscopia de luz, as alterações foram identificadas e quantificadas. 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). O modelo preditivo dos efeitos dos impactos ambientais em *U. cordatus* foi estruturado pela comparação dos biomarcadores avaliados, através do ajuste de polinômios de terceira ordem, utilizando-se o método dos mínimos quadrados. O nível de significância considerado foi de 0,05. A análise bibliográfica mostrou que biomarcadores bioquímicos em caranguejos foi a metodologia mais utilizada e revelou-se muito eficiente para o monitoramento de áreas portuárias. Os resultados das análises de campo e de laboratório indicaram que os caranguejos da área de referência são maiores e mais pesados do que os caranguejos da área portuária. Quanto às lesões branquiais, uma maior quantidade de alterações, bem como lesões branquiais graves (somente) foram registrada para a área portuária. A atividade enzimática também apresentou esse mesmo padrão para a GST, em que a maior atividade desta enzima (assim como valores muito baixos, e até nulos) foi registrada nos caranguejos capturados na área portuária. Por outro lado, a atividade da CAT não mostrou diferença significativa entre as áreas, indicando que as especificidades da atividade desta enzima nos caranguejos da ilha de São Luís, ainda não são claras. Ao relacionar a biometria com a atividade da GST para os caranguejos da área portuária, verificou-se uma relação inversamente proporcional entre o PT e a atividade da enzima. Por fim, o modelo matemático indicou que a atividade da enzima aumenta até surgirem lesões graves. Após um limite, a atividade da GST diminui drasticamente para níveis muito baixos (ou até mesmo nulos) que leva a lesões irreversíveis (colapso da lamela).

**Palavras-chave:** Crustáceo; Dados Biométricos; Alterações branquiais; Glutathiona-S-Transferase; Catalase; Modelo preditivo.

## ABSTRACT

This study aimed to compare biochemical biomarkers (hepatic enzymes) and morphological (brachial lesions) in *Ucides cordatus* to obtain a predictive model of anthropic effects in a port area of São Luís-MA. Initially an extensive bibliographic survey was conducted on the use of crustacean biomarkers to monitor port areas. After this crabs were sampled bimonthly in two mangroves: port area at São Marcos Bay (potentially contaminated area) and Facão Island at São José Bay (reference site). Biometric data were recorded, such as width (LC) and carapace length (CC), length of chelate propodus (CPQ) and total weight (PT). Hepatopancreas samples (biochemical biomarker) and gills (morphological biomarker) were also extracted in the field and analyzed in the laboratory. The gills were dehydrated on a crescent series of alcohols and embedded in paraffin. In light microscopy, the changes were identified and quantified. Samples hepatopancreas were homogenized in phosphate buffer and centrifuged, and the supernatant used for determining the enzymatic activity of glutathione-S-transferase (GST), and catalase (CAT). The predictive model of the effects of environmental impacts in *U. cordatus* was structured by comparing the biomarkers through the adjustment of third order polynomials, using the least squares method. The significance level was 0.05. The bibliographic analysis showed that biochemical biomarkers in crabs was the methodology most used and it proved to be very effective for monitoring port areas. The results field and laboratory analysis indicate that crabs from reference site are biggest and heavier than crabs from port area. As the brachial lesions, a larger amount of change as well as serious injury brachial (only) were registered for the port area. Enzyme activity also showed the same pattern for GST whereby increased activity (as well as very low values, and even null) was recorded in crabs caught in the port area. Conversely, CAT activity showed no significant difference between areas, indicating that the specific activity of this enzyme in crabs from São Luis Island, are not clear yet. When relating biometrics data with GST activity, crabs from port area it was found an inverse relationship between PT and GST activity. Finally, the mathematical model indicated that the enzyme activity increases until there are serious injuries. After threshold, GST activity drastically decreases to very low levels (or even null) which leads to irreversible damage (collapse of the lamella).

**Keywords:** Crustacean; Biometric data; Gill changes; Glutathione-S-Transferase; Catalase; Predictive model.

## LISTA DE FIGURAS

### TEXTO INTEGRADOR

**Figura 1.** Áreas de captura do caranguejo *Ucides cordatus* na Baía de São Marcos (A1 - Ilha de Facão - área de referência) e na Baía de São José (A2 - Área portuária – potencialmente contaminada), Maranhão, Brasil ..... 23

**Figura 2.** (A) *Ucides cordatus* capturado na área portuária. (B) Embarcação utilizada para deslocamento até as áreas de coleta ..... 25

**Figura 3.** (A, B) Pescador artesanal capturando *Ucides cordatus* pela técnica de braceamento. (B) Extração de amostras hepatopâncreas e brânquias ..... 26

**Figura 4.** (A) Esquema das medidas LC e CC (PINHEIRO; FISCARELLI, 2001). (B) Registro do CPQ a partir de um paquímetro de precisão 0,1cm ..... 26

### ARTIGO II

**Figure 1.** Map of local of the samples of *Ucides cordatus* Crab in São José Bay (A1 - reference area) and São Marcos Bay (A2 - harbor area), Maranhão, Brazil ..... 74

**Figure 2.** Photomicrograph of *Ucides cordatus* gill of the reference area with emphasis on the primary lamella (PL), secondary lamella (SL) pilasters cells (PC) and maginal channel (MC) ..... 74

**Figure 3.** Gills alterations identified in *Ucides cordatus* caught in Maranhão, Brazil. (A) Marginal channel deformation; (B) Hemocytic infiltration; (C) Cuticle disruption; (D, E) Collapse of the lamellae and (F) Swelling of the lamellae after collapse ..... 75

**Figure 4.** Joining tree of observed branchial lesions in *Ucides cordatus*. Hemocytic infiltration (IH), displacement or disruption of the cuticle (DRC), necrosis (NEC), deformation of the marginal channel (DCM), disarrangement of secondary lamella (DLS) and swelling of the secondary lamella (ILS) for dry period (A) and rainy (B) ..... 75

**Figure 5.** Frequency of occurrence of size (A) and weight (B) classes of *U. cordatus* captured in port area and reference area ..... 76

### ARTIGO III

**Figura 1.** Áreas de captura do caranguejo *Ucides cordatus* na Ilha de São Luis (Brasil), onde A1 a área portuária (uma região potencialmente contaminada) e A2 corresponde à área de referência ..... 96

**Figura 2.** Média dos valores encontrados para largura da carapaça (A) e peso total (B) de *Ucides cordatus* capturado na área portuária e na área de referência por período amostral (Ilha de São Luis, Brasil) ..... 97

**Figura 3.** Atividade da GST (A) e CAT (B) dos caranguejos coletados na área portuária e de referência no período chuvoso e de estiagem (Ilha de São Luis, Brasil) ..... 98

**Figura 4.** Médias da atividade da Glutathione-S-Transferase e o peso total de caranguejos capturados na área portuária (Ilha de São Luis, Brasil) ..... 98

### ARTIGO IV

**Figura 1.** Áreas de captura do caranguejo *Ucides cordatus* na Ilha de São Luis (Brasil), onde A1 corresponde a área portuária (uma região potencialmente contaminada) e A2 a área de referência ..... 112

**Figura 2.** Alterações branquiais identificadas em *U. cordatus* capturados na região portuária, Baía de São Marcos, Maranhão, Brasil ..... 113

**Figura 3.** Correlação linear e ajuste dos polinômios entre a atividade de GST com os valores da escala de lesões branquiais observadas em *U. cordatus* capturados na área portuária, Baía de São Marcos, Maranhão, Brasil ..... 114

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

**Table 1.** Countries that use either biomarkers or chemical analysis in crustaceans to monitor harbor areas, according to the 46 studies analyzed ..... 52

**Table 2.** Percentage of orders/classes used for biomonitoring in harbor areas ..... 53

**Table 3.** Studies that have used *Carcinus maenas* as biomarkers to monitor either port areas or sites that receive contaminant inputs from harbors ..... 54

**Table 4.** Types of crustacean biomarkers used in 46 studies and their respective percentages ..... 57

### ARTIGO II

**Table 1.** Percentage of specimen affected (gills of *Ucides cordatus*) ..... 65

**Table 2.** Biometric data of *Ucides cordatus* caught in contaminated area and reference area (mean  $\pm$  SD) ..... 66

### ARTIGO III

**Tabela 1.** Dados biométricos de *Ucides cordatus* capturados na área contaminada e na área de referência (média  $\pm$  desvio padrão) ..... 99

### ARTIGO IV

**Tabela 1.** Valores médios, máximos e mínimos da atividade da GST para área portuária e para a área de referência ..... 115

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>16</b>
3.1 Monitoramento ambiental em áreas portuárias .....	16
3.2 O uso de biomarcadores para o monitoramento ambiental .....	18
3.3 <i>Ucides cordatus</i> como espécie biomonitora .....	19
3.4 Modelos preditivos para o monitoramento ambiental .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 Levantamento Bibliográfico .....	22
4.2 Área de estudo .....	23
4.3 Amostragem .....	25
4.4 Biometria .....	26
4.5 Análises histológicas .....	27
4.6 Análises bioquímicas .....	27
4.7 Tratamento estatístico .....	27
4.8 Modelo preditivo .....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
5.1 Assessment of pollution in harbor areas using multiple biomarker analysis in crustaceans: a review .....	29
5.2 Branchial lesions and biometric analysis of mangrove crab <i>Ucides cordatus</i> (Crustacea: Ucididae) as indicators of impact status in a port area of Northeast Brazil .....	62
5.3 Indicadores bioquímicos e biométricos no caranguejo <i>Ucides cordatus</i> (Linnaeus, 1763) para monitoramento ambiental de uma área portuária na costa Norte do Brasil .....	82
5.4 Um modelo preditivo de impactos ambientais em caranguejo <i>Ucides cordatus</i> aplicado a uma área portuária no Norte do Brasil .....	103
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>127</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>128</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As operações portuárias podem gerar resíduos que poluem o ar, a água, o solo, o subsolo, além de alterar a paisagem (ANTAQ, 2015). Os efeitos desses contaminantes podem ser mais significativos sobre a biota aquática de regiões que apresentam sedimentos finos, como é o caso dos manguezais (BAYEN, 2012).

O porto do Itaqui e os terminais privados das empresas VALE e ALUMAR/ALCOA estão localizados na Baía de São Marcos e foram implantados em áreas de manguezais (CARVALHO-NETA e ABREU-SILVA, 2010). Todavia, o monitoramento da biota aquática dessa área ainda não é realizado de forma sistemática. Dessa forma, investigações sobre a qualidade de áreas como essas são relevantes, uma vez que os manguezais correspondem a ecossistemas tropicais muito ameaçados (BAYEN, 2012), apesar de serem ambientes legalmente protegidos e com comprovada importância ecológica e socioeconômica (BRASIL, 2015).

Estudos tem mostrado que particularmente aqueles manguezais que recebem *inputs* antropogênicos, contêm uma infinidade de contaminantes químicos (sobre uma vasta gama de concentrações) que são potencialmente tóxicos para os organismos (KRAHN et al., 1994; AMARAL et al., 2009). A compreensão sobre os efeitos dos contaminantes oriundos de regiões portuárias nos manguezais maranhenses ainda é incipiente. E pesquisas futuras devem preencher tais lacunas, contribuindo com a avaliação do impacto da poluição química sobre os ecossistemas de manguezais e sobre as pessoas que dependem destes ambientes para seu sustento (BAYEN, 2012), explorando, por exemplo, peixes e crustáceos (especialmente camarões e caranguejos).

A espécie de caranguejo *Ucides cordatus* caracteriza-se como um importante recurso oriundo de manguezais brasileiros, que se alimenta principalmente de serapilheira e desempenha um papel ecológico importante (NORDHAUS et al., 2006 ). Esse recurso pesqueiro ainda é muito explorado pelas comunidades localizadas no entorno dos empreendimentos portuários da Ilha de São Luís. Entretanto, ainda não se conhece os níveis de contaminação desses caranguejos. Por isso, estudos que esclareçam o potencial e a dinâmica dos xenobióticos nas populações de importância econômica para o Maranhão são de grande relevância no contexto de desenvolvimento atual (PINHEIRO-SOUSA et al., 2013).

Táxons que são sensíveis aos poluentes de origem antrópica podem mostrar alterações bioquímicas e morfológicas em diferentes tecidos (CARVALHO-NETA e ABREU-SILVA, 2013). Essas alterações podem ser validadas para diferentes espécies e são conhecidas como biomarcadores (VAN DER OOST et al., 2003). O desenvolvimento e a padronização de

metodologias capazes de prever os efeitos da contaminação aos organismos da região são fundamentais para subsidiar ações de monitoramento e gestão de uma determinada área (CARVALHO-NETA, 2010). Dessa forma, este trabalho visa contribuir com o conhecimento científico relacionado à validação de biomarcadores histológicos e bioquímicos no caranguejo *Ucides cordatus*, a fim de subsidiar programas de biomonitoramento e de gestão da região portuária da Ilha de São Luís.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Neste estudo objetivou-se comparar biomarcadores bioquímicos (enzimas hepáticas), biomarcadores morfológicos (lesões branquiais) em *Ucides cordatus* para obtenção de um modelo preditivo de efeitos antrópicos em uma área portuária de São Luís-MA.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Levantar dados bibliográficos sobre o uso de biomarcadores em crustáceos para o monitoramento de áreas portuárias;
- Analisar os biomarcadores bioquímicos catalase e glutathione S-transferase em caranguejos *U. cordatus* da zona portuária de São Luís e da área de referência;
- Quantificar lesões branquiais (biomarcador histológico) em *U. cordatus* da zona portuária de São Luís e da área de referência;
- Correlacionar dados dos biomarcadores com dados da biometria de *U. cordatus* das áreas analisadas;
- Obter um modelo preditivo de efeitos antrópicos em duas áreas estuarinas de São Luís.

## 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 3.1 Monitoramento ambiental em áreas portuárias

Estudos de monitoramento ambiental fornecem subsídios para uma análise mais detalhada sobre a situação do ambiente (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). E consistem no conhecimento e acompanhamento sistemático da situação dos recursos ambientais do meio físico e biótico, visando a recuperação, melhoria ou manutenção da qualidade ambiental (Ministério do Meio Ambiente - MMA, 2009). Tal qualidade está relacionada às variáveis ambientais, que se alteram, seja em função de transformações naturais, seja em função das ações antrópicas (Ministério do Meio Ambiente - MMA, 2009).

Nesse contexto, destacam-se os ecossistemas estuarinos, como ambientes altamente produtivos que fornecem consideráveis benefícios ecológicos, econômicos e culturais. Contudo, intervenções humanas como a implantação de grandes empreendimentos portuários, têm causado modificações profundas na dinâmica desses ambientes aquáticos (SCHAEFFER-NOVELLI, 2003). Os complexos portuários instalados ao longo da região costeira brasileira são responsáveis por muitos agentes potencialmente contaminantes que podem causar alterações graves nas comunidades aquáticas (CARVALHO-NETA, 2010).

No Brasil, as áreas que recebem influência de zonas portuárias ainda não são monitoradas adequadamente, pois não existem dados pretéritos que estabeleçam um histórico de diagnóstico (FERNANDES, 2005). Assim, pesquisas que forneçam informações sobre a qualidade dessas áreas representam uma importante iniciativa para o monitoramento ambiental em áreas portuárias.

O complexo portuário em São Luís torna a cidade atrativa para indústrias que utilizam o transporte marítimo, porém, os navios graneleiros que atracam nesses portos, transportam diversos produtos, tais como minério de ferro, carvão, soda cáustica, bauxita e outros (CARVALHO-NETA et al., 2012). Diante disto, a atividade portuária na Baía de São Marcos pode causar grandes impactos ao ambiente, especialmente se ocorrer algum acidente. Sendo relevante citar também que se o pescado é capturado próximo aos locais contaminados pode trazer consigo risco à saúde pública. Tais aspectos evidenciam a necessidade de monitoramento dos efeitos dos xenobióticos nos organismos aquáticos desses ecossistemas (TORRES, 2015).

Fortes et al. (2009) enfatiza a necessidade de monitoramento das áreas de influência do Complexo Portuário da Ilha de São Luís diante da heterogeneidade de produtos movimentados, tendo como justificativa: a) uma grande variedade de possíveis poluentes; b) a extensão da área afetada; c) a forma superficial com que a dinâmica populacional dos organismos estuarinos na área de influência desse complexo tem sido estudada; d) o risco de contaminação dessas áreas pelos efeitos poluentes provenientes da lavagem dos navios e da água de lastro.

Estudos com biomarcadores de contaminação aquática em peixes de áreas influenciadas por atividades portuárias têm revelado a eficácia desta metodologia para o monitoramento ambiental (CARVALHO-NETA et al., 2012; PINHEIRO-SOUSA et al., 2013; SOUSA et al., 2013; CARVALHO-NETA et al., 2014). Contudo, sabe-se que os contaminantes podem interagir e se comportar de maneiras distintas em organismos diferentes, justificando a necessidade de expandir o uso de biomarcadores para diferentes grupos biológicos.

### 3.2 O uso de biomarcadores para o monitoramento ambiental

A simples presença de um xenobiótico em um ambiente aquático não pode por si só indicar um efeito deletério a este ambiente, sendo necessários estudos que permitam identificar os efeitos que os poluentes estão causando aos organismos vivos desses ecossistemas (COSTA et al., 2008). Logo, o uso de biomarcadores pode auxiliar na avaliação dos estressores e seus efeitos sobre os organismos presentes nesses locais contaminados. Para tanto, faz-se necessário uma padronização nessas metodologias e de biomarcadores que possam contribuir para a avaliação e diagnósticos dos impactos a que estão sujeitas estas regiões específicas do Brasil (CARVALHO-NETA et al., 2014).

Os biomarcadores são definidos como modificações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que são evidenciadas em análises histológicas ou de fluidos corporais, nos organismos e populações que indicam a presença de poluentes químicos (LIVINGSTONE, 1993; DEPLEDGE et al., 1995; ZUCCHI et al., 2004). Os biomarcadores permitem identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos, assim como possibilitam a mensuração de efeitos subletais (LIVINGSTONE, 1993; VAN DER OOST et al., 2003). Estas características permitem a adoção de ações remediadoras (ou preventivas), justificando a importância e o “interesse atual de incorporação da análise de biomarcadores em programas de avaliação da contaminação ambiental em diferentes regiões” (CARVALHO-NETA, 2013).

Os biomarcadores podem ser mensurados a partir de diferentes órgãos dos caranguejos, como por exemplo, hepatopâncreas (biomarcador bioquímico) e brânquias (biomarcador morfológico).

O uso de biomarcadores bioquímicos (como as enzimas, por exemplo) em organismos aquáticos é mais eficaz porque fornece dados sobre situações iniciais de contaminação, fornecendo subsídios seguros para programas de biomonitoramento que visem reverter os danos ambientais, pois indica as primeiras respostas dos organismos aos contaminantes (CARVALHO-NETA, 2010). Tal análise pode ser realizada a partir do hepatopâncreas do caranguejo, que além de ter uma função de armazenamento, também desempenha um papel semelhante ao fígado em animais vertebrados e é o órgão onde a biotransformação ocorre (BAYEN, 2012). Quando as taxas de absorção de contaminantes excedem as taxas de excreção, os animais começam a desenvolver mecanismos de desintoxicação (RAINBOW, 2007).

Estudos identificaram que os níveis de cromo no hepatopâncreas de *U. cordatus* era seis vezes maior do que o permitido pela legislação e que a análise de contaminantes em

hepatopâncreas fornece informações a partir de uma exposição recente e portanto reflete os níveis reais presentes no ambiente (CORREA et al., 2002; MAJUMDER et al., 2003; NUDI et al., 2007).

A catalase tem sido utilizada como biomarcador bioquímico em animais de regiões contaminadas por ser uma enzima antioxidante importante na decomposição de peróxido de hidrogênio produzida em quantias maiores durante o processo de biotransformação (VENTURA et al., 2002). A Glutathione S-Transferase é um biomarcador bioquímico envolvido na desintoxicação celular de compostos eletrofilicos, sendo importante na proteção contra câncer e outras doenças degenerativas decorrentes da exposição a ambientes contaminados (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). E o uso desses biomarcadores bioquímicos tem demonstrado eficiência nos programas de monitoramento dos ambientes aquáticos (CARVALHO-NETA, 2010).

Já o uso de biomarcador morfológico em brânquias é caracterizado por ser uma técnica com custos econômicos mais reduzidos, mas que apesar disso tem sido eficaz em avaliar a saúde do ambiente em que os organismos se encontram. As alterações histológicas encontradas se tornam de fácil reconhecimento e de grande importância para determinar o nível de exposição aos poluentes (NORENA-BARROSO et al., 2004). As brânquias ficam em contato com a água, e devido a sua fina e permeável cutícula (para facilitar a difusão dos gases), ela também acaba se tornando permeável a outros materiais (RUPPERT et al., 2005), inclusive contaminantes, apresentando-se como órgãos de grande relevância científica para a área de Ecotoxicologia Aquática.

O uso de biomarcador morfológico e bioquímico em peixes e moluscos bivalves tem sido uma técnica muito utilizada pelo Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), e tem apresentado resultados satisfatórios. Por outro lado, no estado do Maranhão esse tipo de análise ainda não foi realizada em crustáceos. Nesse contexto, torna-se válido adequar metodologias de biomarcadores para o uso em caranguejos.

### 3.3 *Ucides cordatus* como espécie biomonitora

*Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) ocorre a partir da Flórida, nos Estados Unidos até Santa Catarina no sul do Brasil (MELO, 1996, TAVARES-DIAS, 2003). No Brasil, está distribuído desde o Amapá até Santa Catarina, sendo encontrado em altas densidades na costa amazônica (norte do Brasil), especialmente na área compreendida entre Amapá e Delta do Parnaíba (MELO, 1996).

É popularmente conhecido como “caranguejo-uçá” ou “toc toc” e é o segundo maior crustáceo encontrado no manguezal (OLMOS e SILVA, 2003). Apresenta carapaça subelíptica e uma coloração que varia de azulada a arroxeadada e avermelhada. Os quelípodos têm tamanhos desiguais para machos e fêmeas. E nos machos é possível identificar uma franja de pelos nos pereópodos, a qual é reduzida ou ausente nas fêmeas (MELO, 1996), enquanto que o abdome das fêmeas é mais largo para acoplar a massa ovígera.

Durante o ano, o início do período reprodutivo desta espécie é caracterizado pela saída dos caranguejos da toca, em um acontecimento conhecido como “andada”. Nesse período, os machos liberam uma espuma branca que provavelmente contém feromônios para atração da fêmea (Góes et al., 2000). Também é comum ocorrerem duelos entre os machos (golpes de quelípodos) pela posse das fêmeas para acasalamento (WUNDERLICH et al., 2008). Logo após o acasalamento, as fêmeas estocam os espermatozoides nas espermatecas, até que suas gônadas se desenvolvam e ocorra a exteriorização dos ovos (SANT’ANNA et al., 2007).

O desenvolvimento desses caranguejos é caracterizado por uma fase embrionária que dura aproximadamente 18 dias (PINHEIRO e HATTORI, 2003) e uma fase larval que dura aproximadamente 60 dias (PINHEIRO e FISCARELLI, 2001).

As fêmeas liberam as larvas (zoeas) normalmente, antes da maré vazante de sizígia, facilitando sua dispersão para o mar aberto. As larvas se desenvolvem em áreas oceânicas, sendo descritos sete estágios larvais para a espécie (DIAS-NETO, 2011). As zoeas permanecem longe dos manguezais por três a quatro semanas (DIELE, 2000), completando seu desenvolvimento em águas costeiras. Iniciam uma migração para dentro dos estuários, já na forma de megalopas, que é um estágio intermediário entre a larva planctônica e o juvenil bentônico (PINHEIRO; FRANZOZO, 2002). O retorno ao manguezal ocorre durante as marés enchentes de lua cheia e nova, onde os caranguejos completam seu desenvolvimento (DIAS-NETO, 2011) e ali permanecem.

Os primeiros estágios juvenis são encontrados em associação ao sedimento removido das galerias pelos animais de maior porte, aproveitando sua menor compactação para escavar suas próprias galerias (KASSUGA; MASUNARI, 2008). A espécie leva de 2 a 3 anos para atingir a maturidade sexual (PINHEIRO et al., 2005) e possui uma longa expectativa de vida (de até 10 anos), especialmente se desconsiderarmos fatores como sobrepesca e degradação do manguezal (DIAS-NETO, 2011).

*U. cordatus* desempenha funções importantes em áreas de manguezal, como processamento da serrapilheira, fluxo energético, ciclagem de matéria orgânica e bioturbação do sedimento (NORDHAUS et al., 2006). É uma espécie muito resistente com habilidade de

suportar condições adversas como a disponibilidade limitada de água (devido às inundações da maré e exposição do substrato), a alta salinidade intersticial e a baixa concentração de oxigênio nas galerias (LIMA et al., 2010).

Entre os vários organismos aquáticos, invertebrados têm sido utilizados para a avaliação ambiental, visto que são os principais componentes em todos os ecossistemas e, por causa da população geralmente numerosa, podem ser amostrados para análises com pouco dano à dinâmica populacional (DEPLEDGE e FOSSI, 1994). Os crustáceos, por sua vez, podem acumular contaminantes, e no entanto serem resistentes à sua toxicidade. E esta é uma das características que possibilita que representantes desse grupo sejam utilizados no monitoramento da contaminação do ambiente marinho (COSSA, 1989). Nesse contexto, estudos têm indicado que o caranguejo *U. cordatus* é excelente bioindicador de poluição dos manguezais (SANTOS, 2002; NUDI et al., 2007; PINHEIRO et al., 2012, 2013) que pode sofrer alterações bioquímicas e morfológicas em diferentes tecidos a partir da exposição à um contaminante. *U. cordatus* é uma espécie potencialmente bioacumuladora de metais (SANTOS, 2002; NUDI et al., 2007; PINHEIRO et al., 2012, 2013). Mas, em contra partida, corresponde à espécie de caranguejo mais explorada para o consumo humano no Brasil (OLMOS e SILVA, 2003). Desta forma, o conhecimento sobre sua qualidade também é relevante no contexto de saúde pública.

#### 3.4 Modelos preditivos para o monitoramento ambiental

O cenário atual de degradação ambiental tem gerado a necessidade de prever efeitos de agentes tóxicos em populações naturais e sistemas ecológicos. Tais efeitos podem ser analisados através do uso de modelos preditivos. Esses modelos consideram efeitos tóxicos a níveis molecular, bioquímico, celular, tecidual e em organismos, chegando até os níveis hierárquicos mais altos (BAZANA et al., 2016).

Modelos são hipóteses que simplificam observações complexas ao mesmo tempo em que oferecem um quadro preditivo que estrutura estas observações. Os modelos mais sofisticados são matemáticos ou estatísticos, e têm a vantagem de apresentar um grau mais baixo de viés e normalmente são sistemas dedutivos mais robustos (PHILLIPS, 2013).

Contudo, é sábio destacar que a utilização de modelos não elimina o trabalho de campo. O qual é importantíssimo para refinar e validar os modelos preditivos (PHILLIPS, 2012, 2013). Haja vista que necessitam de conhecimento prévio para prever tendências e eventos, tornando esta metodologia de grande utilidade no contexto de estudo de impacto ambiental (PHILLIPS, 2012, 2013; BAZANA et al., 2016).

Os modelos preditivos têm *a informação, o método e o resultado* como elementos básicos (WARREN, 1990). As informações devem ser baseadas em observações empíricas, que consistem em interações observadas entre variáveis dependentes e independentes (em estudos prévios e em partes amostradas da área de interesse). Assim como, o método empregado é determinado pelo “problema” a ser solucionado e pelo conhecimento teórico e empírico prévio, ou seja, utiliza-se o método (o quê e como coletamos) para transformar informação em resultados previsíveis (WARREN, 1990). E quando o modelo preditivo é aplicado à uma região, o resultado pode ser visto em termos probabilísticos, apesar das técnicas utilizadas no desenvolvimento deste não terem essa origem (PRIETO et al. 2014).

Alguns modelos matemáticos (preditivos) de dados biológicos estão sendo utilizados em peixes marinhos e dulcícolas para a correlação de biomarcadores bioquímicos e histopatológicos (CARVALHO-NETA et al., 2014); e genotóxicos e histopatológicos (PINHEIRO-SOUSA, 2015). Estes estudos fornecem uma análise mais realista sobre o estresse ocasionado pelos contaminantes presentes nos ambientes. Vários modelos matemáticos tem sido desenvolvidos para severidade de lesões histológicas em brânquias, fígado e rins de peixes (SCHWAIGER et al., 1997; BERNET et al., 1999; CARVALHO-NETA et al., 2014; PINHEIRO-SOUSA, 2015), mas nenhum desses foram desenvolvidos para caranguejos de áreas portuárias. Portanto, o modelo proposto neste estudo, pode ser promissor para a interpretação da situação ambiental de ecossistemas de manguezais influenciados por atividades portuárias.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Levantamento Bibliográfico

Para o levantamento das informações foram consultadas as seguintes bases de dados indexadas: BioOne (<http://www.bioone.org>), Wiley Online Library (<http://onlinelibrary.wiley.com>), Scopus (<http://www.scopus.com/>), ProQuest (<http://www.proquest.com/libraries/academic/databases/>), Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>), e Web of Science (<http://isiknowledge.com/>). Em conjunto, essas bases têm acesso a mais de 33.000 periódicos.

A metodologia de busca caracterizou-se pela combinação das palavras-chave: Biomarker, Biomonitoring e Monitoring; Crustacea e Crustaceans; Harbour, Harbor e Port. Apenas artigos de pesquisa foram considerados. Foram selecionados os estudos que abordavam o uso de algum tipo de biomarcador em crustáceos para monitorar áreas portuárias ou áreas sob influência de atividades portuárias (conforme informações fornecidas pelos



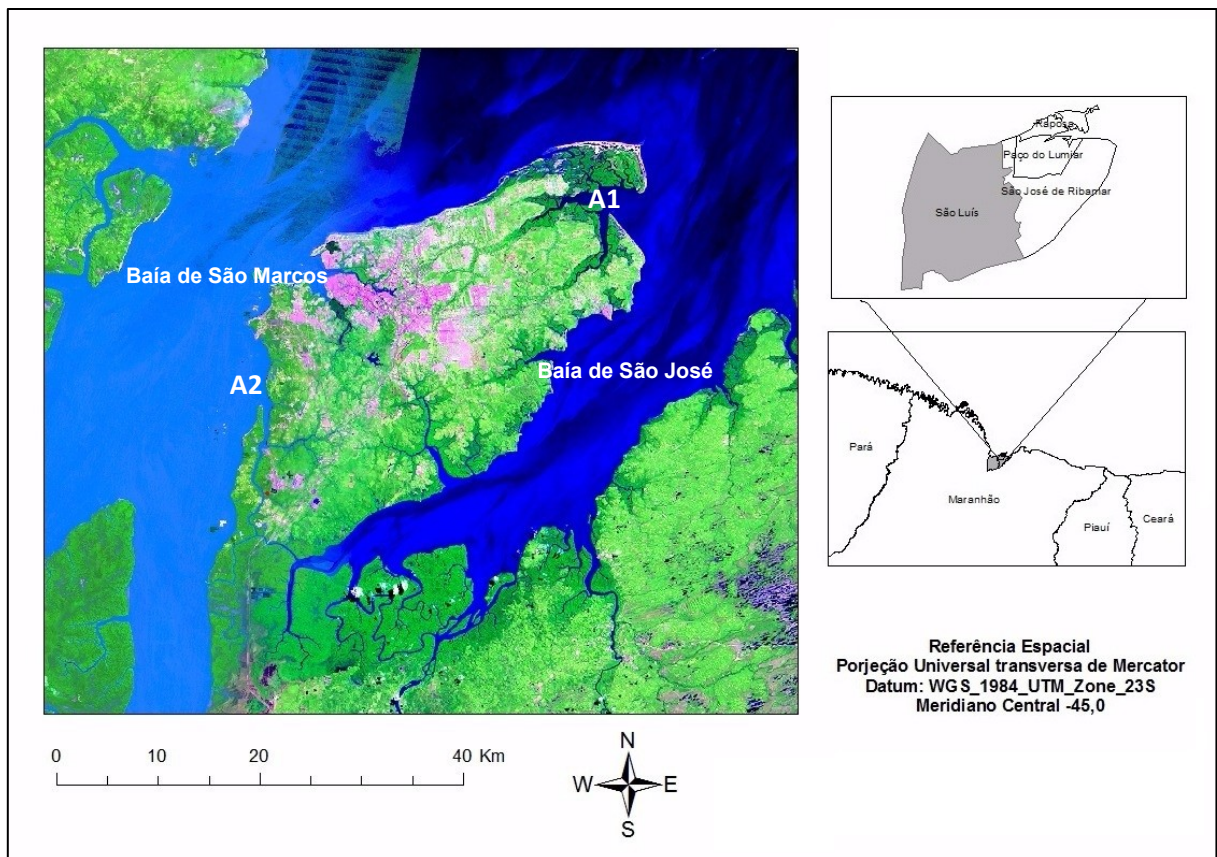
autores de cada estudo). Quando a informação buscada não estava disponível no resumo, realizou-se uma busca pelas palavras-chave dentro de cada artigo. Cada base de dados foi minuciosamente consultada.

As referências dos artigos validados foram analisadas e aquelas que estavam de acordo com o propósito desta pesquisa também foram contabilizadas. Os dados foram sistematizados em uma tabela.

#### 4.2 Área de estudo

A área conhecida como Golfão Maranhense é formada por duas grandes Baías (São Marcos e São José) separadas pela Ilha de São Luís (figura 1).

A Baía de São Marcos está localizada na costa ocidental do Maranhão e é considerada um estuário ativo, com um canal central bem desenvolvido e dominado por correntes de vazante, onde se sucedem bancos arenosos desde a boca da Baía até dezenas de quilômetros para o interior (SOUZA FILHO, 2005). É uma região onde ocorre a confluência dos rios Mearim e Pindaré (CARVALHO-NETA et al., 2012).



**Figura 1.** Áreas de captura do caranguejo *U. cordatus* na Baía de São Marcos (A1 - Ilha de Facão - área de referência) e na Baía de São José (A2 - Área portuária – potencialmente contaminada), Maranhão, Brasil.

Em termos de importância econômica, a Baía de São Marcos é classificada como uma das mais importantes do litoral brasileiro, devido à instalação do complexo portuário do Estado do Maranhão (1960). Neste complexo portuário atuam cerca de 30 empresas, dentre elas a Companhia Vale do Rio Doce (VALE), SUZANO, ALUMAR/ALCOA e Petrobrás, que são responsáveis pela movimentação de cargas para o Brasil e para o mundo (ANTAQ, 2014).

É importante ressaltar também que na última década, a Baía de São Marcos tem recebido contaminação química causada por esgotos e campos agrícolas, escoamento de nutrientes, lançamento de pesticidas e descargas industriais (ZONEAMENTO COSTEIRO DO MARANHÃO, 2003). E isso é uma ameaça crescente à sanidade dos organismos especialmente nas áreas de influência do complexo portuário de São Luís (CARVALHONETA, 2010). Tais aspectos mencionados nos permitiram considerar essa região como uma área potencialmente contaminada.

A área de coleta na Baía de São Marcos foi nas proximidades do Terminal Marítimo de Ponta da Madeira e do Porto do Itaqui.

O Terminal Marítimo de Ponta da Madeira é um porto privado pertencente à VALE, fica adjacente ao porto de Itaqui, e defronte à Baía de São Marcos. Destina-se principalmente à exportação de minério de ferro trazido do projeto Serra dos Carajás, no Pará. Esse terminal é constituído de um píer de acostagem para navios, um pátio descoberto de 125 m<sup>2</sup> para estoque de minério de ferro e manganês, e um silo horizontal para grãos com capacidade de 25.000 t (SOUSA, 2009). O Porto do Itaqui é nacionalmente conhecido por possuir as maiores amplitudes de maré do Brasil, chegando à casa dos 8 metros (EMAP, 2009). O canal de acesso a esse porto possui profundidade natural mínima de 27 metros e largura aproximada de 1,8 Km (SOUSA, 2009).

A área selecionada como referência foi a ilha de Facão na Baía de São José. Esta Baía se localiza no litoral norte da ilha de São Luís. E em sua foz ocorrem extremidades de esporões ou de bancos, assimétricos, com direção ENE-WSW, oblíqua à costa, separados por canais estreitos (Ministério do Meio Ambiente – MMA, 2012). Alguns bancos situados pouco mais a leste orientam-se paralelamente à linha de costa. Na Baía de São José, não existe canal de maré desenvolvido como na Baía de São Marcos (SOUSA, 2009). Essa Baía não apresenta empreendimentos portuários em suas proximidades. Assim como a Ilha de Facão não recebe interferências humanas diretas. Esta Ilha tem sido o refúgio para muitos catadores de caranguejo do município de Raposa. É apontada como a área que possui uma maior

concentração de caranguejos, bem como, os indivíduos são maiores do que nas demais áreas da Baía.

#### 4.3 Amostragem

As coletas bimestrais foram realizadas no período de 1 ano entre agosto de 2015 a junho de 2016 (figura 2A e 2B). Em cada área (área portuária e área de referência) foram coletados 20 espécimes (figura 2A e 2B) por coleta.



**Figura 2.** (A) *U. cordatus* capturado na área portuária. (B) Embarcação utilizada para deslocamento até as áreas de coleta.

Com a ajuda de pescadores artesanais, os caranguejos foram coletados de dentro de suas tocas pela técnica de braceamento (figura 3A, B). Os animais foram capturados em pontos aleatórios pelo manguezal. E foram imediatamente dissecados com o uso de uma tesoura. Amostras de hepatopâncreas e brânquias foram removidas com auxílio de pinças esterilizadas (figura 3C). Para fins de padronização, foram analisados apenas machos em intermuda, evitando quaisquer efeitos da fase de muda e sexo (PINHEIRO et al., 2012).

As amostras de hepatopâncreas foram colocadas em tubos Eppendorf, congeladas (e mantidos) em nitrogênio líquido e transportado ao Laboratório de Biomarcadores em organismos aquáticos da UEMA. As amostras ficaram congeladas até o momento das análises enzimáticas. Já as brânquias retiradas 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.



**Figura 3.** (A, B) Pescador artesanal capturando *U. cordatus* pela técnica de braceamento. (C) Extração de amostras de hepatopâncreas.

#### 4.4 Biometria

Com auxílio de um paquímetro de precisão 0,1 cm foram tomadas as seguintes medidas de cada exemplar: largura da carapaça (LC), comprimento da carapaça (CC) (figura 4A) e comprimento do própodo quelar (CPQ) (figura 4B).



**Figura 4.** (A) Esquema das medidas LC e CC (PINHEIRO; FISCARELLI, 2001). (B) Registro do CPQ a partir de um paquímetro de precisão 0,1cm.

A LC é medida ao nível do primeiro pereiópodo, correspondendo a maior dimensão da carapaça; o CC é medido no plano de simetria sobre o dorso, da margem anterior da frente até

a margem posterior da carapaça (PINHEIRO; FISCARELLI, 2001); e o comprimento do própodo quelar (CPQ) é tomado a partir da base do dedo fixo até a ponta oposta.

O peso total (PT) de cada indivíduo foi tomado a partir de balança digital de precisão 0,1g antes da extração das amostras.

#### 4.5 Análises histológicas

Para realizar a análise dos tecidos, as amostras de brânquias foram desidratadas em série crescente de álcoois, diafanizadas em xilol, impregnadas e incluídas em parafina. Cortes transversais, de aproximadamente 5 $\mu$ m de espessura, 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) e Bernet et al. (1999) "modificado" e 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 Bernett et al. (1999), que leva em consideração a gravidade da lesão.

#### 4.6 Análises bioquímicas

As amostras de hepatopâncreas foram homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas, sendo o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática da glutationa-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 glutationa 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, pela taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de acordo com Tagliari et al. (2004) e Ventura et al. (2002).

#### 4.7 Tratamento estatístico

Os resultados foram expressos em porcentagem e média  $\pm$  desvio padrão. O teste T de Student foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos (área portuária e área de referência) e apenas  $p < 0,05$  foi considerado significativo. A relação entre a atividade

enzimática e os dados biométricos foi analisada através de regressão linear usando a média dos valores observados para cada parâmetro.

#### 4.8 Modelo Preditivo

Os valores para a atividade de GST foram correlacionados com os da escala de lesões branquiais (variável independente) por meio do encaixe de polinômios de terceira ordem, utilizando o método dos mínimos quadrados (0,05 de nível de significância). O polinômio que representa a relação funcional modelada entre a atividade da GST e as lesões branquiais tem esta forma:

$$\sum_{i=1}^{\mu} \alpha_i \cdot x^{(i-1)}$$

Equação 1

onde  $\alpha$  é o coeficiente e  $x$  é a variável independente (lesões braquiais),  $\mu - 1$  é o grau do polinômio melhor ajustadas aos dados, nesse caso  $\mu = 4$ .

A primeira derivada do polinômio equipada tem esta forma:

$$\sum_{i=1}^{\mu} (i - 1) \cdot \alpha_i \cdot x^{(i-2)}$$

Equação 2

e representa uma função tangente em qualquer ponto da função de (1) e foi utilizada para obter o ponto de inflexão ou o valor máximo da Eq. 1, quando a função começa a diminuir drasticamente (Carvalho-Neta et al, 2012).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação são apresentados em quatro capítulos. Cada capítulo corresponde a um artigo que foi ou será submetido a um periódico da área. No primeiro artigo, apresentamos dados compilados a partir de um levantamento bibliográfico sobre o uso de biomarcadores em crustáceos para o monitoramento de áreas portuárias, onde indicamos as espécies e tipos de análises que são utilizadas em nível global. No segundo e terceiro artigos, respectivamente, apresentamos as alterações identificadas na histologia das brânquias de *U. cordatus*, e quantificamos a atividade das enzimas Catalase e Glutathione-S-transferase, ambos os estudos foram apresentados como biomarcadores de contaminação aquática. E por fim, o

quarto artigo apresenta um modelo matemático preditivo baseado em dados morfológicos e bioquímicos de *Ucides cordatus*.

### **5.1 Assessment of pollution in harbor areas using multiple biomarker analysis in crustaceans: a review \***

Ticianne de Sousa de Oliveira Mota Andrade<sup>1\*</sup>, Janaina Gomes Dantas<sup>1</sup>, Eliane Braga Ribeiro<sup>2</sup>, Suelen Rosana Sampaio de Oliveira<sup>3</sup>, Débora Martins Silva Santos<sup>4</sup>, Natilene Mesquita Brito<sup>5</sup>, Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program of Aquatic Resources and Fishery (PPGRAP/UEMA), State University of Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luís, Maranhão, Brazil

<sup>2</sup> Postgraduate Program of Animal Science, State University of Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luís, Maranhão, Brazil

<sup>3</sup> Postgraduate Program of Oceanography, Federal University of Maranhão, Campus Dom Delgado, São Luís, Maranhão, Brazil

<sup>3</sup>Department of Chemistry and Biology, State University of Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luís, Maranhão, Brazil

<sup>4</sup>Federal Institute of Maranhão, Avenida Castelo Branco, São Francisco, São Luis, Maranhão, Brazil

\*Corresponding author: Ticianne de Sousa de Oliveira Mota Andrade. E-mail: ticiannedeoliveira@gmail.com; Telephone: +55 98 98168-3006

#### **Abstract**

This review examines the use of biomarkers in crustaceans as a valid species for monitoring harbor areas, with emphasis on the types of biomarkers and locations where the technique has been applied. Data were collected

---

\* Este artigo foi submetido para publicação em Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. ISSN: 0179-5953. Fator de Impacto: 3.744.

from six indexed databases with a combined access to over 33,000 journals. We identified 20 countries that use crustacean biomarkers to monitor harbor areas. Data indicated that two major crustacean groups, classes Malacostraca and Maxillopoda, are used as bioindicators in harbor areas. The methodologies based on crustacean biomarkers were classified into four groups, as follows: Biochemical (69%), physiological (16%), behavioral (11%), and morphological (4%). Crustacean biomarkers have been used for environmental monitoring for a long time. However, this method is not often used to specifically monitor either port areas or sites influenced by harbor activities. The 46 studies presented here indicate that crustacean biomarkers are an efficient biomonitoring tool.

**Keywords:** Bioindicators; Malacostraca; Maxillopoda; Biomonitoring

## 1. Introduction

The environment is continually being polluted by organic chemicals (xenobiotics) released from urban and industrial communities (Van der Oost et al. 2003). In this context, harbors are important sources of aquatic pollution (Undap et al. 2013). Pollution sources generate solid residues and effluents, atmospheric emissions, movement and hoarding of cargo, vessel repairs and maintenance, and installation of industrial complexes in harbor areas. It is not difficult to diagnose the causes of pollution in harbors, but the consequences are less clear (Davis and MacKnight 1990). The consequences are not immediately apparent, becoming visible only when they reach the population or ecosystem level and seriously affect the biota, at which point it may be too late to take effective management action (Undap et al. 2013). This situation has led to investigations to establish rapid alert signals that reflect biological responses to environmental toxins (Bucheli and Kent 1995). Biomarkers are promising and sensitive indicators of the toxic effect of substances distributed among the tissues of an organism (McCarthy and Shugart 1990). A biomarker is any biological response to a chemical compound in the environment that is measured either in an organism or its products (Van der Oost et al. 2003).

There is a global effort to identify good biomarkers for different environments; efforts are also being made to validate monitor species that occupy different ecological niches and represent different functional groups (Jha 2008). Among the various aquatic organisms, invertebrates have been used for environmental assessment because they are major components of all ecosystems, and their generally large populations can be sampled for analysis without affecting the population dynamics (Depledge and Fossi 1994). Several studies have indicated that crustacean biomarkers are an effective tool for biomonitoring aquatic environments (Correia et al.



2003; Stanek et al. 2006; Pereira et al. 2008; Antó et al. 2009; Davanzo et al. 2013). However, there are no systematic reviews that indicate “how” and “where” crustaceans are used for biomonitoring in port areas.

With the ever increasing number of scientific experiments, systematic reviews are a respectable part of scientific development because they are a succinct way to assess the level of research in a given field (Keathley-Herring et al. 2016). However, there are no published reviews on the issue presented here, despite the importance of harbors and their global impact. Thus, studies on the monitoring techniques in these areas are urgently needed. This review examines the use of crustacean biomarkers for monitoring harbor areas to determine whether crustaceans are a valid biomarker species. We also describe the continents where the technique has been applied.

## 2. Methods

We used the following indexed databases: BioOne (<http://www.bioone.org>), Wiley Online Library (<http://onlinelibrary.wiley.com>), Scopus (<http://www.scopus.com/>), ProQuest (<http://www.proquest.com/libraries/academic/databases/>), Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>), and Web of Science (<http://isiknowledge.com/>). These databases have combined access to over 33,000 journals. The following keywords were used in the searches: Biomarker, Biomonitoring and Monitoring (group A), Crustacea and Crustaceans (group B), Harbour, Harbor and Port (group C). The search methodology also involved combining the words between groups (A+B+C/ A+B/ A+C/ B+C).

Only research papers published between 1992 and 2015 were considered. We selected studies on the use of some types of crustacean biomarkers for monitoring harbor areas and areas under the influence of either harbors or harbor activities (according to the information provided by the authors). When this information was not available in the abstract, we read the entire paper and searched for keywords within each article. Each database was thoroughly consulted. The search was only ended after it was apparent that all of the results had been analyzed. References of validated articles were analyzed and those references that fell within the purpose of this research were also counted. We ensured that the same item had not been counted more than once. Data were organized and presented in a table.

Content analysis was objective, systematic, and quantitative, and based on the indexing information technique to produce inferences (Cavalcante et al. 2014). We did not prioritize a specific author and the qualitative analysis consisted of three steps: I) Material pre-exploration phase; II) Selection of analysis units; and III) Categorization processes (Campos 2004). The analysis of categories revealed meanings and important elaborations that met the objectives of the study. It also provided a scope of indicators (quantitative or not),

allowing for inferences (Campos 2004; Cavalcante et al. 2014) on the assessment of pollution in harbors areas using multiple crustacean biomarkers.

### 3. Results

Our results are presented in three parts. First, the *continents* and *harbors* where the studies were conducted; second, the groups and species used as either *biomonitors* or *bioindicators*; and third, we close with an explanation of the types of analysis that have been developed and the respective *biomarkers*.

#### 3.1 Continents and Harbors

We identified 20 countries in America, Europe, Africa, Asia, and Oceania that conduct pollution assessment in harbor areas using multiple crustacean biomarkers (Table 1).

Europe was the continent that stood out for the use of crustacean biomarkers and/or chemical analysis to monitor port areas. Almost half of the research analyzed was carried out in this region (Table 1). The harbors monitored in Europe were: Port of Ghent, Belgium; Teesport, Sutton, and Langstone Harbours, Great Britain; Algeciras, Cadiz, Huelva, Pasajes, Bilbao, and La Coruña Ports, Spain; Port of Antwerp, Belgium; Porto Marghera and Chioggia Harbour, in Italy; and Gdynia Harbour, Poland. The Puck Bay, Poland, which is used as a harbor area was also analyzed. Moreover, non-specified ports in Portugal (fishing, merchant and industrial ports) and Russia were also recorded.

After Europe, Asia had the second highest quantity of research on crustacean biomarkers and chemical analysis. The harbors monitored were: Posht Shahr, Zakeri, and Ramchah Ports, Iran; Manado, Bitung Ferry and Pertani Ports, Indonesia; Xiamen, Outer, Victoria, and Tolo Harbours, China; Tokyo, Naha and Maruisi Harbors, Japan; and Haldia Port Complex, India.

North America ranked third and the ports studied were: Jordan and Hamilton Harbors, Canada; Snug, Great Kills, New York, New York/New Jersey, and Allen Harbors, United States of America; and Guaymas, Yavaros, Topolobampo, Mazatlan, and Puerto Vallarta Harbors, Mexico; and Argentina's main fishery port. In Oceania, Port Hacking, Port Hedland, and Sydney (Australia) and Otago Harbours (New Zealand) were monitored. Only one study was carried out in Africa (represented by Tunisia) and the ports were not specified.

#### 3.2 Biomonitors

We identified (in all papers analyzed) species that inhabit ports and shipyards (not only in the intertidal zone, but also where there is abundant human activity) that are ideal for monitoring coastal pollution. Two major crustacean groups (classes Malacostraca and Maxillopoda) used as biomonitors in harbor areas in the articles analyzed are discussed below.

### 3.2.1 Malacostraca

The Malacostraca are well-adapted to and thrive in port areas. The most often investigated orders in the studies we read were the Decapoda and Amphipoda (Table 2). Among the 26 species identified in the papers analyzed, the most frequently used biomonitor was the decapod *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758), which was used in 11 studies (Table 3), following by *Ovalipes trimaculatus* (De Haan, 1833), *Macrophthalmus (Hemiplax) hirtipes* (Heller, 1865), *Heloecius cordiformis* (Milne Edwards, 1837), *Paradorippe granulata* (Haan, 1841), *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758), *Palaemonetes pugio* (Holthuis, 1949). Among the Amphipoda the most frequently was *Hyaella azteca* (Saussure, 1858). The Isopoda, Stomatopoda, and Mysida have not been used in many studies.

### 3.2.2 Maxillopoda

Two Maxillopoda taxa, Cirripedia and Copepoda, are used as environmental bioindicators with their body lengths being used as a base (Table 2). The main species used in all papers analyzed were: *Balanus sp.*, *Fistulobalanus sp.*, *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854), *Tetraclita squamosa* (Bruguière, 1789), and *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854), *Semibalanus balanoides* (Linnaeus, 1767), *Tigriopus japonicus* (Mori, 1938) and *Tisbe battagliai* (Volkman-Rocco, 1972).

## 3.3 Biomarkers

We organized the cited biomarkers in all of the papers into three groups (effect, exposure, and both). Most of the articles (51%) indicated the use of effect biomarkers, 33% cited the use of exposure biomarkers, and 16% applied both types.

Biomarkers are also evidenced by biochemical, cellular, histological, physiological, or behavioral changes. Thus, knowing which analysis will allow assessment of these changes in animals is of paramount

importance. With this in mind, we ranked the types of methodologies based on biomarkers cited in the articles surveyed into four groups: biochemical, physiological, behavioral, and morphological (Table 4).

### 3.3.1 Biochemical Analysis

Biochemical changes are sensitive and specific indicators of a body's response to pollution exposure. The main biochemical analyses in crustaceans used by authors of papers were: superoxide dismutase (SOD), acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione disulfide (GSSG), catalase (CAT), lactate dehydrogenase (LDH), metallothionein (MT), malondialdehyde (MDA), metallothionein-like-proteins (MTLPs), and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD).

### 3.3.2 Physiological Analysis

Various individual physiological responses can be ecologically significant like cellular energy allocation (CEA) assay, energy reserves (proteins, lipids, and sugar) and consumption (as derived from cellular respiration rate), decrease in fertility and fecundity, a persistence in feeding inhibition even after the removal of the contamination.

### 3.3.3 Behavioral Analysis

There have been few studies at the functional level to objectively verify if and how animal behavior is modified at contaminated sites. The most behavioral analysis identified in crustaceans were: changes in dietary and predator-prey interactions, foraging and phototactic and geotactic behavior.

### 3.3.4 Morphological Analysis

The morphological analysis has not been used in many studies. However, the studies analyzed have been cited proportion of morphological abnormalities in crustaceans, like carapace morphology.

## 4. Discussion

Marine environment monitoring programs generally focus on identifying the best bioindicators and biomarkers to act as a prognostic tool for pollution levels (Tosti and Gallo 2012). This pattern seems to be followed by crustacean studies and is present in hundreds of investigations. However, an incipient number of

studies directly used crustacean biomarkers to monitor port areas. This is evidenced by the low number (only 46) validated in our analysis. These works span a period of 23 years and were published between the years 1992 and 2015.

The harbors cited in all of the above studies represent environments of economic importance and environmental impact (Bebianno et al. 2015). Stressors come from anthropogenic sources and economic and commercial activities, such as transport, vessel repair and painting, loading and refueling operations, shipyards, accidental spills, and wastewater emissions (Bocchetti et al. 2008). These factors contribute to the generation of chemical products (e.g., metals, polycyclic aromatic hydrocarbon - PAHs, and tributyltin - TBT) that may represent a risk to aquatic organisms residing in harbor areas (Bebianno et al. 2015). There is currently much concern about the environmental impact of harbor activities and how these chemical residues should be properly managed (Darbra et al. 2009). Considering that harbors are not independent units, but are integrated into population centers, they may have a direct influence on surrounding environments and related interests, such as fishing and recreation (Grifoll et al. 2011). That is why direct efforts for monitoring these areas are extremely relevant to society. In this way several researches have indicated that crustacean are important bioindicators for biomonitoring aquatic environments (Martín-Díaz et al. 2007a, b; Martín-Díaz et al. 2009, 2008a, b; Maria et al. 2009).

The most often investigated orders (Crustaceans) in the studies we read were the Decapoda and Amphipoda. The Malacostraca account for approximately half of all known crustacean species and include very popular representatives like crab, as well as an abundance of other smaller and lesser known but ecologically important species (Ruppert et al. 2005).

The decapods, the most well-known crustaceans including shrimp, lobsters, and crabs, are effective marine environment biomonitors (Depledge et al. 1993; MacFarlane et al. 2000; Fillmann et al. 2004; Martín-Díaz et al. 2007a, b; Koenig et al. 2008; Martín-Díaz et al. 2008a, b; Galassi et al. 2008; Martín-Díaz et al. 2009; Dissanayake and Bamber 2010; Dissanayake et al. 2010; Jebali et al. 2011; Seebaugh et al. 2011; Weis et al. 2011). Because of their large size, abundance, and ecological and economic importance, these crustaceans have been studied in more detail (Ruppert et al. 2005). Among the 26 species identified in the papers analyzed, the most frequently used biomonitor was the decapod *C. maenas*, which was used in 11 studies. This crab can accumulate various pollutants including heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs), and polychlorinated biphenyls (PCBs) (Fillmann et al. 2004; Martín-Díaz et al. 2007a, b; Martín-Díaz et al. 2008a),

and has proved to be an adequate indicator of environmental contamination (Astley et al. 1999; Fillmann et al. 2004; Martín-Díaz et al. 2007a, b; Martín-Díaz et al. 2009, 2008a, b; Maria et al. 2009).

In lower quantities, but with significant results, other crabs species are also effective for monitoring port areas. *O. trimaculatus* was analyzed for morphological changes in the carapace and the degree of the responses varied according to the marine pollution gradient (Lezcano et al. 2015). The small *Macrophthalmus (Hemiplax) hirtipes* proved suitable for monitoring PAH from metabolites in urine (Koenig et al. 2008). The semi terrestrial *H. cordiformis* is an effective bioindicator for lead monitoring and reflects ambient levels, indicating a possible cause for the morphological and population differences (MacFarlane et al. 2000). Nevertheless, in using *H. cordiformis* as a bioindicator for lead, size must be considered an important variable because smaller males have a tendency to accumulate higher concentrations (MacFarlane et al. 2000). Finally, we highlight *P. granulata* as an efficient bioindicator of trace metals (Depledge et al. 1993). The shrimp species, *C. crangon* is a suitable bioindicator for comparing aquatic environments polluted by persistent toxic substances (PTSs) (Galassi et al. 2008). Another shrimp species, *P. Pugio* may be associated with either metal or organic pollutant uptake in the hepatopancreatic epithelial cells (Seebaugh et al. 2011).

The Amphipoda habitat ranges from the abyssal depths along the sea and extends into fresh water and groundwater sources (Marsden and Rainbow 2004). They are relatively sensitive to many contaminants and are therefore potential bioindicators of disturbed communities (Johnston et al. 1992; Borgmann and Norwood 1993; Takeuchi et al. 2004; Mann et al. 2009; Guler and Ford 2010; Lysenko et al. 2014; Bartlett et al. 2015). This taxon has considerable potential for metal accumulation (Lysenko et al. 2014; Bartlett et al. 2015). *H. azteca*, a freshwater species, is useful for *in situ* analysis because it is ecologically important and tolerant to a variety of environmental conditions. It is accepted as a standard test organism for assessing water and sediment quality (Borgmann and Norwood 1993; Bartlett et al. 2015).

The Isopoda, Stomatopoda, and Mysida have not been used in many studies. However, it is worth noting that the isopod *Ligia exotica* (Roux, 1828) is easy to catch and is a good species for monitoring tributyltin (TBT), whereas *Harpiosquilla harpax* (Stomatopoda) (de Haan, 1844) is a potential trace metal contamination biomonitor and *Neomysis integer* (Mysida) (Leach, 1814) can be used as a bioindicator to evaluate toxic substances in the laboratory (Verslycke et al. 2004; Ng et al. 2007; Undap et al. 2013).

The Maxillopoda are usually recognizable by their shortened bodies, particularly the reduced abdomen and the absence of a complementary series of appendages (Brusca and Brusca 2015). The Cirripedia include benthic marine animals such as barnacles that become lodged in limestone plates (Ruppert et al. 2005).

Barnacles are efficient biomonitors reflecting increases in metal concentrations in the environment, and this has been demonstrated in *Balanus sp.*, *Fistulobalanus sp.*, *M. coccopoma*, *T. squamosa*, and *A. amphitrite* (Paez-Osuna et al. 1999; Rainbow and Blackmore 2001; Morillo and Usero 2008; Nasrolahi et al. 2014). High metal concentration in barnacles is indicative of high concentrations of metal in the environment (Rainbow and Blackmore 2001; Nasrolahi et al. 2014). Antioxidant enzymes are also potential biomarkers in these organisms, and *S. balanoides* has been used to assess marine ecosystems contaminated with PAHs (Niyogi et al. 2001). However, more taxonomic studies are needed for the Cirripedia because the main disadvantage of using them as biomonitors is the group's uncertain taxonomy (Paez-Osuna et al. 1999).

The copepods represent one of the largest crustacean taxa. They occur in high abundances and are dominant members of the plankton. They are the predominant item in the diet of many marine animals (Ruppert et al. 2005). Copepods have been used to investigate the relationship between exposure to metal and the antioxidant defense system (Astley et al. 1999; Wang and Wang 2010), as a variety of environmental contaminants can induce oxidative stress. *T. japonicus* and *T. battagliai* are appropriate bioindicators for the analysis of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, reduced glutathione (GSH), acetylcholinesterase, and metallothionein (Astley et al. 1999; Wang and Wang 2010).

The groups and species presented here are useful bioindicators for monitoring harbor areas. Previous studies have suggested that the crustaceans are doing better in contaminated environments than other groups, specifically fish (Weis et al. 2011). However, before choosing a bioindicator, more detailed studies of the animal's life cycle are necessary because some taxa may have inherent characteristics that mean they are more or less affected by adverse environmental conditions (Fent 2004). Once the species was selected several biomarkers analyses can be carried out.

Effect biomarkers “include measurable biochemical, physiological or other alterations within tissues or body fluids of an organism that can be recognized as associated with an established or possible health impairment or disease” (Van der Oost et al. 2003). Biomarkers that reflect the distribution of an exogenous substance, or are “the product of an interaction between a xenobiotic agent and some target molecule or cell that is measured in a compartment within an organism” were considered exposure biomarkers (Van der Oost et al. 2003). If we consider that biochemical changes precede structural damage, the detection of these biological changes enables early identification of excessive exposure and intervention to prevent an irreversible effect (Wang and Wang 2010; Jebali et al. 2011).

Biochemical analysis in crustaceans in the papers investigated mainly focused on enzyme activity, i.e., SOD, AChE, GST, GPx, GR, GSSG, CAT, LDH, MT, MDA, MTLPs, and EROD (Astley et al. 1999; Niyogi et al. 2001; Martín-Díaz et al. 2007b; Martín-Díaz et al. 2008b; Martín-Díaz et al. 2009; Maria et al. 2009; Wang and Wang 2010; Jebali et al. 2011).

The AChE enzyme is primarily inhibited by exposure to pesticides, heavy metals, and PAHs at higher concentrations (Jebali et al. 2011; Bartlett et al. 2015). Thus, measurement of AChE activity in aquatic organisms is a potential biomarker for the effects of environmental contaminants (Jebali et al. 2011). Starting from a combination of responses *in situ* (survival of individuals and AChE activity) and chemical analysis (water quality and pesticides measurements), it is possible to characterize pesticide use and its effects, and to assess the severity of these effects and identify the causes of toxicity in complex mixtures (Bartlett et al. 2015).

Organisms exposed to heavy metals may increase oxidative stress enzyme activity, such as CAT, SOD, and GST (Atli and Canli 2007). CAT is a primary antioxidant defense component that acts on hydrogen peroxide decomposition ( $H_2O_2$ ) and hydrogenated compound oxidation (Aebi 1984). It is an important biomarker for biomonitoring (Maria et al. 2009; Jebali et al. 2011) because it increases activity when the organism is in oxidative stress (Maria et al. 2009). SOD is one of the main enzymes used in combating oxidative damage of reactive oxygen species (Gu et al. 2006). Additionally, it is an excellent marker of oxidative stress (Niyogi et al. 2001), particularly for nickel (Ni) exposure (Wang and Wang 2010).

Glutathione can be used in the reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms. The enzyme GR is responsible for the reduction of GSSG to GSH (Berg et al. 2004). The enzyme responsible for oxidation is GPx, and has an important role in detoxification of substances generated by xenobiotics, such as hydrogen peroxide and organic peroxides, and factors for the formation of GSSG (Tekman et al. 2008). GST in turn belongs to a family of multifunctional proteins involved in cellular detoxification and correction of the deleterious effects of xenobiotics. It catalyzes the GSH conjugation with compounds from either endogenous or exogenous pollutants to make them less toxic, more water soluble, and easier to degrade and excrete (Carletti et al. 2008).

GST is used in chemical pollutant monitoring programs, particularly heavy metals, because they alter their activity in the presence of these substances (Astley et al. 1999; Niyogi et al. 2001; Martín-Díaz et al. 2007, 2008, 2009; Maria et al. 2009; Wang and Wang 2010; Jebali et al. 2011). The response of GST depends on the species and the type of toxic substances, thus, specific studies are required for each substance (Wang and Wang 2010). GSH activity is inhibited during exposure to metals and its response is faster than that of the antioxidant and detoxification enzymes (e.g., SOD, GPx, and GST) (Wang and Wang 2010). Therefore, GSH could take the



first defense either by direct complexation with a metal or participation in the GPx and GST detoxification process (Sies 1999).

MT concentration in biological tissues measures detoxification in structures that have been damaged by links (reversible) to metal (Martín-Díaz et al. 2007a). The MT induction acts as a response to the measure of metal exposure (Martín-Díaz et al. 2007a; Jebali et al. 2011). Accordingly, MT induction is an early warning tool for the assessment of sediments contaminated by metals, making it a viable biomarker to monitor metal bioavailability in harbor areas (Martín-Díaz et al. 2007a). Analysis of MT and MDA levels in *C. maenas* have indicated that they are sensitive biomarkers (Martín-Díaz et al. 2008b; Maria et al. 2009; Martín-Díaz et al. 2009; Jebali et al. 2011).

LDH is a cytoplasmic enzyme that catalyzes the interconversion of pyruvate to lactate during glycolysis (Jebali et al. 2011). Furthermore, their activity can also be induced by oxidative stress in marine organisms, and changes in their levels can be used as a valid biomarker. This enzyme has been validated in *C. maenas* (Jebali et al. 2011).

Biochemical analyses mainly use a multivariate approach (CAT, GST, AChE, LDH, MDA, and MT) as was used by Jebali et al. (2011), which detects a wide range of possible effects of human activity on the health of crabs. Multivariate analysis techniques are an effective tool in interpreting biomarker data (Astley et al. 1999; Niyogi et al. 2001; Martín-Díaz et al. 2007; Martín-Díaz et al. 2008b; Martín-Díaz et al. 2009; Maria et al. 2009; Wang and Wang 2010; Jebali et al. 2011), considering that a single biomarker may not reflect the health status of a species (Jebali et al. 2011).

Exposure to an altered environmental factor will lead to physiological responses by organisms (Verslycke et al. 2004). This biological response can be interpreted as a simple organism's adaptive mechanism. However, if an organism's metabolism remains high for a long period it can become weakened, leaving it more susceptible to disease and predation (Lysenko et al. 2014). Various individual physiological responses can provide rapid measurements of an organism's energy status, which can be ecologically significant (Verslycke et al. 2004).

The cellular energy allocation (CEA) assay provides a valuable tool for the assessment of toxic substances and abiotic stress-induced physiological effects in the laboratory (Coen and Janssen 2003). In similar field conditions, CEA can provide valuable information on energy flow in ecosystems and the effects of chemicals on organisms (Novais and Amorim 2013). Energy reserves (proteins, lipids, and sugar) and consumption (as derived from cellular respiration rate) have been integrated as a general indicator of physiological stress, in which more polluted parts of a sampled area are characterized by a significant increase in

energy consumption, resulting in a significantly lower CEA (Verslycke et al. 2004). However, long-term field data are vital to the successful use of physiological biomarkers such as CEA (Coen and Janssen 2003).

A decrease in fertility and fecundity, a persistence in feeding inhibition even after the removal of the contamination (or removal of the organism from the contaminated site) (Mann et al. 2009), and significant induction at a concentration of vitellogenin/vitellin (Martín-Díaz et al. 2008a) can also be indicative of physiological damage. However, it should be emphasized that the key to interpreting field studies is to have a large database on the organism's normal condition and/or a good reference site to compare physiological responses (Verslycke et al. 2004).

There have been few studies at the functional level to objectively verify if and how animal behavior is modified at contaminated sites, and how changes in behavior and interactions can affect the trophic structure of the ecosystem (Guler et al. 2010; Weis et al. 2011). Behavioral biomarkers may provide a particularly sensitive measure at various levels of molecular, physiological, and ecological aspects of toxicology (McGaw et al. 1999; Scott and Sloman 2004). Changes in dietary and predator-prey interactions (Weis et al. 2011), foraging (Dissanayake et al. 2010), and phototactic and geotactic behavior can serve as valuable indicators of environmental quality, because they occur in response to the toxic effects of a pollutant and can have implications for the survival of the organism (Guler and Ford 2010).

Morphological responses to pollutants can be important indicators of heavy metal exposure (MacFarlane et al. 2000). The proportion of morphological abnormalities increases with pollution, which indicates the organism's level of exposure (Lê cadre and Debenay 2006). The *O. trimaculatus* carapace morphology was studied to verify its functionality as a biomarker of contaminated environments (Petriella and Boschi 1997). Exposure to pollutants can alter the natural process of ecdysis in crabs, as was evidenced by that changes observed in the *O. trimaculatus* carapace (Petriella and Boschi 1997). However, we should emphasize that carapace thickness was not altered by contamination (Lezcano et al. 2015). Thus, further analysis should be conducted in conjunction with this biomarker, given that this is a nonspecific indicator of the level of stress experienced by the organism during its development (Leung et al. 2003); high levels of asymmetry may also be caused by other factors such as agglomeration, temperature, and population density (Lezcano et al. 2015).

Although many species are exposed to pollutants, they are affected by contamination in different ways because of differences in sensitivity and vulnerability to pollutant exposure (Weis et al. 2011). It is very important to validate native species for each region in view of the increasing need for improved test organisms

and more appropriate methodologies (Freitas and Rocha 2011). Additionally, native species can differ in sensitivity compared with exotic species (Krull and Barros 2012).

Based on our review, we recommend that bioindicators and biomarkers are properly validated in field studies before being used in toxicological tests. This will illustrate the cause–effect relationship between the organism and the contaminant within the dynamics of the environment. However, we recommend avoiding the standardized alien species because they can contaminate the environment (bioinvasion) if they do not receive adequate treatment in the laboratory. The introduction of invasive species is considered a major cause of environmental damage (Miler et al. 2016), and is a contributing factor to the threat of extinction in many native species (Didham et al. 2005). However, little research has been performed to provide comprehensive information on knowledge and attitudes about invasive alien species (Olszanska et al. 2016). Thus, the prevention of new introductions of exotic species is the most effective way to reduce biological invasions (Olszanska et al. 2016).

We also suggest that more effort is applied to identifying other types of bioindicators and biomarkers for monitoring harbor areas. Because port areas are critical for global economic exchange they remain one of the largest sources of marine pollution.

## **5. Conclusion**

The use of crustacean biomarkers for environmental monitoring has long been established. However, this methodology is underused for the specific monitoring of harbor areas and sites under the influence of port activities. The 46 studies presented here indicate the efficiency of this methodology for monitoring harbor pollutants. The use of biochemical biomarkers is especially efficient for this type of analysis, especially if used in a multi-biomarker approach.

## **Acknowledgements**

We thank the library of the State University of Maranhão (UEMA) for technical support, the Laboratory of Biomarkers in Aquatic Organisms (LABOAq) for assistance, and the Commission for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) for granting the MSc scholarship.

## **References**

Aebi H (1984) Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

Antó M, Arnau S, Buti E, Cortijo V, Gutierrez E, Sole M (2009) Characterisation of integrated stress biomarkers in two deep-sea crustaceans, *Aristeus antennatus* and *Nephrops norvegicus*, from the NW fishing grounds of the Mediterranean sea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (5): 1455–1462

Astley KN, Meigh HC, Glegg GA, Braven J, Depledge MH (1999) Multi-variate Analysis of Biomarker Responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). *Marine Pollution Bulletin*, 39(1): 145-154

Atli G, Canli M (2007) Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 145(2): 282-287

Bartlett AJ, Struger J, Grapentine LC, Palace VP (2015) Examining impacts of current-use pesticides in Southern Ontario using in situ exposures of the amphipod *Hyaella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(5):1224-1238

Bebianno MJ, Pereira CG, Reya F, Cravo A, Duarte D, D'Errico G, Regoli F (2015) Integrated approach to assess ecosystem health in harbor areas. *Science of the Total Environment*, doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.01.050

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2004) *Biochemistry*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Blackmore G, Morton B, Huang ZG (1998) Heavy Metals in *Balanus amphitrite* and *Tetraclita squamosa* (Crustacea: Cirripedia) Collected from the Coastal Waters of Xiamen, China. *Marine Pollution Bulletin*, doi:10.1016/S0025-326X(98)90029-7

Boets P, Lock K, Goethals PLM (2011) Using long-term monitoring to investigate the changes in species composition in the harbour of Ghent (Belgium). *Hydrobiologia*, doi:10.1007/s10750-010-0567-2

Borgmann U, Norwood WP (1993) Spatial and temporal variability in toxicity of Hamilton Harbour sediments: Evaluation of the *Hyalella azteca* 4-week chronic toxicity test. *Journal of Great Lakes Research*, doi:10.1016/S0380-1330(93)71199-5

Bocchetti R, Fattorini D, Pisanelli B, Macchia S, Oliviero L, Pilato F, Pellegrini D, Regoli F (2008) Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology*, doi: 10.1016/j.aquatox.2008.07.011

Brusca RC, Brusca GJ (2015) *Invertebrates*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Bucheli TD, Kent K (1995) Induction of cytochrome P450 as biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Review in Environmental Science Technology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10643389509388479>

Campos CJG (2004) Content analysis method: tool for the analysis of qualitative data in the health sector. *Revista Brasileira de Enfermagem* 57(5):611-614.

Cavalcante RB, Calixto P, Pinheiro MMK (2014) Content analysis: general considerations, relationships with the research question, possibilities and limitations of the method. *Informação & Sociedade: Estudos* 24(1): 13-18.

Carletti E, Sulpizio M, Bocciarelli T, Boccio PD, Federici L, Di Ilio C (2008) Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. *Aquatic Toxicology*, doi: 10.1016/j.aquatox.2008.07.015

Coen WM, Janssen CR (2003) The missing biomarker link: relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(7):1632-41.

Correia AD, Costa MH, Luis OJ, Livingstone DR (2003) Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 289(1): 83– 101.

Darbra RM, Pittam N, Royston KA, Darbra JP, Journee H (2009) Survey on environmental monitoring requirements of European ports. *J Environ Manag* 90(3): 1396–1403

Davanso MB, Moreira LB, Pimentel MF, Costa-Lotufo LV, Abessa DMS (2013) Biomarkers in mangrove root crab *Goniopsis cruentata* for evaluating quality of tropical estuaries. *Marine Environmental Research*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.02.006>

Davis JD, Macknight S (1990) *Environmental Considerations for Port and Harbor Developments*. USA: World Bank Technical.

Depledge MH, Fossi MC (1994) The role of biomarkers in environmental assessment in Invertebrates. *Ecotoxicology*, doi: 10.1007/BF00117081

Depledge MH, Forbes TL, Forbes VE (1993) Evaluation of Cd, Cu, Zn and Fe concentrations and tissue distributions in the benthic crab, *Dorippe granulate* (de Haan 1841) from Tolo Harbour, Hong Kong. *Environmental Pollution*, doi: 10.1016/0269-7491(93)90023-H

Didham RK, Tylianakis JM, Hutchinson MA, Ewers RM, Gemmill NJ (2005) Are invasive species the drivers of ecological change? *Trends in Ecology & Evolution*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.006>

Dissanayake A, Bamber SD (2010) Monitoring PAH contamination in the field (Southwest Iberian Peninsula): Biomonitoring using fluorescence spectrophotometry and physiological assessments in the shore crab *Carcinus maenas* (L.) (Crustacea: Decapoda). *Marine Environmental Research* 70: 65-72

Dissanayake A, Piggott C, Baldwin C, Sloman KA (2010) Elucidating cellular and behavioural effects of contaminant impact (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) in both laboratory-exposed and field-collected

shore crabs, *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). Marine Environmental Research, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.07.004>

Fent K (2004) Ecotoxicological effects at contaminated sites. Toxicology, doi: 10.1016/j.tox.2004.06.060

Fillmann G, Watson G, Howsam M, Francioni E, Depledge MH, Readman J (2004) Urinary PAH Metabolites as Biomarkers of Exposure in Aquatic Environments. Environmental Science & Technology, 38(9): 2649-2656.

Freitas CE, Rocha O (2011) Acute toxicity teste with tropical zooplankton *Pseudosida ramosa*: The importance of using native species as test organisms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, doi: 10.1007 / s00244-010-9541-2

Galassi S, Bettinetti R, Neri MC, Jeannot R, Dagnac T, Bristeau S, Sakkas V, Albanis T, Boti V, Valsamaki T, Falandysz J, Schulte-Oehlmann U (2008) A multispecies approach for monitoring persistent toxic substances in the Gulf of Gdan' sk (Baltic sea). Ecotoxicology and Environmental Safety, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.015>

Grifoll M, Jordà G, Espino M, Romo J, García-Sotillo M (2011) A management system for accidental water pollution risk in a harbour: the Barcelona case study. Journal of Marine Systems, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmarsys.2011.02.014>

Gu J, Li Y, Xie L, Zhang R (2006) Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.005>

Guler Y, Ford AT (2010) Anti-depressants make amphipods see the light. Aquatic Toxicology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.019>

Jebali J, Ben-Khedher S, Ghedira J, Kamel N, Boussetta H (2011) Integrated assessment of biochemical responses in Mediterranean crab (*Carcinus maenas*) collected from Monastir Bay, Tunisia. *Journal of Environmental Sciences*, 23(10): 1714–1720.

Jha AN (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, doi: 10.1093/mutage/gen014

Johnston RK, Munns WR, Mueller C, Nelson WG, Pesch GG (1992) Marine ecological risk assessment pilot study for Allen Harbor, Narragansett Bay, Rhode Island

Keathley-Herring H, Van Aken E, Gonzalez-Aleu F, Deschamps F, Letens G, Orlandini PC (2016) Assessing the maturity of a research area: bibliometric review and proposed framework. *Scientometrics*, doi:10.1007/s11192-016-2096-x

Koenig S, Savage C, Kim JP (2008) Non-destructive assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure by fluorimetric analysis of crab urine. *Marine Pollution Bulletin*, doi: 10.1016/j.aquatox.2003.11.006

Krull M, Barros F (2012) Key Issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: A Critical Review. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, doi: 10.5132/jbse.2012.02.009

Lê Cadre V, Debenay JP (2006) Morphological and cytological responses of *Ammonia* (foraminifera) to copper contamination: Implications for the use of foraminifera as bioindicators of pollution. *Environmental Pollution*, doi: 10.1016/j.envpol.2005.11.033

Leung T, So'll I, Arnold SJ, Kemler R, Driever W (2003) Direct Binding of Lef1 to Sites in the *boz* Promoter May Mediate Pre-Midblastula-Transition Activation of *boz* Expression. *Developmental Dynamics*, 10.1002/dvdy.10408



Lezcano AH, Quiroga MLR, Liberoff AL, Van der Molen S (2015) Marine pollution effects on the southern surf crab *Ovalipes trimaculatus* (Crustacea: Brachyura: Polybiidae) in Patagonia Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.09.038

Lysenko L, Kantserova N, Käiväräinen E, Krupnova M, Shklyarevich G, Nemova N (2014) Biochemical markers of pollutant responses in macrozoobenthos from the White Sea: Intracellular proteolysis. *Marine Environmental Research*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.01.005>

MacFarlane GR, Booth DG, Brown KR (2000) The Semaphore crab, *Heloecius cordiformis*: bio-indication potential for heavy metals in estuarine systems. *Aquatic Toxicology*, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00083-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00083-7)

Mann RM, Hyne RV, Spadaro DA, Simpson SL (2009) Development and application of a rapid amphipod reproduction test for sediment-quality assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, doi: 10.1897/08-346.1

Marsden ID, Rainbow PS (2004) Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology—the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.009>

Maria VL, Santos MA, Bebianno MJ (2009) Contaminant effects in shore crabs (*Carcinus maenas*) from Ria Formosa Lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.04.013>

Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA (2007a) Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, doi: 10.1007/s00244-006-0121-4

Martín-Díaz ML, Kalman J, Riba I, Reguera DF, Blasco J, DelValls A (2007b) The use of a metallothionein-like-proteins (MTLP) kinetic approach for metal bioavailability monitoring in dredged material. *Environment International* 33: 463–468

Martín-Díaz ML, Sales D, DelValls TA (2008a) Toxicokinetic approach for the assessment of endocrine disruption effects of contaminated dredged material using female *Carcinus maenas*. *Ecotoxicology*, 10.1007/s10646-008-0203-3

Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA (2008b) Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environmental Pollution*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2007.03.019>

Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA (2009) The use of a kinetic biomarker approach for in situ monitoring of littoral sediments using the crab *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.04.005>

McCarthy JF, Shugart LR (1990) Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy JF, Shugart LR (Eds.) *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

McGaw IJ, Reiber CL, Guadagnoli JA (1999) Behavioral physiology of four crabs species in low salinity. *Biological Bulletin* 196: 163-176.

Miler PS, Lacy RC, Medina-Miranda R, López-Ortiz R, Díaz-Soltero H (2016) Confronting the invasive species crisis with metamodel analysis: An explicit, two-species demographic assessment of an endangered bird and its brood parasite in Puerto Rico. *Biological Conservation*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2016.01.029>

Moreira SM, Moreira-Santos M, Guilhermino L, Ribeiro R (2006) An in situ postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations. *Environmental Pollution*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2005.05.004>

Morillo J, Usero J (2008) Trace metal bioavailability in the waters of two different habitats in Spain: Huelva estuary and Algeciras Bay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.01.016>

Nasrolahi A, Smith BD, Ehsanpour M, Afkhami M, Rainbow OS (2014) Biomonitoring of trace metal bioavailabilities to the barnacle *Amphibalanus amphitrite* along the Iranian coast of the Persian Gulf. *Marine Environmental Research*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.07.008>

Niyogi S, Biswas S, Sarker S, Datta AG (2001) Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relations with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00257-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00257-9)

Ng JSS, Lui KKY, Lai CH, Leung KMY (2007) *Harpisquilla harpax* (Crustacea, Stomatopoda) as a biomonitor of trace metal contamination in benthic sediments in Hong Kong waters. *Marine Pollution Bulletin*, doi: [10.1016/j.marpolbul.2007.05.016](http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.05.016)

Novais SC, Amorim MJ (2013) Changes in cellular energy allocation in *Enchytraeus albidus* when exposed to dimethoate, atrazine, and carbendazim. *Environmental Toxicology and Chemistry*, doi: [10.1002/etc.2368](http://dx.doi.org/10.1002/etc.2368)

Olszanska A, Solarz W, Najberek K (2016) To kill or not to kill—Practitioners' opinions on invasive alien species management as a step towards enhancing control of biological invasions. *Environmental Science & Policy*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envsci.2016.01.008>

PAez-Osuna F, Bdjorquez-Leyva H, Ruelas-Inzunza J (1999) Regional variations of heavy metal concentrations in tissues of barnacles from the subtropical pacific coast of Mexico. *Environment International*, doi: [10.1016/S0160-4120\(99\)00032-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120(99)00032-X)

Pereira P, Pablo H, Subida MD, Vale C, Pacheco M (2008) Biochemical responses of the shore crab (*Carcinus maenas*) in a eutrophic and metal-contaminated coastal system (O'bidos lagoon, Portugal). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.12.012>

Petriella AM, Boschi EE (1997) Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina. *Investigaciones Marinas*, doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-71781997002500010>

Rainbow PS, Blackmore G (2001) Barnacles as biomonitores of trace metals availabilities in Hong Kong coastal waters: changes in space and time. *Marine Environmental Research*, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00254-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00254-3)

Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD (2005) *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. Roca: São Paulo.

Seebaugh DR, L'Amoreaux WJ, Wallace WG (2011) Digestive toxicity in grass shrimp collected along an impact gradient. *Aquatic Toxicology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.015>

Sies H (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00177-X)

Stanek K, Drobne D, Trebs P (2006) Linkage of biomarkers along levels of biological complexity in juvenile and adult diazinon fed terrestrial isopod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea). *Chemosphere*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.070>

Takeuchi I, Takahashi S, Tanabe S, Miyazaki N (2004) Butyltin concentrations along the Japanese coast from 1997 to 1999 monitored by *Caprella spp.* (Crustacea: Amphipoda). *Marine Environmental Research*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2003.11.005>

Tekman B, Ozdemir H, Senturk M, Ciftci M (2008) Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.005>

Tosti E, Gallo A (2012) Best Biomarker and Bioindicator for Marine Environmental Pollution. *Journal of Marine Science: Research & Development*, doi: 10.4172/2155-9910.1000e101

Undap SL, Matsunaga S, Honda M, Sekiguchi T, Suzuki N, Khalil F, Qiu X, Shimasaki Y, Ando H, Sato-Okoshi W, Sunobe T, Takeda S, Munehara H, Oshima Y (2013) Accumulation of organotins in wharf roach (*Ligia exotica Roux*) and its ability to serve as a biomonitoring species for coastal pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.06.019

Verslycke T, Ghekiere A, Janssen CR (2004) Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2004.01.014>

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

Wang M, Wang G (2010) Oxidative damage effects in the copepod *Tigriopus japonicus* Mori experimentally exposed to nickel. *Ecotoxicology*, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

Weis JS, Bergey L, Reichmuth J, Candelmo A (2011) Living in a Contaminated Estuary: Behavioral Changes and Ecological Consequences for Five Species. *BioScience*, doi: <http://dx.doi.org/10.1525/bio.2011.61.5>

**Table 1** Countries that use either biomarkers or chemical analysis in crustaceans to monitor harbor areas, according to the 46 studies analyzed

<b>Continent</b>	<b>Countries</b>	<b>Percentage of Work</b>
Europe	Belgium, Great Britain, France, Germany, Portugal, Russia, Italy, and Spain	43%
Asia	China, India, Indonesia, Iran, and Japan	25%
America	Canada, Mexico, United States, and Argentina	19%
Oceania	Australia and New Zealand	11%
Africa	Tunisia	2%

---

**Table 2** Percentage of orders/classes used for biomonitoring in harbor areas

<b>Orders/Infraclass/Superclass</b>	<b>Class</b>	<b>Percentage</b>
Decapoda <sup>O</sup>	Malacostraca	55%
Amphipoda <sup>O</sup>	Malacostraca	18%
Isopoda <sup>O</sup>	Malacostraca	2%
Stomatopoda <sup>O</sup>	Malacostraca	2%
Mysida <sup>O</sup>	Malacostraca	2%
Cirripedia <sup>IC</sup>	Maxillopoda	14%
Copepoda <sup>SC</sup>	Maxillopoda	7%

---

Order (O), Infraclass (IC) and Superclass (SC).

**Table 3** Studies that have used *Carcinus maenas* as biomarkers to monitor either port areas or sites that receive contaminant inputs from harbors.



Specimen	Analysis	Country	Harbor	Reference
<i>Carcinus maenas</i>	CAT, GST, LDH, AChE, MT, and MDA	Tunisia	Fishing harbor	Jebali et al. (2011)
<i>Carcinus maenas</i>	Hemocyte phagocytic capability and total hemolymph antioxidant status	Japan	Harbors unspecified*	Dissanayake et al. (2011)
<i>Carcinus maenas</i>	Pyrene-type metabolites, behavior, and heart rate	Great Britain	Sutton Harbour	Dissanayake et al. (2010)
<i>Carcinus maenas</i>	Metabolite fluorescence in urine (NAPs, PYRs, and BAPs)	Spain	Port of Algeciras Port of Gibraltar	Dissanayake and Bamber (2010)
<i>Carcinus maenas</i>	CAT, GPX, GR, GST, GSht, MT, and GSSG + GSH	Portugal	Fishing harbour unspecified	Maria et al. (2009)
<i>Carcinus maenas</i>	MTs, EROD, GST, and GPX	Spain	Port of Cadiz Port of Huelva Port of Pasajes Port of Bilbao	Martín-Díaz et al. (2009)
<i>Carcinus maenas</i>	MTLPs, EROD, GST, GPX, and GR	Spain	Port of Cadiz Port of Huelva	Martín-Díaz et al. (2008)b

Port of Pasajes

Port of Bilbao

<i>Carcinus maenas</i>	Vitellogenesis process alteration and PAH, PCBs, Hg, Pb, and Zn concentrations	Spain	Ría of Huelva, La Coruña, and Bay of Cádiz Ports	Martín-Díaz et al. (2008a)
<i>Carcinus maenas</i>	MT	Spain	Ría of Huelva, La Coruña, and Bay of Cádiz Ports	Martín-Díaz et al. (2007)a
<i>Carcinus maenas</i>	Concentration of metals, MT, EROD, GPX, GST, and GR	Spain	Cádiz, Huelva, Pasajes, and Bilbao Ports	Martín-Díaz et al. (2007)b
<i>Carcinus maenas</i>	Feeding quantification	Portugal	Industrial harbor*	Moreira et al. (2006)
	Toxicity tests		Mercantile harbor*	
<i>Carcinus maenas</i>	PAH metabolite levels in the urine	Great Britain	Sutton Harbour	Fillmann et al. (2004)
<i>Carcinus maenas</i>	GP, GST, MT, and Neutral red retention time (RT)	Great Britain	Teesport*	Astley et al. (1999)

---

\*Responsible for the main environmental pollutants

**Table 4** Types of crustacean biomarkers used in 46 studies and their respective percentages

<b>Types of methodology based on biomarkers</b>	<b>Percentage of analyses performed</b>
Biochemichal analysis	69%
Physiological analysis	16%
Behavioral analysis	11%
Morphological analysis	4%

# Reviews of Environmental Contamination and Toxicology

Continuation of Residue Reviews

Series Ed.: **de Voogt**, Pim

Volumes 1-97 published with the title: Residue Reviews. Residues of Pesticides and Other Contaminants in the Total Environment

ISSN: 0179-5953

## *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

## *Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

## *Online Submission*

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

## *Title Page*

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

## *Abstract*

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

## *Text Formatting*

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

### *Headings*

Please use no more than three levels of displayed headings.

### *Abbreviations*

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### *Footnotes*

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### *Acknowledgments*

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

### **Scientific style**

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

### **Scientific style**

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

### **References**

#### *Citation*

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

## Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article  
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8  
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:  
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
  - Article by DOI  
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
  - Book  
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
  - Book chapter  
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
  - Online document  
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
  - Dissertation  
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
- Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see
- [ISSN LTWA](#)  
If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

## Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

### **English Language Support**

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.
- [English language tutorial](#)
- [Nature Research Editing Service](#)
- [American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

### **Conflict of interest**

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

## 5.2 Branchial lesions and biometric analysis of mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) as indicators of impact status in a port area of Northeast Brazil <sup>†</sup>

Ticianne S. O. Mota Andrade<sup>1\*</sup>, Debora M. S. Santos<sup>2</sup>, Wanda S. Batista<sup>3</sup>, Gleison A. Campos<sup>4</sup>, Jonatas S. Castro<sup>5</sup>, Eliane Braga Ribeiro<sup>6</sup>, Raimunda N. F. Carvalho-Neta<sup>7</sup>

<sup>1,4,5</sup> Postgraduate Program of Aquatic Resources and Fishery (PPGRAP/UEMA), State University of Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luís, Maranhão, Brazil

<sup>3</sup> Course in Biological Sciences (CCB/UEMA), State University of Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luís, Maranhão, Brazil

<sup>6</sup> Postgraduate Program of Animal Science, State University of Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luís, Maranhão, Brazil

<sup>2,7</sup> Department of Chemistry and Biology, State University of Maranhão (UEMA), Postgraduate Program of Aquatic Resources and Fishery (PPGRAP/UEMA), Campus Paulo VI, São Luís, Maranhão, Brazil

\*Corresponding author: Ticianne de Sousa de Oliveira Mota Andrade. E-mail: [ticiannedeoliveira@gmail.com](mailto:ticiannedeoliveira@gmail.com); Telephone: +55 98 98168-3006

### Acknowledgement

We would like to acknowledge the Laboratory of Biomarkers in Aquatic Organisms (LABOAq) and Research Group in Biology and Aquatic Environment (BioAqua) for technical support. We thank to Technological Development – FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão), for financial support and Commission for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) for granting the MSc scholarship.

---

<sup>†</sup> Este artigo foi submetido para publicação em Archives of Environmental Contamination and Toxicology. ISSN: 1432-0703 (electronic version). Fator de impacto: 1,895. Qualis B1(2014) para a área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros.



## Abstract

This study analyzes the potential impact of port activity on biometrics and branchial morphology of mangrove crab *Ucides cordatus* in a port area of São Luís Island (Brazil). For this, crabs were caught in a port area (potentially contaminated) and a reference area (uninhabited island that has no port areas). Biometric data were recorded and gills samples were extracted. After the usual histological processing the gills were examined under a light microscope. This analysis showed a greater amount of histological changes in the crabs captured in the port area. Biometric data indicated that the crabs of the reference area showed size and weight significant higher ( $P < 0.05$ ) than those from port area. These results suggest that the modifications presented by *U. cordatus* of the port area are result of interaction with a reduced environmental quality of the ecosystem. *U. cordatus* proved effective for monitoring impacts, acting as important bioindicator of port area contaminated by various xenobiotics.

**Keywords:** Biomarker; Crab; Mangrove; Port area.

## 1. Introduction

Harbor operations can generate numerous contaminants with significant effects on aquatic biota, especially regions with finer sediments (silt), such as mangrove (Bayen 2012). Mangroves correspond to one of the most threatened tropical ecosystems and studies have shown that particularly those that receive inputs anthropogenic contain a multitude of chemical contaminants (on a broad range of concentrations) which are potentially toxic to organisms (Krahn et al. 1994; Amaral et al. 2009; Bayen 2012). Thus, benthic species living in direct contact with the sediments are particularly exposed to chemical stress.

Crustacea have the ability to accumulate chemical contaminants (by different routes) but they are resistant to its toxicity and they can be used to monitor the contamination of the marine environment (Cossa 1989; Nudi et al. 2007). The *U. cordatus* crab is an excellent bioindicator of pollution of mangroves that may suffer various types of changes under the influence of xenobiotics (Nudi et al. 2007; Pinheiro et al. 2013). It is an endemic species of mangroves and potentially bioaccumulating metals (Santos 2002; Pinheiro et al. 2012). It is characterized as an important resource originating from Brazilian mangroves which feeds mainly on organic material and it has an important ecological role (Nordhaus et al. 2006). It is a fishing resource much explored in the North region of Brazil (Pinheiro et al. 2012). However, there are few studies that evaluate the health of these organisms used in regional cuisine of the Brazilian coast.

Histopathology of gills of crustaceans has been increasingly recognized as a valuable tool for assessing the impacts of pollutants on aquatic animals (Doughtie and Rao 1984; Compere et al. 1989; Lawson et al. 1995; Bhavan and Geraldine 2000; Frías-Espericueta et al. 2008; Martín-Díaz et al. 2008; Lei et al. 2011; Maharajan et al. 2015; Chupani et al. 2016). Gills are the first organs that comes in contact with environmental pollution. They are highly vulnerable to toxic chemicals, mainly because its large surface area facilitates interaction and absorption (Negro et al. 2015). Thus, the absorption of contaminants through gills is fast, accordingly, toxic responses are also fast (Pandey et al. 2011), and make this an important organ for monitoring environmental, considering the vital physiological functions performed by it.

The ability to handle with environmental stress can also be costly in terms of energy. It is known that in a healthy population, the size is linked to age of the animal (Moureaux et al. 2011). However, the ability to handle stress influences the amount of energy that is invested in the growth of benthic invertebrates, and could cause a consequent reduction in body size of the individual (Moureaux et al. 2011). Thus, biometric measurements are also useful data to assess the health of estuarine organisms. On the other hand, few studies made comparisons between the biometric data and gill lesions in crustaceans. In this study we analyzed the potential impact of port activity on biometrics and branchial morphology of mangrove crab *Ucides cordatus* caught from a harbor area and in a reference area in São Luís Island (Brazil).

## 2. Material and methods

### 2.1 Study area

São Marcos Bay is an important fishing location and has the most important harbor in northeastern Brazil. In the last decade, chemical contamination, as well as the incorrect use of resources, it has aggravated the environmental impact and thereby led to a growing threat to the health of aquatic organisms (Carvalho-Neta et al. 2012). Heavy metals are the main pollutants and derive from industrial activities, through the three maritime terminals located in the estuarine complex, which are the Port of Itaqui, VALE and ALUMAR / ALCOA (Carvalho-Neta and Abreu-Silva 2010). Previous studies of sediment and water in the harbor area showed significantly higher levels of mercury and chromium, which confirms that the port area in the estuarine area of São Marcos is a high risk of exposure to some contaminants (Carvalho-Neta and Abreu-Silva 2010; Carvalho-Neta et al. 2012; Sousa et al. 2013). In contrast, the island used as reference área is located in São José Bay and has no port enterprise in its proximity. Just like, do not receive other direct human interference becoming a sanctuary for many species. In view of this, we chose the island of Facão in the São José Bay as the reference area in this study (Fig. 1).

### 2.2 Material and sampling

From August 2015 to December 2015 were collected 160 adult male crab (80 in each area). With the help of artisan fishermen the specimens were randomly collected from within their hole by the technique known as "braceamento". This technique is the introduction of the arm in the hole, and use only hand to catch crab.

With the aid of a precision pachymeter 0.1cm biometric data were recorded such as carapace width (CW), carapace length (CL) and length chelate propodus (LCP). The total weight (TW) was recorded from a precision balance 0.1g. Next, the crabs were immediately dissected with a sterile scissors and gill samples were also removed in the field. The material extracted from each specimen was fixed in Davidson solution and transported to the Laboratory of Biomarkers in Aquatic Organisms (LABOAq) of the State University of Maranhão (UEMA). After 24 hours the samples were rinsed and kept in 70% alcohol to the usual histological processing.

To perform the analysis of the tissues, the samples were dehydrated in ascending series of alcohols, diaphanized in xylol impregnated and embedded in paraffin. Transverse sections of approximately 5µm thick, were stained with hematoxylin and eosin (HE). In light microscopy we analyzed two cuts for each body of each animal. The changes were identified based on Maharajan et al. (2015), Negro (2015), Vasanthi et al. (2014), Rebelo et al. (2000) and Bernet et al. (1999) "modified" and photomicrographed (AXIOSKOP – ZEIS microscope).

The region studied has only two defined seasonal periods: rainy (from January to June) and dry season (from July to December) according to INMET (2016). The Bray-Curtis similarity coefficient was used to evaluate similarity among branchial lesions in each period of the year (dry and rainy period). The unweighted paired group mean (UPGMA) clustering algorithm was employed to form dendrograms depicting similarity among branchial lesions.

The results were expressed in percentage and mean  $\pm$  standard deviation to biometric data (CW, CL, LCP and TW). The t-test was used to determine significant differences between groups (contaminated site and reference site) and just  $p < 0.05$  it was accepted as significant. As well as a frequency distribution by size classes was performed to carapace width (CW) and total weight (TW).

### 3. Results

#### 3.1 Branchial Histology

Gill histology of *U. cordatus* follows a similar pattern previously described for other species of crabs (Fig. 2). The gills are formed from a number of lamellae arranged in series (in pairs) along a control gill stem. The central axis corresponds to the primary gill tissue lamella (PL) it further divides into secondary gill lamellae (SL). The lamellae showed thin layer of cuticle and continuous layer of epithelial cells. The cell layers in each leaflet are regularly connected by pilaster cells (PC) that form the pillars across the hemolymph space. The periphery of each lamella was expanded to form a marginal canal (MC). Between the lamellae secondary, water channels were aligned parallel to each other.

#### 3.2 Branchial Alterations

The lesions are quantified in Table 1. The percentage of crabs exhibiting pathologies was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the port area than in the reference area.

**Table 1** Percentage of specimen affected (gills of *U. cordatus*)

Identified Alterations	Port Area	Reference Area
Pillar cells disruption	98%	17%
Necrosis	65%	0%
Cuticle detachment and disruption	61%	27%
Marginal channel deformation	70%	19%
Hemocytic infiltration	49%	0%
Disarrangement of secondary lamellae	33%	0%
Enlargement of secondary lamellae	21%	0%

Especially in crabs from port area were identified necrosis, detachment and disruptions of cuticle, marginal channel deformation, hemocytic infiltration, disarrangement and enlargement of secondary lamellae (Fig. 3). Only crabs from port area showed a collapse of the secondary lamellae (Fig. 2B, 2C). This may represent the adverse conditions of the area, considering that this type of disorder tends to occur after necrosis and rupture of pilaster cells.

As for the similarity analysis, both for the dry season as rainy the highlight is the displacement or disruption of the cuticle (DRC) and necrosis (NEC), followed by deformation of the marginal channel (DCM) and disarrangement of secondary lamella (DLS) (Fig. 4A and 4B).

### 3.3 Biometry of specimens

The mean and standard deviation of biometric data of analyzed crabs are quantified in Table 2. The analysis of the biometric data indicated that crabs from reference area are significantly ( $p < 0.05$ ) bigger and heavier than crabs caught in potentially contaminated area.

**Table 2** Biometric data of *U. cordatus* caught in contaminated area and reference area (mean  $\pm$  SD)

Area	CW (cm)	CL (cm)	LCP (cm)	TW (g)
Contaminated	5,17 $\pm$ 0,31	4,58 $\pm$ 0,34	5,56 $\pm$ 0,91	90,27 $\pm$ 21,72
Reference	6,73 $\pm$ 0,61	5 $\pm$ 0,48	6,08 $\pm$ 0,97	140,94 $\pm$ 34,21*

\*Indicates significant differences between sites ( $P < 0.05$ ). Total number of crabs = 160. Biometric data: carapace width (CW), carapace length (CL), length chelate propodus (LCP), total weight (TW).

The frequencies of distribution by size class of the CW and TW for specimens of the two areas studied are showed in figure 5A and 5B. Crabs from reference area were recorded in all size class, whereas crabs from potentially contaminated area did not reach the largest classes. For CW more than half of the individuals from port area (57%) were included in the class 6,0-6.5cm. While for the reference area 73% of the specimens were almost equally divided in classes 6,5-7,0cm 7,0-7,5cm (CW).

As for TW, the largest number of individuals (88%) of the port area was identified in the size class 41-81g and 81-121g. While for reference area 75% are in classes 121-161g and 161-201g.

## 4. Discussion

In the present study, the branchial lamellae of crabs of the reference area showed a very thin cuticle, a single layer of epithelial cells and cells pillar characteristics. In contrast, gills of crabs from potentially contaminated area exhibited lamellar collapse and deformed marginal channels. A similar result was found for the crab *Scylla serrata* in contamination assessment by heavy metals (Vasanthi et al. 2014). Similar results were found for *Chasmagnathus granulata* and *Zilchiopsis collastinensis* crabs. In these crabs were detected structural changes and necrosis involving rupture of the pillar cells after exposure to the contaminant, which consequently led to an extension of necrotic epithelial tissue and cuticle causing a reduction in the hemolymph space (Rebelo et al. 2000; Negro 2015). The reduction of this space results in a restriction of respiratory gas exchange, and obviously there is a reduction of O<sub>2</sub> dissolved in the hemolymph, leading to an increase in anaerobic metabolism and

accumulation of lactate and CO<sub>2</sub>, with consequent asphyxia (Tamse et al. 1995; Rebelo et al. 2000; Revathi et al. 2011; Vasanthi et al. 2014; Negro 2015). Since this is an example of how the commitment of branchial function can cause serious damage to the populations of contaminated areas crabs.

Similar lesions to those identified in this study are reported for various species after exposure to various types of heavy metals. In these studies there was a sharp increase of abnormalities compared to the control group (Victor et al. 1990; Mazon et al. 2004; Revathi et al. 2011; Vasanthi et al. 2012; Vasanthi et al. 2014). Changes and cell degeneration has been described as a negative effect of pollutants in the gill epithelia and this description generally refers to death of cells by necrosis. While the hemocytic infiltrations cause the lamellae become elongated and consequently the water channels become enlarged (Vasanthi et al. 2014). Thus, may suggest that the branchial lesions observed probably occur due to the effect contaminants that are present in higher concentrations in the port area (Carvalho-Neta; Abreu-Silva 2010; Carvalho-Neta et al. 2012; Sousa et al. 2013). Previous studies of sediment and water in the port area in the São Marcos Bay had significantly higher levels of mercury and chromium, which confirms that this area is a place with high risk of exposure to some contaminants (Carvalho-Neta; Abreu-Silva 2010; Carvalho-Neta et al. 2012; Sousa et al. 2013). It is possible that contaminants in the port area may be causing the alterations identified in crabs.

As for the similarity of patterns identified for the gill lesions of crabs of the port area, the strong correlation between displacement or disruption of the cuticle (DRC) and necrosis (NEC) can be explained by the fact that a disintegrated cuticle facilitates contaminates input (possibly greater amount), which may lead to more severe tissue damage such as necrosis. Studies indicate that a healthy cuticle layer plays an important protective role in the gills of crabs (Vasanthi et al. 2014). Furthermore, the relationship between deformation of the marginal channel (DCM) and disarrangement secondary lamella (DLS) can be explained by the fact that the marginal channels are the starting point of water input. In this case, the deformation of the marginal channel is given from its expansion, as if it was an attempt to prevent the entry of contaminants carted from the water. Scientific research indicates that DLS is a characteristic change in crabs exposed to higher concentrations of contamination (Maharajan et al. 2015).

The gills are the primary respiratory organ in crabs and they are also responsible for other vital physiological functions such as excretion, acid-base and ion regulation (Maharajan et al. 2015). When the crabs are exposed to environmental pollutants the vital functions of gills are deleteriously affected and this functional compromise may significantly prejudice the crabs health (Maharajan et al. 2015). However, some histopathologic effects on gills may be reversible provided there is a recovery after the decrease in exposure concentration (Negro 2015).

The changes in architecture gill alter the diffusion capacity of the gill and respiration can become a problematic task for the crab can have serious consequences (Vasanthi et al. 2014; Maharajan et al. 2015). There are several reports in the literature on the histopathological effects of pollutants in the crustacean gills (Doughtie and Rao 1984; Lawson et al. 1995; Bhavan and Geraldine 2000; Stentiford and Feist 2005; Frías-Espericueta et al 2008; Martí-Díaz et al. 2008; Lei et al. 2011; Vasanthi et al. 2014; Maharajan et al. 2015; Negro 2015). In Brazil, for the mangrove crab *U. cordatus*, Cd, Cu, Cr and Mn were identified with the highest accumulation in the hepatopancreas, followed by the gills (Pinheiro et al. 2012).

Concerning biometrics data in *U. cordatus* from São Luís Island (Brazil), similar results were also found for different species of crabs caught in a mangrove impacted by human actions that have reached sizes smaller than

those of less impacted areas (Santos et al. 2001; Castiglioni, Negreiros-Fransozo 2004, 2006; Benetti and Negreiros-Fransozo 2004). These results corroborate studies that showed the ability to deal with stress influences the quantity of energy that is invested in the growth of benthic invertebrates (Moureaux et al. 2011). For the port area of this study, a pattern similar to that found in our results was also observed for the catfish *Sciades herzbergii* when fish of the reference area were larger and heavier than the fish from the port area (Carvalho-Neta et al. 2014).

The structure and dynamics of natural populations is strongly related to the functioning of ecosystems (Lima et al. 2010). Thus, the main concern about the conservation of *U. cordatus* should be related to environmental conditions of the mangroves, as these crabs have a closely ecological relationship with this ecosystem.

In São Luís Island, previous studies found average size of 4.3 cm (CL) and 6.0cm (CW) to the southwest of the island and 5.6 cm (CW) and 4.4 cm (CL) to the region of the Lençóis Maranhenses (Lima et al. 2010). In the states of Piauí, Rio Grande do Norte and Pernambuco, the average sizes were found to CL and CW was 4.4 and 5.7cm; 4.0 and 5.2 cm; 3.7 and 4.8cm, respectively (Ivo et al. 2000). Therefore, a comparison of biometric data of *U. cordatus* does not show a national or regional pattern morphometric (Moura and Coelho 2004; Lima and Oshiro 2006). However, such studies are important, given that a reduced environmental quality may be responsible for changes in population parameters (and reproductive) of *U. cordatus* (Moraes et al. 2015), suggesting a relationship between length and weight of crabs with the physicochemical characteristics of mangroves (Paiva 1997).

The distribution of specimens by class size showed a predominance of individuals in the largest classes for crabs in the reference area. This is a characteristic common in populations with higher longevity (Hartnoll et al. 2009). It is also worth noting that a population lives in an environment rich in food resources, its crabs are likely to grow faster (Castiglioni et al. 2013). Thus, the smaller size of crabs of the port area can represent a decrease of function of the growth rate (Diele et al. 2005). This pattern has also been described for other species of crab (Leme 2002; Gregati and Negreiros-Fransozo 2009; Hartnoll et al. 2009). These results seem to agree with our presupposition that the port area is subject to numerous contaminants prejudicial to local biota. In contrast, the reference area appears to have less impact and therefore receives less contamination.

Although *U. cordatus* is classified as a highly resistant specie (Andrade et al. 2007; Moraes et al. 2015), diffuse sources of pollution in mangroves can threaten the stability of the specie (Moraes et al. 2015), causing various types of alterations as a result of interaction with the impacted environment.

The results presented here corroborate the assumption that the impact of contaminants on the organisms can be assessed through the use of sentinel organisms and biomarkers to cell, tissue and organism levels (Van der Oost et al. 2003). Histological biomarker by organisms exposed to contaminants has been a useful tool in the characterization of the state of health of organisms and environmental impact assessment in port areas (Schramm et al. 2000; Gernhofer et al. 2001). Our data reflect the need for management measures areas under the influence of port activities in São Luís Island.

## 5. Conclusions

Histological and biometric data presented in this study suggest that *U. cordatus* is undergoing changes in many biological levels due to the interaction with the potentially contaminated ecosystem. *U. cordatus* proved effective for monitoring impacts, acting as important bioindicator of port area contaminated by various xenobiotics.

## References

- Amaral V, Penha-Lopes G, Paula J (2009) RNA/DNA ratio of crabs as an indicator of mangrove habitat quality. *Aquat Conserv* 19: 56–62
- Andrade CE, Vasconcelos JA, Oliveira SM, Ivo CTC (2007) Biologia e pesca do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), no estuário do rio Curimataú, município de Canguaretama – Rio Grande do Norte. *Bol Tec Cient CEPENE* 15: 31-41
- Bayen S (2004) Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: A review. *Environ Int* 48: 84–101
- Benetti AS, Negreiros-Fransozo ML (2004) Relative growth of *Uca burgersi* (Crustacea, Ocypodidae) from two mangroves in the southeastern Brazilian coast. *Iheringia Ser Zoo* 94:67-72
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T (1999) Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess. *Journ Fish Disea* 22: 25-34
- Bhavan PS, Geraldine P (2000) Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquat Toxicol* 50: 331–339
- Carvalho-Neta RNF, Abreu-Silva AL (2010) *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: An in situ study of estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). *Braz J Oceanogr* 58: 11-17
- Carvalho-Neta RNF, Torres AR, Abreu-Silva AL (2012) Biomarkers in catfish *sciades herzbergii* (teleostei: ariidae) from polluted and Non-polluted areas (São Marcos' Bay, northeastern Brazil). *Appl Biochem Biotec*. doi: 166: 1-12. 10.1007/s12010-011-9519-1
- Carvalho-Neta RNF, Sousa DBP, Almeida ZS, Santos DMS, Tchaicka L (2014) A histopathological and biometric comparison between catfish (Pisces, Ariidae) from a harbor and a protected area, Brazil. *Aquat Biosyst* 10:12. doi: 10.1186/s12999-014-0012-5
- Castiglioni DS, Negreiros-Fransozo ML (2004) Comparative analysis of the relative growth of *Uca rapax* (Smith) (Crustacea, Ocypodidae) from two mangroves in São Paulo, Brazil. *Ver Bras Zool* 21:137-144
- Castiglioni DS, Silva-Castiglioni D, Oliveira PJA (2013) Reproductive biology of *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae) in two mangrove areas from the south coast of state of Pernambuco, Brazil. *Coast Manag Zone J* 13(4):433-444
- Compere, Wanson, Pequeux, Gilles, Goffinet (1989) Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. *Tissue & Cell* 21(2): 299-318.

- Cossa DA (1989) Review of the *Mytilus* spp as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceanol Acta* 12: 417–32
- Chupani L, Zuskova E, Stara A, Velisek J, Kouba A (2016) Histological changes and antioxidant enzyme activity in signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) associated with sub-acute peracetic acid exposure. *Fish Shellfish Immun* 48: 190 – 195
- Diele K, Koch V, Saint-Paul U (2005) Population structure, catch composition and CPUE of the artisanally harvested mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in the Caeté estuary, North Brazil: Indications for overfishing? *Aquat Living Resour* 18(2):169-178
- Doughtie DG, Rao KR (1984) Histopathological and ultrastructural changes in the antennal gland, midgut, hepatopancreas and gill of grass shrimp exposed to hexavalent chromium. *J Invertebr Pathol* 43: 89–108
- Frias-Espericueta MG, Abad-Rosalesb S, Nevárez-Velázquez AC, Osuna-López I, Páez-Osuna F, Lozano-Olivera R, Voltolinad D (2008) Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquat Toxicol* 89: 152–157
- Gernhofer M, Pawet M, Schramm M, Müller E, Triebkorn R (2001) Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *J Aquat Ecosyst Stress Recovery* 8: 241-260.
- Gregati RA, Negreiros-Franozo ML (2009) Population biology of the burrowing crab *Neohelice granulata* (Crustacea: Decapoda: Varunidae) from a tropical mangrove in Brazil. *Zoologia*, 26: 32-37
- Hartnoll RG, Broderick AC, Godley BJ, Saunders KE (2009) Population structure of the land crab *Johngarthia lagostoma* on Ascension Island. *J Crustacean Biol* 29: 57-61.
- INMET- Instituto Nacional de Meteorologia, 2016. Normal Climatológica do Brasil 1961-1990. <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas> (Accessed on: 03th September 2016).
- Ivo CTC, Dias AF, Botelho ERO, Mota RI, Vasconcelos JA, Vasconcelos EMS (2000) Caracterização da população do caranguejo-uçá *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763) capturado em estuários do nordeste do Brasil. *Bol Tec Cient CEPENE* 8(1):9-43.
- Krahn MM, Myers MS, Burrows DG, Malins DC (1994) Determinação de metabólitos de xenobióticos na bÍlis de peixe de águas poluídas. *Xenobiotica* 14(8): 633-646.
- Lawson SL, Jones MB, Moate RM (1995) Effect of Copper on the Ultrastructure of the Gill Epithelium of *Carcinus maenas* (Decapoda: Brachyura). *Mar Pollut Bul* 31: 63-72
- Lei W, Wang L, Liu D, Xu T, Luo J (2011) Histopathological and biochemical alternations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere* 84: 689–694
- Leme MHA (2002) A comparative analysis of the population biology of the mangrove crab *Aratus pisonii* and *Sesarma rectum* (Brachyura, Grapsidae) from North coast of São Paulo State, Brazil. *J Crustacean Biol* 22: 553-557



- Lima MNB, Mochel FR, Castro ACL (2010) Bioecologia do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda:Brachyura) na Área de Proteção Ambiental das Reentrâncias Maranhenses, Brasil. Bol Lab Hidrobiol 23:01-10
- Lima GV, Oshiro LMY (2006) Maturidade sexual do caranguejo *Armases rubripes* (Rathbun) (Crustacea, Brachyura, Sesarmidae) da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. Rev Bras Zool 23(4):1087-1086
- Maharajan A, Narayanasamy Y, Ganapiriya V, Shanmugavel K (2015) Histological alterations of a combination of Chlorpyrifos and Cypermethrin (Nurocombi) insecticide in the fresh water crab, *Paratelphusa jacquemontii* (Rathbun). JOBAZ 72: 104–112
- Martín-Díaz ML, Jime'nez-Tenorio N, Sales D, DelValls TA (2008) Accumulation and histopathological damage in the clam *Ruditapes philippinarum* and the crab *Carcinus maenas* to assess sediment toxicity in Spanish ports. Chemosphere 71: 1916–1927
- Mazon AF, Nolan DT, Lock RAC, Fernandes MN, Bonga WSE (2004) A short- term in vitro gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Toxicol in Vitro 18: 691–701.
- Moraes EEB, Nunesmaia BJB, Pinheiro MAA (2015) Population biology of the ‘uçá’-crab, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura: Ucididae), in mangroves of the Joanes River, Bahia State. Nauplius 23: 59-71
- Moura NFO, Coelho PA (2004) Maturidade sexual fisiológica em *Goniopsis cruentata* (Latreille) (Crustacea, Brachyura, Grapsidae) no Estuário do Paripe, Pernambuco, Brasil. Ver Bras Zool 21(4):1011-1015
- Moureaux C, Simon J, Mannaerts G, Catarino AI, Pernet P, Dubois P (2011) Effects of field contamination by metals (Cd, Cu, Pb, Zn) on biometry and mechanics of echinoderm ossicles. Aquat Toxicol 105: 698– 707
- Negro CL (2015) Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). Ecotoxicol Environ Saf 113:87-94
- Nordhaus I, Diele K, Wolff M (2006) Litter processing and population food intake of the mangrove crab *Ucides cordatus* in a high intertidal forest in northern Brazil. Estuar Coast Shelf Sci 67: 239–250
- Nudi AH, Wagener ALR, Francioni E, Scofield AL, Sette CB, Veiga A (2007) Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. Environ Internat 33: 315–327
- Paiva MP (1997) Recursos pesqueiros estuarinos e marinhos do Brasil. Fortaleza: Edições UFC.
- Pandya PJ (2011) Benthic Community Structure of Mahi River Estuary with Special Reference to Animal-sediment Relationship (Ph.D. thesis). The Maharaja Sayajirao University of Baroda (India).
- Pinheiro MAA, Silva PPG, Duarte LFA, Almeida AA, Zanotto FP (2012) Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). Ecotoxicol Environ Saf 81: 114–121

- Pinheiro MAA, Duarte LFA, Toledo TR, Adam ML, Torres RA (2013) Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environ Monit Assess* 185(10): 8273-8285
- Rebello MF, Rodriguez EM, Santos EA, Ansaldo M (2000) Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp Biochem Physiol C* 125: 157-164.
- Revathi P, Vasanthi A L, Munuswamy N (2011) Effect of cadmium on the ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 623-629
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149
- Santos MCF (2002) Drinking and osmoregulation in the mangrove crab *Ucides cordatus* following exposure to benzene. *Comp Biochem Physiol* 133: 29-42
- Santos PVCJ, Almeida-Funo ICS, Piga FG (2011) Perfil socioeconômico de pescadores do município da Raposa, estado do Maranhão. *REPESCA* 6:1-14.
- Schramm M, Behrens A, Braunbeck T, Eckwert H, Kohler HR, Konradt J, Muller E, Pawert M, Schwaiger J, Segner H, Triebkorn R (2000) Cellular, histological and biochemical biomarkers. In: Gerhardt, A. (Ed.), *Biomonitoring of Polluted Water*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 33-63.
- Sousa DBP, Almeida ZS, Carvalho-Neta RNF (2013) Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes) to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão. *Brazil Lat Am J Aquat Res* 41: 305-312
- Stentiford GD, Feis SW (2005) A histopathological survey of shore crab (*Carcinus maenas*) and brown shrimp (Crangon crangon) from six estuaries in the United Kingdom. *J Invert Pathol* 88: 136-146
- Tamse CT, Gacutan RG, Tamse AF (1995) Changes induced in the gills of Milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) fingerlings after acute exposure to Nifurprinol (Furanace; P-7138). *Bull Environ Contam Toxicol* 54: 591-596.
- Vasanthi LA, Revathi P, Arulvasu C, Munuswamy N (2012) Biomarkers of metal toxicity and histology of *Perna viridis* from Ennore estuary, Chennai, South East Coast of India. *J Ecotoxicol Environ Saf* 84: 92-98
- Vasanthi LA, Muruganandam A, Revathi P, Baskar P, Jayapriyan K, Baburajendran R, Munuswamy N, (2014) The application of histo-cytopathological biomarkers in the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) to assess heavy metal toxicity in Pulicat Lake, Chennai. *Mar Pollut Bull* 81: 85-93
- Victor B, Narayanan M, Nelson DJ (1990) Gills pathology and hemocyte response in mercury exposed *Macrobrachium idea* (Heller). *J Environ Biol* 11: 61-65

## Legends

**Fig 1** Map of local of the samples of *U. cordatus* Crab in São José Bay (A1 - reference area) and São Marcos Bay (A2 - harbor area), Maranhão, Brazil

**Fig 2** Photomicrograph of *U. cordatus* gill of the reference area with emphasis on the primary lamella (PL), secondary lamella (SL) pilasters cells (PC) and maginal channel (MC)

**Fig 3** Gills alterations identified in *U. cordatus* caught in Maranhão, Brazil. (A) Marginal channel deformation; (B) Hemocytic infiltration; (C) Cuticle disruption; (D, E) Collapse of the lamellae and (F) Swelling of the lamellae after collapse

**Fig 4** Joining tree of observed branchial lesions in *Ucides cordatus*. Hemocytic infiltration (IH), displacement or disruption of the cuticle (DRC), necrosis (NEC), deformation of the marginal channel (DCM), disarrangement of secondary lamella (DLS) and swelling of the secondary lamella (ILS) for dry period (A) and rainy (B)

**Fig 5** Frequency of occurrence of size (A) and weight (B) classes of *U. cordatus* captured in port area and reference area

Figure 1.

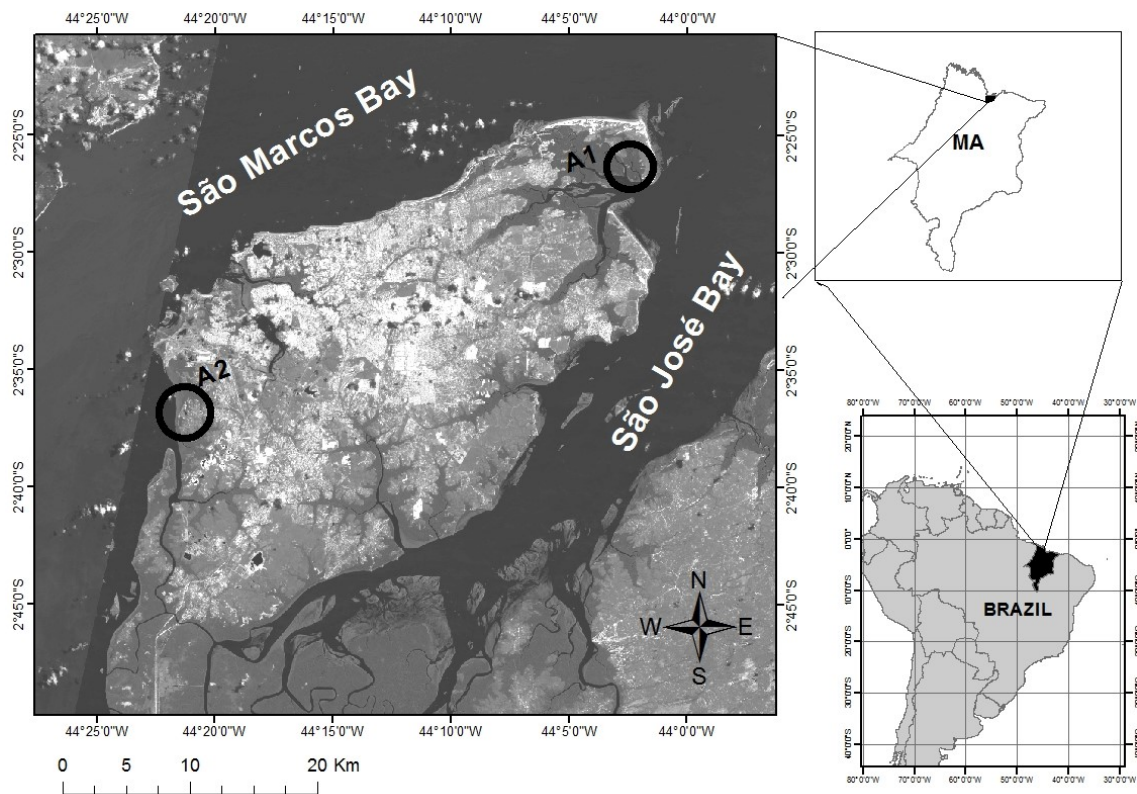


Figure 2.

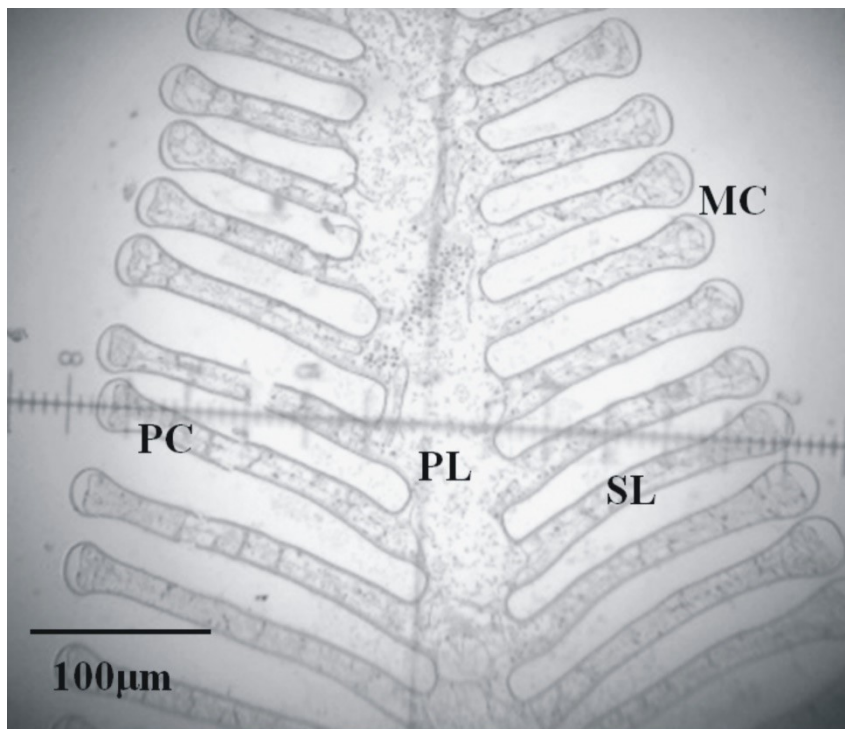


Figure 3.

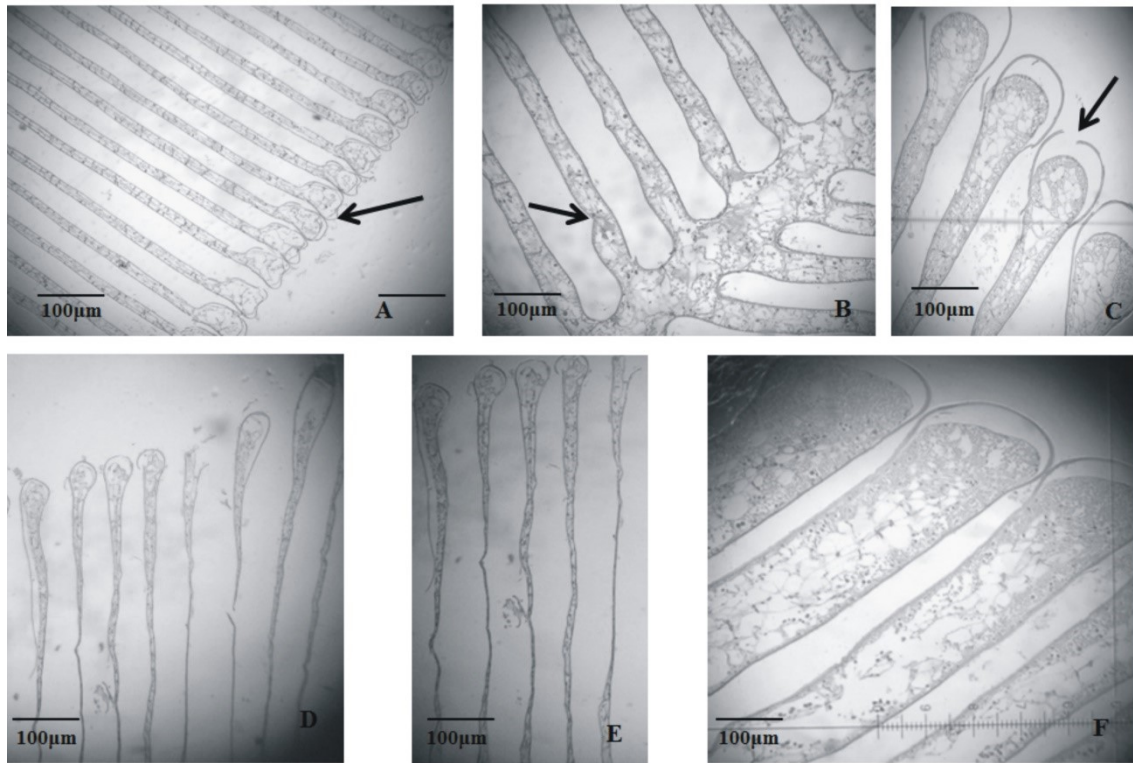


Figure 4.

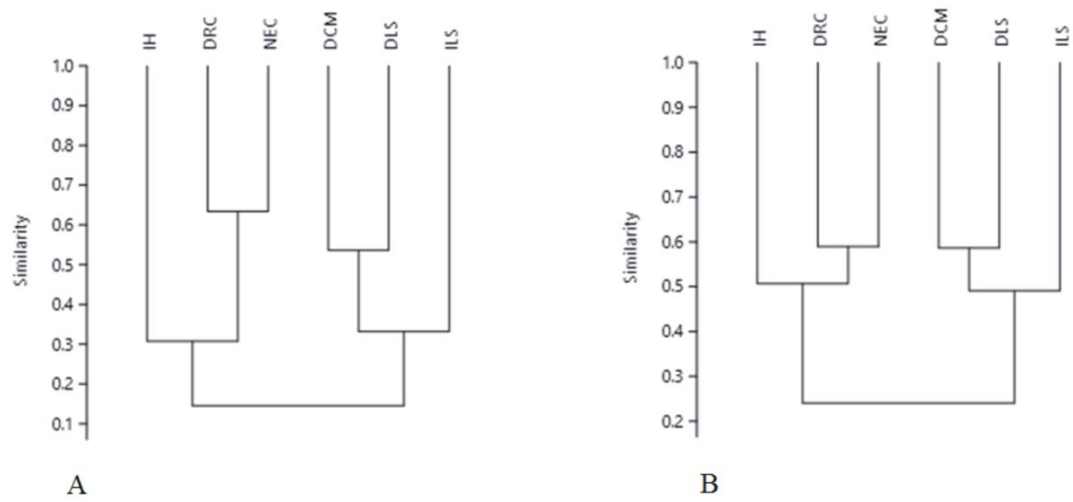
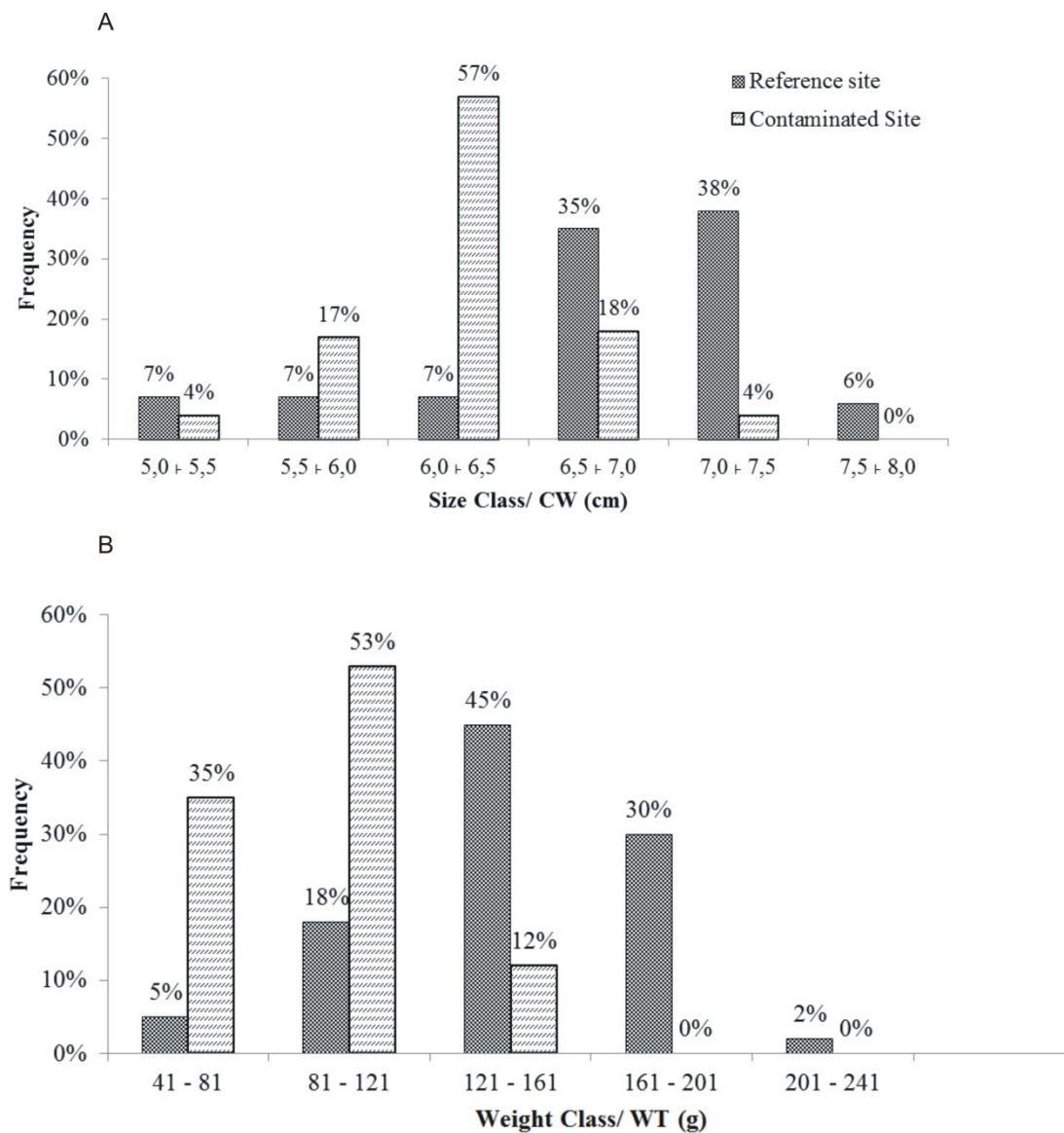


Figure 5.



# Archives of Environmental Contamination and Toxicology

Editor-in-Chief: Peter S. Ross  
ISSN: 0090-4341 (print version)  
ISSN: 1432-0703 (electronic version)  
Journal no. 244

## *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

## *Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

## *Online Submission*

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

## *Title Page*

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

## *Abstract*

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

## *Text Formatting*

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

### *Headings*

Please use no more than three levels of displayed headings.

### *Abbreviations*

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### *Footnotes*

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### *Acknowledgments*

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

### **Scientific style**

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

### *Citation*

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

### *Reference list*

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article



Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

## Tables

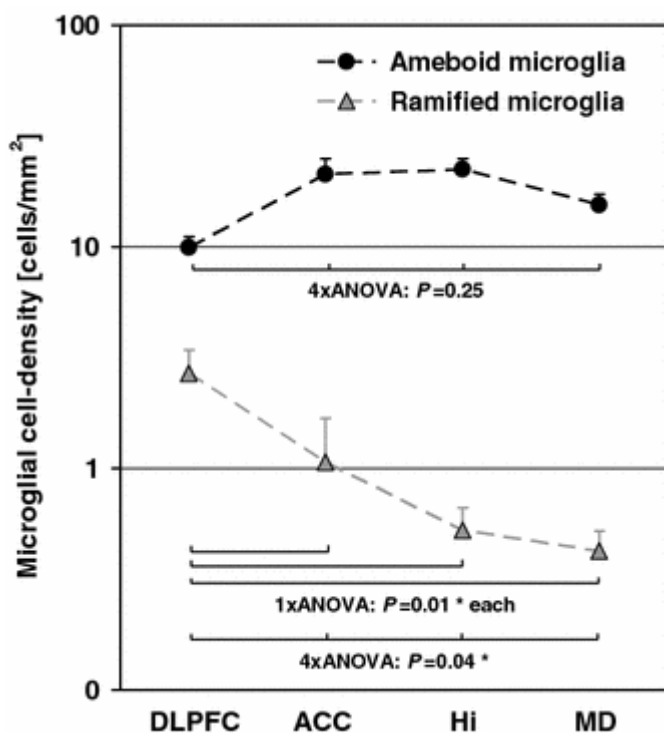
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## *Electronic Figure Submission*

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

### *Figure Numbering*

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### *Figure Captions*

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### *Figure Placement and Size*

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### *Permissions*

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### **5.3 Indicadores bioquímicos e biométricos no caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) para monitoramento ambiental de uma área portuária na Costa Norte do Brasil<sup>‡</sup>**

**TICIANNE S. O. MOTA ANDRADE<sup>1\*</sup>, WANDA S. BATISTA<sup>2</sup>, ELIANE BRAGA RIBEIRO<sup>3</sup>, SUELEN ROSANA SAMPAIO DE OLIVEIRA<sup>6</sup>, RAIMUNDA N. FORTES CARVALHO NETA<sup>7</sup>**

*<sup>1,4,5</sup>Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Recursos Aquáticos e Pesca (PPGRAP), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luis, Maranhão, Brasil*

*<sup>2</sup>Curso de graduação em Ciências Biológicas (CCB/UEMA), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luis, Maranhão, Brasil*

*<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luis, Maranhão, Brasil*

*<sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Oceanografia, Universidade Federal do Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luis, Maranhão, Brasil*

*<sup>7</sup>Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luis, Maranhão, Brasil*

*Autor correspondente: Ticianne de Sousa de Oliveira Mota Andrade<sup>1</sup>. E-mail: [ticiannedeoliveira@gmail.com](mailto:ticiannedeoliveira@gmail.com); Telefone: +55 98 98168-3006*

---

<sup>‡</sup> Este artigo será submetido para publicação em Journal of Shellfish Research. ISSN: 0730-8000 (Print) e 1943-6319 (Online). Fator de impacto: 0.829. Qualis B1(2014) para a área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

## **RESUMO**

Este estudo analisou indicadores bioquímicos e biométricos em *Ucides cordatus* para diagnóstico ambiental em uma região portuária da costa norte do Brasil. Os caranguejos foram amostrados bimestralmente em dois manguezais da Ilha de São Luís: Ilha de Facão na Baía de São José (A1: área de referência) e área portuária na Baía de São Marcos (A2: área potencialmente contaminada). Foram anotados os dados biométricos e extraídas amostras de hepatopâncreas. As amostras de hepatopâncreas foram homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas, sendo o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática da Glutathione S-Transferase e da Catalase. Os resultados indicaram que caranguejos da A1 foram maiores e mais pesados ( $P < 0,05$ ) do que aqueles de A2. Em relação à atividade enzimática, a GST foi maior para os caranguejos capturados em A2 ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, em relação à catalase não foram observadas diferenças significativas entre as áreas ou períodos sazonais. Uma relação inversamente proporcional foi constatada entre o peso total e a atividade da GST dos caranguejos da A2. O uso das análises biométricas e enzimáticas em *U. cordatus* mostraram que os organismos da área portuária estão sob estresse mais acentuado do que os caranguejos da área de referência.

**PALAVRAS-CHAVE:** Crustacea, Atividade enzimática, Dados morfométricos, Área portuária, Estudo em campo.

## **INTRODUÇÃO**

Os complexos portuários instalados ao longo da região costeira brasileira são responsáveis por muitos agentes potencialmente contaminantes que podem causar alterações graves nas comunidades aquáticas (Carvalho-Neta, 2010; Sousa et al. 2013). Os caranguejos, por exemplo, podem acumular contaminantes, e, mesmo assim apresentarem certa tolerância à sua toxicidade. Esta é uma das características que possibilita que representantes desse táxon sejam utilizados no monitoramento da contaminação do ambiente marinho (Maria et al. 2009; Dissanayake & Bamber 2010; Jebali et al. 2011). Estudos têm indicado que *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) é excelente bioindicador de poluição dos manguezais (Santos, 2002; Nudi et al. 2007; Pinheiro et al. 2012, 2013). Esses organismos podem sofrer alterações em diferentes níveis biológicos a partir da exposição à um contaminante, especialmente em nível bioquímico.

Indicadores bioquímicos, tais como as enzimas de estresse oxidativo e de biotransformação, podem ser usados para identificar possíveis contaminações ambientais antes que a saúde dos organismos aquáticos seja seriamente comprometida (Van derOost et al. 2003; Carvalho-Neta et al. 2012). Esta abordagem fornece uma informação antecipada de modificações potencialmente danosas aos organismos, haja vista que alterações na concentração e atividade de algumas enzimas podem refletir danos às células em órgãos específicos (Van derOost et al. 2003).

Uma variedade de contaminantes ambientais pode exibir toxicidade através da indução do stress oxidativo (Wang & Wang 2010). A Catalase (CAT) e a Glutathione S-transferase (GST) são enzimas antioxidantes e de biotransformação que funcionam como defesas naturais do organismo contra o estresse oxidativo (Fortes et al. 2009; Van der Oost et al. 2003). São biomarcadores muito usados em programas de monitoramento ambiental (Maria et al. 2009; Wang & Wang 2010; Jebali et al. 2011). A GST catalisa a conjugação da Glutathione-reduzida (GSH) a compostos nucleofílicos, resultantes da transformação do organismo ao estresse metabólico, assim como a produtos celulares danificados pelo ataque de radicais livres (Hayes et al. 2005). Por sua ação detoxificante é importante contra o estresse oxidativo, câncer e outras doenças degenerativas (Hayes et al. 2005). A CAT tem função distinta da GST. É responsável pela eliminação de peróxido de hidrogênio formado no peroxissoma, diminuindo o risco de formação do radical hidroxil, via Reação de Fenton (Aebi 1984; Alberts et al. 2006).

Nesse contexto, sabe-se que a abordagem de multi-biomarcadores tem sido utilizada como uma ferramenta eficiente para o monitoramento ambiental (Maria et al. 2009; Wang & Wang 2010; Jebali et al. 2011). Contudo, é importante combinar outros tipos de análises para que se possa ter uma visão mais aproximada da realidade da área monitorada, como por exemplo, análises biométricas paralelas às análises enzimáticas. Haja vista que a capacidade de lidar com o estresse ambiental também influencia na quantidade de energia que é investida no crescimento de invertebrados bentônicos e pode levar a uma consequente redução no tamanho corporal do indivíduo (Moureaux et al. 2011). Assim, as medidas biométricas podem ser dados úteis para avaliar a sanidade dos organismos estuarinos. Diante disto, este estudo analisa indicadores bioquímicos e biométricos em *Ucides cordatus* para diagnóstico ambiental em uma região portuária da costa norte do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### ***Área de estudo***

A Baía de São Marcos é um importante local de pesca e tem o porto mais importante do nordeste do Brasil. Em contraste, a ilha escolhida como área de referência está localizada na Baía de São José e não possui nenhum empreendimento portuário na sua proximidade. Assim como não recebe outras interferências humana direta. Em vista disso, para este estudo, escolhemos a ilha de Facão na Baía de São José como área de referência (Fig. 1). As áreas de captura estão sob as coordenadas 2026'48.3'' S 44004'41.6'' w (área de referência) e 2043'11.9'' S 44021'37.7'' w (área portuária).

### ***Amostragem***

Os caranguejos foram capturados no período de chuvas (agosto, outubro e dezembro de 2015) e estiagem (fevereiro, abril e junho de 2016). Foram coletados aleatoriamente 240 machos adultos (120 em cada área). A técnica de coleta utilizada é conhecida localmente como "braceamento". Esta técnica é conhecida pela introdução do braço do pescador na toca do caranguejo, e o uso apenas da mão para a captura do organismo. Os caranguejos foram imediatamente dissecados com uma tesoura estéril e amostras de hepatopâncreas foram extraídas e colocadas em tubos eppendorf, congeladas (e mantidos) em nitrogênio líquido e transportado ao laboratório.

### ***Dados biométricos***

Ainda em campo, com o auxílio de um paquímetro de 0,1 cm de precisão, foram registrados os dados biométricos como a largura e (LC) comprimento da carapaça (CC) e comprimento do própodo quelar (CPQ). A LC foi medida ao nível do primeiro pereiópodo, correspondendo a maior dimensão da carapaça; o CC foi medido no plano de simetria sobre o dorso, da margem anterior da frente até a margem posterior da carapaça (Pinheiro & Fiscarelli 2001); e o CPQ foi tomado a partir da base do dedo fixo até a ponta oposta. O peso total (PT) de cada indivíduo foi registrado a partir de uma balança de precisão 0,1g.

### ***Análise bioquímica***

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). 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 glutathione

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, pela taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de acordo com Tagliari et al. (2004) e Ventura et al. (2002).

A atividade enzimática foi expressa em unidades da enzima necessária para conjugar um  $\mu\text{mol}$  de CDNB/min/mg de proteína (para GST) e consumir um  $\mu\text{mol}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de proteína (para a CAT) (Ken et al. 1976).

#### *Análises estatísticas*

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para cada variável estudada foram testadas diferenças significativas entre os locais (A1 e A2) através do teste-t de Student. A relação entre a atividade enzimática e os dados biométricos foi analisada através de regressão linear usando a média dos valores observados para cada parâmetro.

## **RESULTADOS**

Os dados morfométricos (PT, LC, CC e LPQ) dos caranguejos capturados são apresentados na Tabela 1. Os caranguejos da área de referência foram maiores e mais pesados do que aqueles capturados na área poluída.

A análise das médias de LC e PT por período amostral confirma uma maior amplitude de tamanho para os caranguejos da área de referência durante todo o período de estudo (figura 2A e 2B). Contudo, não houve diferença significativa entre os períodos sazonais ao se comparar os indivíduos de uma mesma área.

Em relação à atividade enzimática foram encontradas diferenças na atividade da GST entre os caranguejos da área portuária ( $p < 0,05$ ) quando comparada com os caranguejos da área de referência (figura 3A). Na área portuária foram registrados os maiores valores para a atividade da GST ( $2,69 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína<sup>-1</sup>), bem como foram registrados valores iguais a zero ( $0,00 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína<sup>-1</sup>). Por outro lado, para a atividade da catalase não foram observadas diferenças significativas entre as áreas ou períodos sazonais (3B).

Uma relação significativa foi constatada apenas entre a atividade da GST e PT dos caranguejos da área contaminada. A regressão linear indicou que o PT apresenta uma relação inversamente proporcional à atividade enzimática ( $r = -0,72353$ ;  $r^2 = 0,5235$ ). Em relação às médias por período de captura, o maior PT registrado coincide com a menor atividade da GST para o mês de junho (fig. 4).



## DISCUSSÃO

A análise do peso total associado à atividade da GST mostrou-se eficiente para diagnosticar o estresse sofrido pelos organismos da área portuária da Ilha de São Luís. Além disso, o presente estudo também confirma as evidências disponíveis na literatura sobre o nível de impacto ambiental da Baía de São Marcos. Portanto, a validação desta metodologia possibilita o biomonitoramento da região sem a necessidade de identificação e/ou quantificação dos contaminantes, diminuindo assim, os custos e proporcionando maior oportunidade para o diagnóstico de conservação dos ecossistemas (Viana et al. 2014; Barrilli et al. 2015; Duarte et al. 2016).

A quantificação da atividade da GST apresentou o padrão esperado, sendo registrada uma maior atividade para os caranguejos da área portuária. Resultado similar foi encontrado para esta mesma espécie ao se estudar seis áreas (no sudeste do Brasil) com diferentes níveis de impactos, onde as menores médias de genotoxicidade foram registradas para áreas com menor impacto humano e áreas intocadas (Duarte et al. 2016). A GST (assim como a CAT) é utilizada em programas de controle de poluentes químicos, pois alteram a sua atividade na presença destas substâncias (Astley et al 1999; Niyogi et al 2001; Atli & Canli 2007; Martin-Diaz et al 2007, 2008, 2009; Maria et al. 2009; Wang & Wang 2010; Jebali et al 2011). No entanto, o registro de  $0,00 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína<sup>-1</sup> para a atividade da GST para a área portuária pode representar um sistema de defesa exaurido, diante da crescente e prolongada oferta de contaminantes ambientais. Resultados semelhantes foram observados para bagres da região portuária da Baía de São Marcos, onde os valores nulos para a atividade da GST foram atribuídos à exaustão do sistema enzimático dos peixes em função de contaminantes químicos e orgânicos (Carvalho Neta et al. 2012).

A CAT, por sua vez, não mostrou diferença significativa entre as áreas. Variação das respostas antioxidantes podem ocorrer de acordo com as espécies testadas. Estudos com invertebrados bentônicos já identificaram alterações na atividade da catalase apenas para substâncias específicas (Solé et al. 2000). Desta forma, o padrão da atividade da CAT em *U. cordatus* da Ilha de São Luís não está claro, indicando a necessidade de estudos futuros que investiguem esse aspecto.

Análises como essa, são importantes para validar as espécies nativas de cada região, tendo em vista a crescente necessidade de melhores bioindicadores e metodologias mais apropriadas (Freitas & Rocha 2011). Neste sentido, *U. cordatus* parece ser uma espécie bioindicadora e adequada para análise da GST, uma vez que é sensível aos contaminantes e pode acumulá-los; é abundante e representativo em áreas estuarinas; é de fácil captura; tem um tamanho razoável e é resistente às variações naturais (Santos 2002; Pinheiro et al. 2012).

Os resultados também indicaram que os caranguejos da área portuária foram maiores e mais pesados do que os caranguejos da área de referência. Outros estudos também encontraram esse mesmo padrão para caranguejos de áreas com diferentes níveis de impacto ambiental (Castiglioni & Negreiros-Fransozo 2004, 2006; Benetti & Negreiros-Fransozo 2004). E apesar de alguns estudos indicarem que *U. cordatus* não apresenta padrões regionais ou nacionais em relação a biometria (Moura & Coelho 2004; Lima & Oshiro 2006), pesquisas mais recentes indicam que o nível de impacto dos manguezais têm influenciado negativamente os parâmetros populacionais de espécies de crustáceos (Jergentza et al. 2004; Brink et al. 2007; Moureaux et al. 2011; Viana et al, 2014; Moraes et al. 2015; Barrilli et al, 2015). Haja vista que mudanças subletais podem ser potencializadas pela ação de xenobióticos (Wei & Yang, 2015).

Acredita-se que as diferenças observadas na atividade da GST e na biometria de *U. cordatus* da área portuária provavelmente são um reflexo do impacto ocasionado por metais pesados e compostos orgânicos a que esta área está submetida. Tendo em vista, que as duas áreas de manguezais estudadas são semelhantes segundo a composição das árvores, a estrutura da vegetação, altura de inundação pelas marés, e produtividade (a partir de folhas no sedimento), indicando uma função equivalente dos ecossistemas (Gamfeldt et al. 2015). Assim, a escolha de parâmetros suficientemente sensíveis e eficazes na detecção de impacto ambiental, bem como a seleção de áreas semelhantes em estrutura e composição podem ser condições decisivas para o sucesso da análise (Duarte et al. 2016).

Este estudo indicou que *U. cordatus* apresenta respostas biológicas que possibilitam uma análise dos danos iniciais aos organismos e ao ecossistema. No entanto, este estudo não objetivou relacionar essas respostas a um fator específico, haja vista que tais respostas possivelmente ocorrem como resultado de um conjunto de fatores de estresse. A atividade da GST e o PT dos caranguejos foram sensíveis a esses conjuntos de fatores e representam bons indicadores de estresse em geral, tornando esta abordagem adequada para o monitoramento ambiental sem a pretensão de quantificar o acúmulo de poluentes. Por fim, destaca-se a inexistência de relatos sobre o uso de espécies de caranguejo em programas de biomonitoramento ao longo da costa do Maranhão (Brasil). Portanto, o presente trabalho contribui com informações relevantes sobre o uso de biomarcadores bioquímicos em caranguejo *U. cordatus* para esta área. Bem como, representa 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.

## AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer o Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos (LABOAq) e Grupo de Pesquisa em Ecotoxicologia e Monitoramento de Ambientes Aquáticos (GPEMAAq) pelo suporte técnico. Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA), pelo apoio financeiro e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para a concessão da bolsa de mestrado.

## LITERATURA CITADA

Aebi, H. 1984. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.

Astley, K. N., Meigh, H. C., Glegg, G. A., Braven, J. & Depledge, M. H. 1999. Multi-variate Analysis of Biomarker Responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). *Marine Pollution Bulletin*. 39(1): 145-154.

Atli, G. & Canli, M. 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 145(2): 282-287.

Alberts, B.; Jonhson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P. 2006. *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. 2. reimp. Porto Alegre: ArtMed.

Benetti, A. S. & Negreiros-Fransozo, M. L. 2004. Relative growth of *Uca burgersi* (Crustacea, Ocypodidae) from two mangroves in the southeastern Brazilian coast. *Iheringia Ser Zoo*. 94:67-72.

Brink, P.J.V., Baveco, J.M.H., Verboom, J. & Heimbach, F., 2007. An individual-based approach to model spatial population dynamics of invertebrates in aquatic ecosystems after pesticide contamination. *Hazard/Risk Assess.* 26 (10), 2226–2236.

Barrilli, G.H.C., Rocha, O., Negreiros, N. F. & Verani, J. R., 2015. Influence of environmental quality of the tributaries of the Monjolinho River on the relative condition factor (Kn) of the local ichthyofauna. *Biota Neotrop.* 15 (1),1–9.

Carvalho-Neta, R.N.F. & Abreu-Silva, A.L. 2010. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: An in situ study of estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). *Braz J Oceanogr* 58: 11-17.

Carvalho-Neta, R.N.F., Torres, A.R. & Abreu-Silva, A.L. 2012. Biomarkers in catfish *Sciades herzbergii* (teleostei: ariidae) from polluted and Non-polluted areas (São Marcos' Bay, northeastern Brazil). *Appl Biochem Biotec.* doi: 166: 1-12. 10.1007/s12010-011-9519-1

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

Castiglioni, D.S. & Negreiros-Fransozo, M.L. 2004. Comparative analysis of the relative growth of *Uca rapax* (Smith) (Crustacea, Ocypodidae) from two mangroves in São Paulo, Brazil. *Ver Bras Zool* 21:137-144.

Castiglioni, D. S. & Negreiros-Fransozo, M. L. 2006. Physiologic sexual maturity of the fiddler crab *Uca rapax* (Smith, 1870) (Crustacea, Ocypodidae) from two mangroves in Ubatuba, Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 49, p. 239-248.

Dissanayake, A. & S. D. Bamber, 2010. Monitoring PAH contamination in the field (Southwest Iberian Peninsula): Biomonitoring using fluorescence spectrophotometry and physiological assessments in the shore crab *Carcinus maenas* (L.) (Crustacea: Decapoda). *Marine Environmental Research* 70: 65-72

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

Fortes, L. F.; Labidi, S. & Carvalho-Neta, R. F. Projeto e construção de bio-ontologia para suporte a sistema multiagente de monitoramento ambiental do complexo portuário da ilha de São Luís do Maranhão. Revista Científica - Cadernos de Pesquisa, 2009.

Gamfeldt, L., Lefcheck, J.S., Byrnes, J.E.K., Cardinale, B.J., Duffy, J.M. & Griffin, J.N., 2015. Marine biodiversity and ecosystem functioning: what's known and what's next? *Oikos* 124, 252–265.

Hayes, K. R., Cannon, R., Neil, K. & Inglis, G., 2015. Sensitivity and cost considerations for the detection and eradication of marine pests in ports. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 823–834.

Jebali, J., Ben-Khedher, S., Ghedira, J., Kamel, N. & Boussetta, H. 2011. Integrated assessment of biochemical responses in Mediterranean crab (*Carcinus maenas*) collected from Monastir Bay, Tunisia. *Journal of Environmental Sciences*, 23(10): 1714–1720.

Jergentza, S., Pessacq, P., Mugni, H., Bonetto, C. & Schulz, R. 2004. Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59 (2), 133–141.

Ken, J. H.; Habig, W. H. & Jakoby, W. B. 1976. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*. 251: 6183–6188.

Lima, G.V. & Oshiro, L.M.Y. 2006. Maturidade sexual do caranguejo *Armases rubripes* (Rathbun) (Crustacea, Brachyura, Sesarmidae) da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Zool* 23(4):1087-1086.

Maria, V. L., Santos, M. A. & Bebianno, M. J. 2009. Contaminant effects in shore crabs (*Carcinus maenas*) from Ria Formosa Lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.04.013>

Martín-Díaz, M. L., Blasco, J., Sales, D. & DelValls, T. A. 2007. Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, doi: 10.1007/s00244-006-0121-4

Martín-Díaz M. L., Sales, D. & DelValls, T. A. 2008. Toxicokinetic approach for the assessment of endocrine disruption effects of contaminated dredged material using female *Carcinus maenas*. Ecotoxicology, 10.1007/s10646-008-0203-3

Martín-Díaz, M. L., Blasco, J., Sales, D. & DelValls, T. A. 2009. The use of a kinetic biomarker approach for in situ monitoring of litoral sediments using the crab *Carcinus maenas*. Marine Environmental Research, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.04.005>

Moura, N.F.O. & Coelho, P.A. 2004. Maturidade sexual fisiológica em *Goniopsis cruentata* (Latreille) (Crustacea, Brachyura, Grapsidae) no Estuário do Paripe, Pernambuco, Brasil. Ver Bras Zool 21(4):1011-1015.

Moureaux, C., Simon, J., Mannaerts, G., Catarino, AI., Pernet, P., & Dubois, P. 2011. Effects of field contamination by metals (Cd, Cu, Pb, Zn) on biometry and mechanics of echinoderm ossicles. Aquat Toxicol 105: 698– 707

Moraes, E.E.B., Nunesmaia, B.J.B. & Pinheiro, M.A.A. 2015. Population biology of the ‘uçá’-crab, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura: Ucididae), in mangroves of the Joanes River, Bahia State. Nauplius 23: 59-71

Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S. & Datta, A. G. 2001. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relations with polycyclic aromatic hydrocarbons. Marine Environmental Research, v. 52, p. 13-26.

Nudi, A.H., Wagener, A.L.R., Francioni, E., Scofield, A.L., Sette, C.B., & Veiga, A. 2007. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. *Environ Internat* 33: 315–327

Pinheiro, M.A.A. & Fiscarelli, A.G. 2001. Manual de apoio à fiscalização do caranguejo-uçá. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) / Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira das Regiões Sudeste e Sul (CEPSUL) 1ª ed. Itajaí, 60 p.

Pinheiro, M.A.A., Silva, P.P.G., Duarte, L.F.A., Almeida, A.A. & Zanotto, F.P. 2012. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). *Ecotoxicol Environ Saf* 81: 114–121

Pinheiro, M.A.A., Duarte, L.F.A., Toledo, T.R., Adam, M.L. & Torres, R.A. 2013. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environ Monit Assess* 185(10): 8273-8285

Santos, M.C.F. 2002. Drinking and osmoregulation in the mangrove crab *Ucides cordatus* following exposure to benzene. *Comp Biochem Physiol* 133: 29–42.

Sousa, D.B.P., Almeida, Z.S. & Carvalho-Neta, R.N.F. 2013. Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes) to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão. Brazil *Lat Am J Aquat Res* 41: 305-312.

Solé, M., Shaw, J.P., Frickers, P.E., Readman, J.W. & Hutchinson, T.H. 2010. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.396, p.649–656.

Tagliari, K. C., Cecchini, R., Rocha, J. A. V. & VARGAS, V. M. F. 2004. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutation Research*, v. 561, p. 101–117.

Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

Ventura, E. C., Gaelzer, L. R., Zanette, J., Marques, M. R. F., Bainy, A. C. D. 2002. 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.

Viana, L.F., Tondato, K.K., Suárez, Y.R. & Lima-Junior, S.E. 2014. Influence of environmental integrity on the reproductive biology of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 in the Ivinhema river basin *Acta Sci. Biol. Sci.* 36 (2), 165–173.

Wang, M. & Wang, G. 2010. Oxidative damage effects in the copepod *Tigriopus japonicus* Mori experimentally exposed to nickel. *Ecotoxicology*, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

Weis, J. S., Bergey, L., Reichmuth, J. & Candelmo, A. 2011. Living in a Contaminated Estuary: Behavioral Changes and Ecological Consequences for Five Species. *BioScience*, doi: <http://dx.doi.org/10.1525/bio.2011.61.5>

Wei, K. & Yang, J. 2015. Oxidative damage of hepatopancreas induced by pollution depresses humoral immunity response in the fresh water crayfish *Procambarus clarkia*. *Fish. Shellfish Immunol.* 43 (2), 510–519.



### Legendas

**Figura 1.** Áreas de captura do caranguejo *Ucides cordatus* na Ilha de São Luis (Brasil), onde A1 a área portuária (uma região potencialmente contaminada) e A2 corresponde à área de referência.

**Figura 2.** Média dos valores encontrados para largura da carapaça (A) e peso total (B) de *Ucides cordatus* capturado na área portuária e na área de referência por período amostral (Ilha de São Luis, Brasil).

**Figura 3.** Atividade da GST (A) e CAT (B) dos caranguejos coletados na área portuária e de referência no período chuvoso e de estiagem (Ilha de São Luis, Brasil).

**Figura 4.** Médias da atividade da Glutathione-S-Transferase (GST) e o peso total (TW) de caranguejos capturados na área portuária (Ilha de São Luis, Brasil).

Figura 1

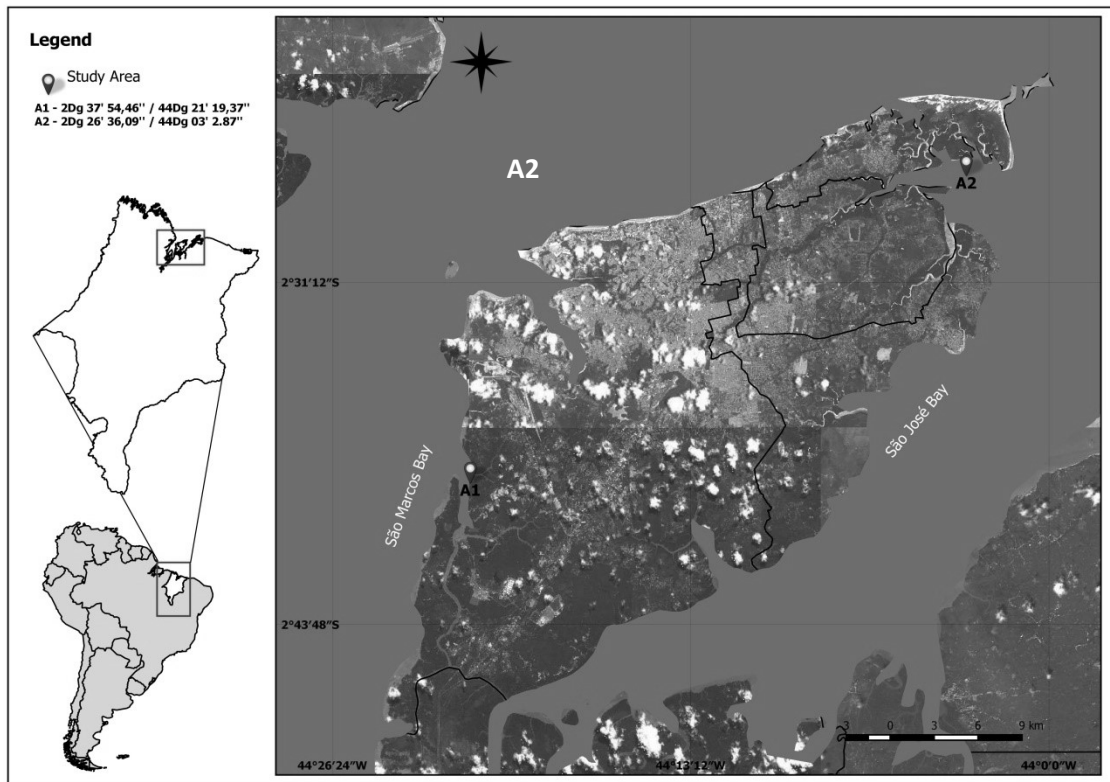


Figura 2

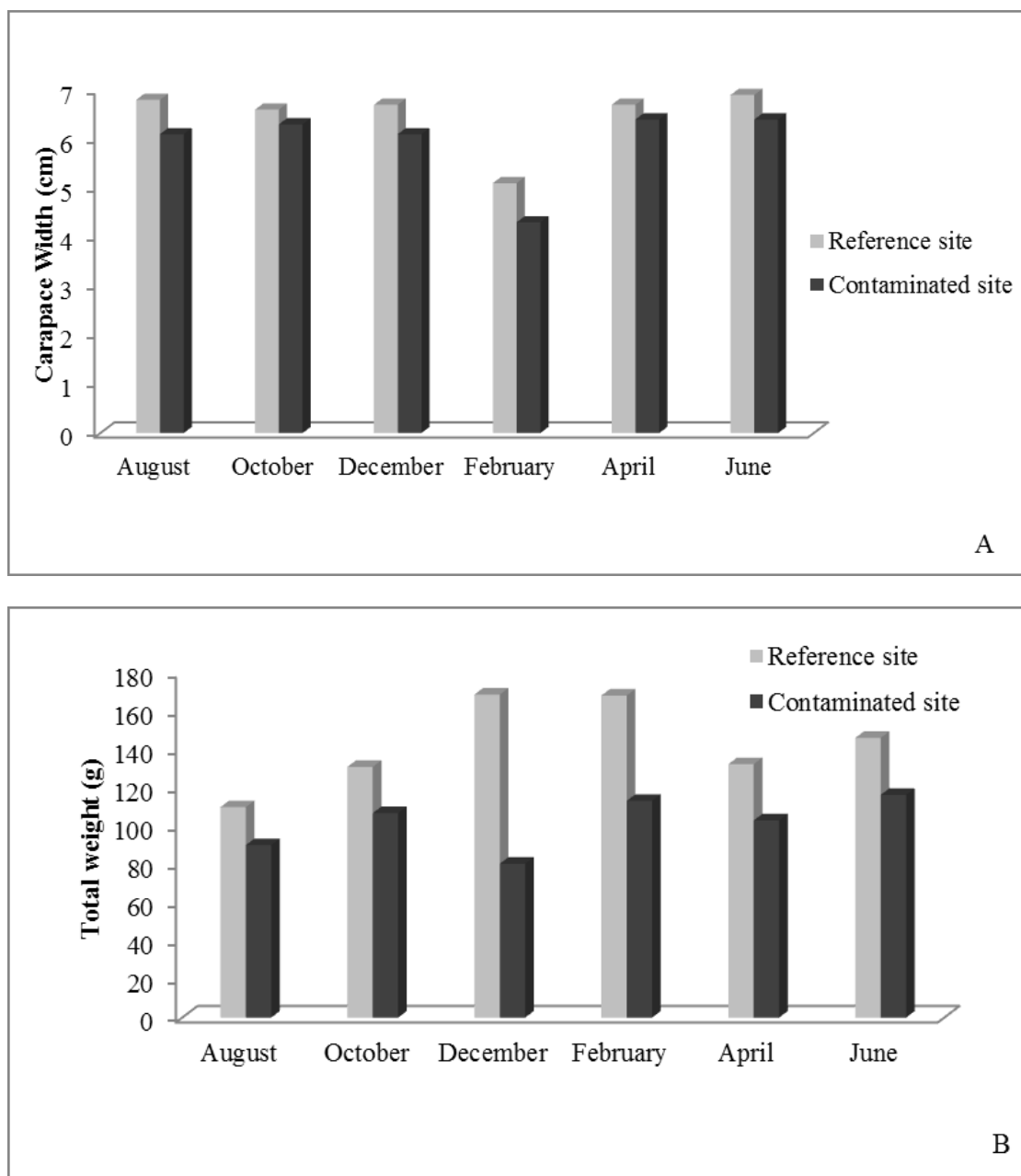


Figura 3

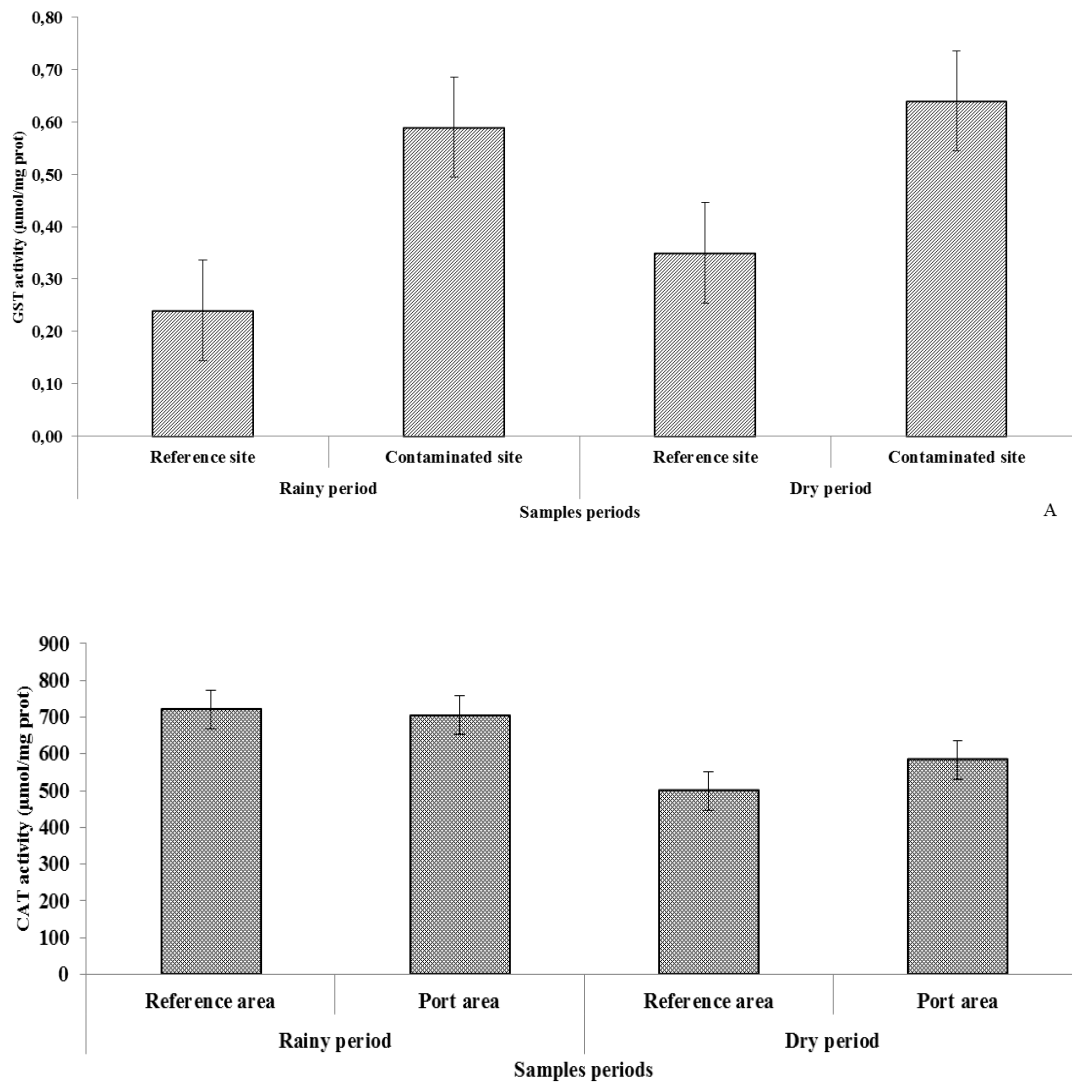
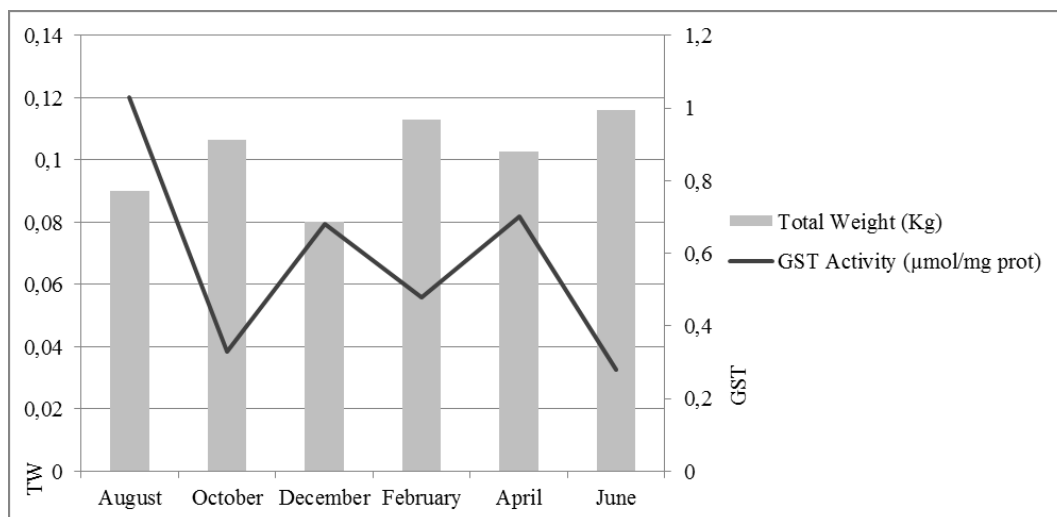


Figura 4



**Tabela 1.** Dados biométricos de *U. cordatus* capturados na área contaminada e na área de referência (média  $\pm$  desvio padrão).

Área	PT(g)	LC(cm)	CC(cm)	CPQ(cm)
Portuária	102,67 $\pm$ 24,64	5,97 $\pm$ 0,87	4,91 $\pm$ 0,67	5,56 $\pm$ 0,93
Referência	145,3 $\pm$ 33,17	6,48 $\pm$ 0,82	5,35 $\pm$ 0,92	6,26 $\pm$ 1,03

### Information for Contributors to *JSR*

Original articles dealing with all aspects of shellfish research will be considered for publication. Manuscripts will be judged by the editors or other competent reviewers, or both, on the basis of originality, content, merit, clarity of presentation, and interpretations. Each article should be carefully prepared in the style followed in prior issues of the *Journal of Shellfish Research* before submission to the Editor. Papers published or to be published in other journals are not acceptable.

#### **Title, Short Title, Key Words, Abstract:**

The title of the paper should be kept as short as possible. Please include Key words and a "short running title" of not more than 48 characters including spaces. Each manuscript must be accompanied by a concise, informative abstract, giving the main results of the research reported. The abstract will be published at the beginning of the article. No separate summary should be included.

#### **Text:**

Manuscripts must be typed double-spaced throughout on one side of the paper, leaving ample margins, with the pages numbered consecutively. Lines should be numbered continuously from beginning to end of the manuscript. Scientific names of species should be underlined or in italics and, when first mentioned in the text, should be followed by the authority. Common and scientific names of organisms should be in accordance with American Fisheries Society Special Publications 16 and 17: Common and Scientific Names of Aquatic Invertebrates from the United States and Canada: Molluscs, and CSNAIUSC: Decapod Crustaceans, or relevant publications for other geographic regions.

The manuscript must be submitted electronically unless prior arrangements have been made with the Editor. A single PDF file including text, tables and figures is the preferred format for review. The text and tables for accepted manuscripts should be in a Word or WordPerfect file. Authors of manuscripts submitted in files such as TEX or LATEX will be charged for the special processing required before the manuscript is suitable for printing. The resolution and file formats for illustrations in accepted manuscripts are described below.

#### **Abbreviations, Style, Numbers:**

Authors should follow the style recommended by the 7th edition (2006) of the Council of Biology Editors [CBE] Style Manual, distributed by the American Institute of Biological Sciences. All linear measurements, weights, and volumes should be given in metric units.

#### **Tables:**

Tables, numbered in Arabic, should be on separate pages with a concise title and explanatory legend at the top.

#### **Illustrations:**

Authors should provide figures in electronic format. Illustrations should be planned so that important details will be clear after reduction to page size or less. No drawing should be so large that it must be reduced to less than one third of its original size. Photographs and line drawings should be prepared so they can be reduced to a size no greater than 17.3 cm x 22.7 cm, and should be planned to occupy either the full page width of 17.3 cm or the width of one column, 8.4 cm. Figure legends should be placed on separate sheets and numbered in Arabic.

Figure keys must be placed within the figure, not outside. If this information cannot be placed within the figure, then include the key information in the figure legend. DO NOT place grid lines on graphs or draw boxes around graphs. Tick marks should be placed on the inside of the axis.

- The resolution of line art should be 1000 dpi and of halftones/grayscales 300 dpi if no lettering, 500 dpi if figure contains lettering or other lines.
- TIF is the preferred file format, but EPS, JPG, PDF, BMP, PPT or Word files are also acceptable.
- If multiple figures are supplied together in one file, each figure must be clearly labeled.
- If each figure is supplied in its own file, the file should be named according to its figure number and format (e.g., fig2btif).

Color figures may be included for an additional fee. They must be saved as CMYK-encoded images. Color figures have the same resolution requirements as B/W. NOTE: Color illustrations will be reproduced in color only when the author agrees to cover the cost associated with reproduction and printing in color.

#### **Literature Cited:**

References should be listed alphabetically at the end of the article. For appropriate citation format and abbreviations, see examples below and recent issues of the Journal:

- *Journal* *Article:*  
Watts, R. J., M. S. Johnson & R. Black. 1990. Effects of recruitment on genetic patchiness in the urchin *Echinometra mathaei* in Western Australia. *Mar. Biol.* 105:145-151.
- *Book:*  
Claudi, R. & G. L. Mackie. 1994. Practical manual for Zebra Mussel monitoring and control. Boca Raton, FL: CRC Press. 227 pp.
- *Chapter* *in* *Edited* *Book:*  
Davio, S. R., J. F. Hewetson & J. E. Beheler. 1985. Progress toward the development of monoclonal antibodies to saxitoxin: antigen preparation and antibody detection. In: D. M. Anderson, A. W. White & D. G. Baden, editors. *Toxic dinoflagellates*. Amsterdam: Elsevier. pp. 343-348.

#### **Authorship and Personal Communications:**

All individuals listed as authors must have agreed to authorship before the manuscript is submitted. Authors must obtain approval from individuals cited as a "personal communication". The text citation for personal communications should include initial and last name, institution and date.

#### **Page Charges:**

Authors or their institutions will be charged \$100.00 US per printed page. All page charges are subject to change without notice. A handling fee of \$60 will be charged for all manuscripts accepted for publication.

#### **Proofs:**

Page charges of \$100 per page are normally assessed. Inquiries for page-charge assistance will be reviewed on a case-by-case basis. Please contact the Editor, Dr. Sandra Shumway. E-mail: [sandra.shumway@uconn.edu](mailto:sandra.shumway@uconn.edu)

**Offprints:**

Offprints and PDF files of published papers are available at cost to the authors. Information regarding ordering reprints will be available from The Sheridan Press at the time of printing.

**Cover Photographs:**

Appropriate photographs in either black and white or color may be submitted for consideration for use on the cover of the *Journal of Shellfish Research*.

**Submission/Correspondence:**

An electronic copy of each manuscript submitted for publication consideration should be sent via email to the Editor, Dr. Sandra E. Shumway, Department of Marine Sciences, University of Connecticut, 1080 Shennecossett Rd., Groton, CT 06340. E-mail: [sandra.shumway@uconn.edu](mailto:sandra.shumway@uconn.edu)

**Subscriptions:**

Individual private NSA membership includes a subscription. Membership information may be obtained from the Editor or the Treasurer using the form in the Journal or by [clicking here](#).

Institutional subscribers should see our [institutional subscription page](#) or send requests to: Journal of Shellfish Research, P. O. Box 465, Hanover, PA 17331.

Send correspondence and manuscripts to the *Journal of Shellfish Research* Editorial Office:

Editor

Dr. Sandra E. Shumway

Department of Marine Sciences

University of Connecticut

1080 Shennecossett Road

Groton, CT 06340-6097 USA

e-mail: [sandra.shumway@uconn.edu](mailto:sandra.shumway@uconn.edu)



## 5.4 Um modelo preditivo de impactos ambientais em caranguejo *Ucides cordatus* aplicado a uma área portuária no Norte do Brasil<sup>§</sup>

Ticianne S. O. Mota Andrade<sup>1\*</sup>, Audalio Rebelo Torres Junior<sup>2</sup>, Raimunda N. Fortes Carvalho-Neta<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Recursos Aquáticos e Pesca (PPGRAP), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luis, Maranhão, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luis, Maranhão, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus Paulo VI, São Luis, Maranhão, Brasil

Autor correspondente: Ticianne de Sousa de Oliveira Mota Andrade<sup>1</sup>. E-mail: [ticiannedeoliveira@gmail.com](mailto:ticiannedeoliveira@gmail.com). Telefone: +55 98 98168-3006

### Resumo

Neste estudo objetivou-se correlacionar a atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST) e as lesões branquiais em caranguejo *Ucides cordatus* para obtenção de um modelo preditivo dos efeitos de impacto ambiental em uma área portuária no nordeste do Brasil. Machos adultos de *Ucides cordatus* foram capturados bimestralmente pelo período de um ano. Amostras de hepatopâncreas foram homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas, sendo o sobrenadante utilizado para determinação da atividade da GST. As amostras de brânquias foram desidratadas em série crescente de álcoois, impregnadas e incluídas em parafina. Para elaboração do modelo matemático, os valores da atividade de GST foram correlacionados com os da escala de lesões branquiais (variável independente) por meio do encaixe de polinômios de terceira ordem, utilizando o método dos mínimos quadrados (0,05 de nível de significância). Uma maior atividade da GST foi observada nos caranguejos do local potencialmente contaminado ( $p < 0,05$ ). Contudo, valores nulos ( $0,00 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína $^{-1}$ ) também foram registrados (apenas) para esta área. O maior número de lesões branquiais, bem como de lesões graves foram registradas apenas para a região portuária. O modelo matemático indica que a atividade da enzima aumenta até surgirem as lesões graves. Após um limite, a atividade da GST diminui drasticamente para níveis muito baixos (ou até mesmo nulos) que leva a lesões irreversíveis (colapso da lamela). O modelo baseado nos dois parâmetros avaliados em *U. cordatus* proporcionou informações indicativas de efeitos crônicos causados por impactos oriundos da zona portuária analisada.

**Palavras chave:** Monitoramento ambiental; Ambiente estuarino; Biomarcador bioquímico; Biomarcador morfológico; Modelo matemático.

---

<sup>§</sup> Este artigo será submetido para publicação em Journal Experimental Biology. ISSN2360-8803. Fator de impacto: 2.035 Qualis A1 (2014) para a área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

## 1. Introdução

A instalação de grandes complexos portuários ao longo da região costeira brasileira é responsável por muitos agentes potencialmente contaminantes que podem causar alterações graves nas comunidades aquáticas (Carvalho-Neta, 2010). Esses efeitos podem ser mais significativos sobre a biota aquática de regiões que apresentam sedimentos finos, como é o caso dos manguezais (Bayen, 2012). Portanto, espécies bentônicas que vivem em contato direto com o sedimento, como é o caso do caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), estão particularmente expostas ao estresse químico. Contudo, a simples presença de um xenobiótico em um ambiente aquático não pode por si só indicar um efeito deletério ao ambiente (Costa et al, 2008), sendo necessários estudos que permitam tanto identificar quanto prever efeitos de agentes tóxicos em populações naturais e sistemas ecológicos.

*U. cordatus* é a espécie de caranguejo mais explorada para o consumo humano no Brasil, e é um excelente bioindicador de poluição em manguezais que pode sofrer vários tipos de alterações sob a influência de xenobióticos (Santos, 2002; Nudi et al, 2007; Pinheiro et al, 2012, 2013; Duarte et al, 2016). Tais alterações (bioquímicas, morfológicas, fisiológicas e comportamentais) são reconhecidas como biomarcadores, e a sua utilização mostra bons resultados para avaliação de riscos ambientais (Van derOost et al, 2003).

Em organismos aquáticos, o uso de biomarcadores bioquímicos é mais eficaz porque fornece dados sobre situações iniciais de contaminação, fornecendo subsídios seguros para programas de biomonitoramento que visem reverter os danos ambientais iniciais, pois indica as primeiras respostas dos organismos aos contaminantes (Van derOost et al, 2003). A enzima Glutathione-S-Transferase é um biomarcador bioquímico envolvido na desintoxicação celular de compostos eletrofilicos, sendo importante na proteção contra câncer e outras doenças degenerativas decorrentes da exposição a ambientes contaminados (Ribeiro et al, 2005). O uso de biomarcador morfológico (especialmente em brânquias) é caracterizado como uma técnica com custos econômicos mais reduzidos e de fácil identificação que permite determinar o nível de exposição aos poluentes (Norena-Barroso et al, 2004).

Os modelos matemáticos para a previsão de impactos ambientais podem ser elaborados a partir da identificação e análise de biomarcadores em organismos aquáticos (Carvalho-Neta et al, 2012). Nesse contexto, a implementação desses modelos preditivos deve considerar a padronização de métodos baseados em cada uma das espécies e dos ecossistemas, haja vista a grande diversidade geográfica e biológica do Brasil (Amado et al, 2006; Umbuzeiro et al, 2006; Valdez Domingos et al, 2007; Marmion et al, 2009). Portanto, o presente estudo baseia-se em uma adaptação do modelo matemático criado por Carvalho-Neta et al (2012). E consiste em correlacionar a atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST) e as lesões branquiais em caranguejo *Ucides cordatus* para obtenção de um modelo preditivo dos efeitos de impacto ambiental em uma área portuária no nordeste do Brasil

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Área de estudo

A Baía de São Marcos é um importante local de pesca e tem o porto mais importante do nordeste do Brasil. Na última década, a contaminação química tem representado uma crescente ameaça para a saúde dos organismos aquáticos (Carvalho-Neta et al, 2012). Em contraste, a ilha escolhida como área de referência está

localizada na Baía de São José e não possui nenhum empreendimento portuário na sua proximidade. Em vista disso, para este estudo, escolhemos a ilha de Facão na Baía de São José como área de referência (Fig. 1). As áreas de captura estão sob as coordenadas 2026°48.3' S 44004'41.6' W (A1) e 2043°11.9' S 44021'37.7' W (A2).

## 2.2 Material e Amostragem

Os caranguejos foram capturados bimestralmente pelo período de um ano (Agosto de 2015 à junho de 2016). Para fins de padronização, foram analisados apenas machos em intermuda, evitando quaisquer efeitos da fase de muda e sexo (Pinheiro et al, 2012). A técnica de captura utilizada é conhecida localmente como "braceamento", que consiste na introdução do braço na toca e uso apenas da mão para a retirada do caranguejo. Em campo os caranguejos foram dissecados com uma tesoura estéril e amostras de hepatopâncreas (biomarcador bioquímico) e brânquias (biomarcador morfológico) foram removidas com auxílio de pinças esterilizadas.

As amostras de hepatopâncreas foram colocadas em tubos Eppendorf, congeladas (e mantidas) em nitrogênio líquido até o momento das análises enzimáticas. Já as brânquias retiradas 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.

## 2.3 Análise dos biomarcadores

Para a análise bioquímica, 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). 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 glutathione reduzida (GSH) e 1-chloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB) como substrato, em tampão fosfato de potássio (0,1M), pH 7,0.

Já para a análise morfológica, as amostras de brânquias foram desidratadas em série crescente de álcoois, diafanizadas em xilol, impregnadas e incluídas em parafina. Cortes transversais, de aproximadamente 5µm de espessura, 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) e Bernet et al (1999) "modificado" e foram fotomicrografadas com auxílio de microscópio AXIOSKOP - ZEISS.

As diferenças significativas entre os grupos para os dois biomarcadores foram verificadas utilizando o teste t, e só p <0,05 foi considerado como significativo.

## 2.4 Modelo matemático preditivo

Os valores para a atividade de GST foram correlacionados com os da escala de lesões branquiais (variável independente) por meio do encaixe de polinômios de terceira ordem, utilizando o método dos mínimos quadrados (0,05 de nível de significância). O polinômio que representa a relação funcional modelada entre a atividade da GST e as lesões branquiais tem esta forma:

$$\sum_{i=1}^{\mu} \alpha_i \cdot x^{(i-1)}$$

Equação 1

onde  $\alpha$  é o coeficiente e  $x$  é a variável independente (lesões branquiais),  $\mu - 1$  é o grau do polinômio melhor ajustadas aos dados, nesse caso  $\mu = 4$ .

A primeira derivada do polinômio equipada tem esta forma:

$$\sum_{i=1}^{\mu} (i - 1) \cdot \alpha_i \cdot x^{(i-2)}$$

Equação 2

e representa uma função tangente em qualquer ponto da função de (1) e foi utilizada para obter o ponto de inflexão ou o valor máximo da Eq. 1, quando a função começa a diminuir drasticamente (Carvalho-Neta et al, 2012).

### 3. Resultados

#### 3.1 Biomarcadores enzimático e morfológico

Uma maior atividade da GST foi observada no hepatopâncreas de *U. cordatus* do local potencialmente contaminado do que naqueles da área de referência ( $p < 0,05$ ). Contudo, valores nulos ( $0,00 \mu\text{mol mg}^{-1}$  de proteína<sup>-1</sup>) foram registrados (apenas) para a área portuária.

Apenas três tipos de lesões branquiais (ruptura de células pilastra, deslocamento/rompimento da cutícula e deformação do canal marginal) foram identificados em um pequeno percentual dos caranguejos capturados na área de referência. No entanto, nos caranguejos da área portuária foram observadas oito tipos de deformações nas brânquias ( $P < 0,05$ ). Nesses caranguejos foram frequentemente observadas alterações como: deformação do canal marginal (70%), rompimento de células pilastras (98%), necrose (65%), deslocamento/ruptura da cutícula (61%), infiltração hemocítica (49%), desarranjo (33%), inchaço (21%) e colapso das lamelas (18%) (Fig. 2).

#### 3.2 Modelo matemático com atividade da GST e lesões branquiais

O modelo matemático mostrou que a atividade da GST aumenta proporcionalmente com o desenvolvimento das lesões branquiais (Fig. 3). Contudo, observou-se que para lesões graves, a atividade de GST é muito baixa, afastando-se do padrão de proporcionalidade linear. Para explicar este tipo de relação no modelo, realizou-se o ajuste de polinômios de terceira ordem, utilizando o método dos mínimos quadrados. Os valores da atividade da GST apresentaram uma forte correlação linear e polinomial com as lesões branquiais.

Em síntese, uma alta atividade da GST indicou lesões medianas (deformação do canal marginal, ruptura de células pilastras) e uma atividade nula (igual a zero) indicou lesões mais graves, do tipo colapso lamelar.

### 4. Discussão

O modelo matemático apresentado neste estudo mostrou-se eficiente para correlacionar a atividade da GST com lesões branquiais em caranguejos *U. cordatus* de áreas portuárias. Este modelo indica que a atividade

da enzima aumenta até surgirem lesões graves. Após um limite, a atividade da GST diminui drasticamente para níveis muito baixos (ou até mesmo nulos) que leva a lesões irreversíveis (colapso da lamela).

O modelo obtido pode ser explicado pela ação de biotransformação desempenhada pela GST (Carvalho-Neta et al, 2012): as transformações metabólicas de substâncias químicas em substâncias mais polares geralmente aumentam o tamanho e o peso molecular, facilitando assim a sua excreção e eliminação do organismo (Hayes et al, 2005). Estas modificações estruturais reduzem o armazenamento de substâncias no organismo, mas também levam a uma redução da meia-vida da enzima (Karami et al, 2011). Assim, uma exposição crônica à concentrações subletais de produtos tóxicos no ambiente aquático pode causar uma série de efeitos (como as lesões branquiais, por exemplo) que não causam a morte imediata dos organismos, mas que representam perturbações importantes que impedem que o organismo realize suas funções no ecossistema, inclusive podendo progredir para a morte (Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

A extrapolação do modelo criado por Carvalho-Neta et al (2012) para outra espécie e ambiente refere-se ao fato de que não existe uma única espécie de organismo que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema. Um nível seguro para uma espécie de peixe pode não ser o mesmo para uma espécie de caranguejo, por exemplo. Cada espécie apresenta uma sensibilidade à uma determinada substância (Vitozzi e De Angelis, 1991). Além disso, competição, predação e outras interações interespecíficas podem aumentar o estresse dos organismos, resultando no aumento da sensibilidade (Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Em nosso estudo, os caranguejos da área contaminada apresentaram um nível significativamente mais elevado de atividade da GST, em comparação à análise feita na área de referência. Esta resposta está de acordo com o esperado, haja vista que estudos anteriores têm mostrado um aumento acentuado nos níveis de GST em resposta ao stress oxidativo em áreas contaminadas (Yi et al, 2007). Por outro lado, baixos níveis de atividade da GST, também podem ser encontrados em áreas altamente contaminadas (Ventura et al, 2002; Carvalho-Neta et al, 2012), podendo assim, justificar os valores muito baixos (e até nulos) registrados para a área portuária.

A identificação e quantificação das alterações morfológicas nas brânquias também seguiu esse mesmo padrão, em que as lesões branquiais graves foram registradas apenas para a região portuária. E, portanto, confirmam o resultado obtido para a atividade enzimática. Haja vista que os estudos histopatológicos são considerados como indicação direta de efeito adverso sobre os organismos (Osman et al, 2010), uma vez que, as brânquias permanecem em contato com o ambiente externo e são particularmente sensíveis à mudanças na qualidade ambiental, tornando-se o principal “alvo” dos contaminantes (Ruppert et al, 2005). Lesões semelhantes às identificadas neste estudo foram relatadas anteriormente para algumas espécies de caranguejos expostas a diferentes tipos de contaminação (Maharajan et al, 2015; Negro, 2015; Vasanthi et al, 2014; Rebelo et al, 2000). Isto significa que tais alterações não são específicas e podem ser induzidas por diferentes tipos de contaminantes.

As duas áreas de manguezais estudadas possuem uma função equivalente dos ecossistemas que é representada pela composição das árvores, a estrutura da vegetação, altura de inundação pelas marés, e produtividade (a partir de folhas no sedimento) (Gamfeldt et al, 2015). E portanto, acredita-se que as diferenças observadas quanto a atividade da GST e lesões branquiais para a área portuária, provavelmente são um reflexo do impacto ocasionado pelos contaminantes aos quais esta área está submetida. Estudos anteriores de sedimento e água na área do porto apresentaram níveis significativamente mais elevados de mercúrio e cromo, o que

confirma que a zona portuária na área estuarina de São Marcos é um local de alto risco de exposição a alguns contaminantes (Carvalho-Neta e Abreu-Silva, 2010; Carvalho-Neta et al, 2012; Sousa et al, 2013).

Este estudo foi caracterizado por uma abordagem *in situ*. E os testes realizados nesta esfera tendem a ser mais realísticos do que os realizados em laboratório, pois avaliam em tempo real os processos dinâmicos, como sinergismo ou antagonismo, que ocorrem nos ecossistemas aquáticos, refletindo maior ou menor toxicidade para os diferentes organismos (Aragão e Araújo, 2006). No ambiente natural, devido à redução na persistência e biodisponibilidade, os efeitos da maioria das substâncias químicas são menos danosos do que em laboratório, com exceções para algumas substâncias (Aragão e Araújo, 2006). Assim, os dois parâmetros avaliados *in situ* nesta espécie nativa são uma ferramenta útil, com a vantagem de proporcionar informações quantitativas de relevância ecológica sobre os efeitos adversos crônicos causados pela contaminação do ambiente aquático (Van der Oost et al, 2003).

Nossos resultados indicam adultos de *U. cordatus* como espécie sentinela para programas de biomonitoramento de ambientes estuarinos. Uma vez que possui características importantes, como: a) abundância e disponibilidade; b) significativa representação ecológica; c) conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; d) estabilidade genética e uniformidade de suas populações; e) baixo índice de sazonalidade; f) sensibilidade constante e apurada; g) importância comercial; h) e é uma espécie nativa (Rand e Petrocelli, 1995). No entanto, apenas um estágio de vida de *U. cordatus* foi testado. Sendo necessário que estudos posteriores testem a sensibilidade da espécie para os estágios juvenil, larvar e ovos. Haja vista que frequentemente são diferente, geralmente maior, do que no estágio adulto (Lavarías et al, 2013).

Por fim, ressalta-se que apesar do histórico de contaminação da zona portuária, não foi objetivo deste trabalho, identificar os agentes tóxicos presentes nas áreas. Tendo em vista que em estudos *in situ* a determinação de substâncias através de análises químicas tradicionais não oferece a resposta sobre o tipo de agente químico responsável pela toxicidade, assim como não fornece informações sobre as possíveis interações entre as substâncias (Magalhães e Ferrão Filho, 2008). A caracterização química de uma amostra ambiental, não indica o potencial tóxico de uma mistura complexa aos organismos aquáticos (Zagatto et al, 1992). Sendo necessários outros tipos de abordagem para esclarecer estes aspectos.

Os resultados apresentados aqui podem ser empregados como instrumento de vigilância no acompanhamento contínuo das condições dos ecossistemas estuarinos de maneira a detectar impactos ambientais. Bem como, os resultados dos parâmetros dos caranguejos da área de referência podem servir de base para comparar e avaliar as mudanças que podem ser detectadas em caranguejos capturados em outros locais.

O presente modelo relacionou biomarcadores pertencentes a dois níveis diferentes de organização biológica e foi capaz de diagnosticar a condição ambiental da área. Réplicas deste modelo serão possíveis para outras áreas a partir de um número reduzido de amostras e sem a necessidade de amostragens por um longo período de tempo, minimizando um consequente impacto sobre a espécie, assim como, permitindo uma maior agilidade para obtenção de dados sobre a condição ambiental de uma área.

## 5. Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer o Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos (LABOAq) e aos Grupos de Pesquisa em Ecotoxicologia e Monitoramento de Ambientes Aquáticos (GPEMAAq) e em Biologia

Aquática (BioAqua) pelo suporte técnico. Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA), pelo apoio financeiro e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para a concessão da bolsa de mestrado.

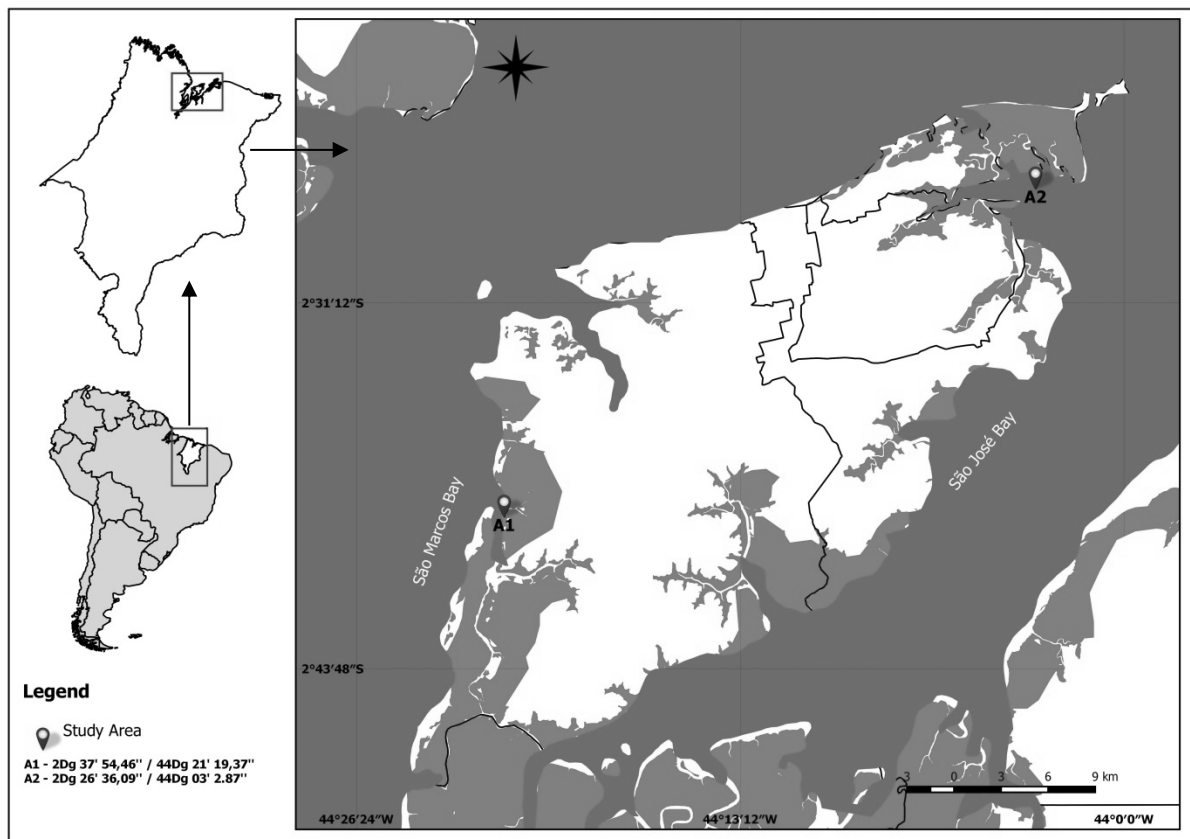
## Referências

- Amado, LL., da Rosa, CE., Leite, AM., Moraes, L., Pires, WV., Leães Pinho, GL., Martins, CMG., Robaldo, RB., Nery, LEM., e Monserrat, JM (2006) Marine Pollution Bulletin, 52, 199–206.
- Aragão, MA. e ARAUJO, RPA (2006) Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. Pp 117-147. In: P.A. Zagatto & E. Bertolotti (eds.), Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações. Editora Rima. São Paulo, São Carlos. 478p.
- Bayen, S. (2012) Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: A review. Environment International, 48: 84–101.
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T (1999) Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess. Journ Fish Disea 22: 25-34.
- Camargo, MMP e Martinez, CBR (2006) Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. Environmental Toxicology and Pharmacology, 21: 61-69.
- Carvalho-Neta, RNF e Abreu-Silva, AL (2010). *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: An in situ study of estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). Braz J Oceanogr 58: 11-17.
- Carvalho-Neta, RNF., Torres, AR., Abreu-Silva, AL (2012) Biomarkers in catfish *sciades herzbergii* (teleostei: ariidae) from polluted and Non-polluted areas (São Marcos' Bay, northeastern Brazil). Appl Biochem Biotec. doi: 10.1007/s12010-011-9519-1.
- Carvalho-Neta, RNF., Sousa, DBP., Almeida, ZS., Santos, DMS., Tchaicka, L (2014) A histopathological and biometric comparison between catfish (Pisces, Ariidae) from a harbor and a protected area, Brazil. Aquat Biosyst 10:12. doi: 10.1186/s12999-014-0012-5.
- Costa, CR., Olivi, P., Botta, CMR., Espindola, ELG (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim. Nova, 31: 1820-1830.
- Duarte, LFA., Souza, CA., Nobre, CR., Pereira, CDS e Pinheiro, MAA (2016) Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western Atlantic. Ecotoxicology and Environmental Safety 133: 176–187.
- Gamfeldt, L., Lefcheck, J.S., Byrnes, J.E.K., Cardinale, B.J., Duffy, J.M. & Griffin, J.N. (2015). Marine biodiversity and ecosystem functioning: what's known and what's next? Oikos 124, 252–265.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., e Jowsey, IR. (2005) Glutathione Transferases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45:51–88.
- Karami, A., Christianus, A., ZamriIshak, ArifSyeh M. e Courtenay, S. C. (2011) The effects of intramuscular and intraperitoneal injections of benzo[a]pyrene on selected biomarkers in *Clarias gariepinus*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 74: 1558–1566.

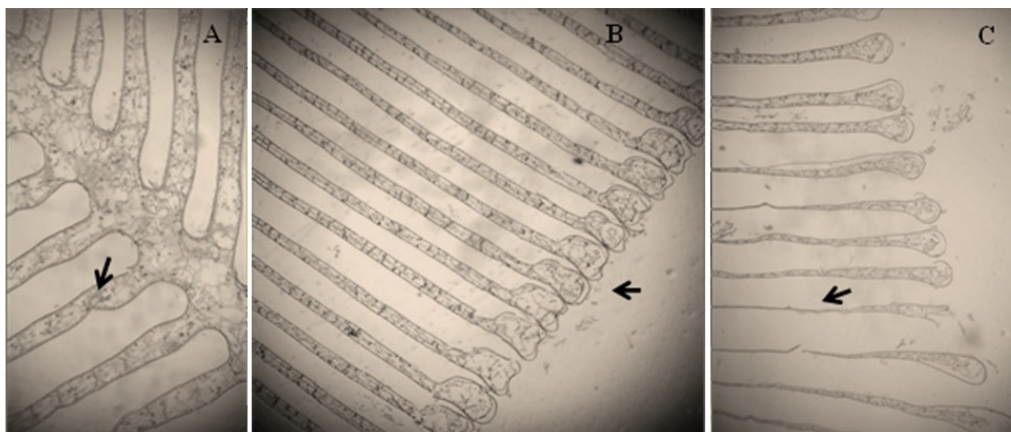
- Ken, JH, Habig, WH e Jakoby, WB (1976) Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*. 251: 6183–6188.
- Lavarias, NA, García, R., Crespo, N., Pedrini, H., Heras. (2013) Study of biochemical biomarkers in fresh water prawn *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to organophosphate fenitrothi on *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96:10–16.
- Magalhães, DP e Ferrão Filho, AS. (2008) A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos *Oecol. Bras.*, 12(3): 355-381.
- Marmion, M., Luoto, M., Heikkinen, R. K., e Thuiller, W. (2009). *Ecological Modelling*, 220, 3512–3520.
- Maharajan A, Narayanasamy Y, Ganapiriya V, Shanmugavel K (2015) Histological alterations of a combination of Chlorpyrifos and Cypermethrin (Nurocombi) insecticide in the fresh water crab, *Paratelphusa jacquemontii* (Rathbun). *JOBASZ* 72: 104–112.
- Negro, CL (2015) Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). *Ecotoxicol Environ Saf* 113:87-94.
- Norena-Barroso, E., Simá-Álvarez, R., Gold-Bouchot, GE., Zapata-Pérez, O. (2004) Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the the Estuary of Chetumal, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 263- 269.
- Nudi AH, Wagener ALR, Francioni E, Scofield AL, Sette CB, Veiga A (2007) Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. *Environ Internat* 33: 315–327.
- Osman, AGM., Reheem, A.M.A., Abuelfadl, K.Y., GadEl-Rab, AG. (2010) Enzymatic and histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in fishes. *Natural Science*, 2(11): 1302-1311.
- Pinheiro MAA, Silva PPG, Duarte LFA, Almeida AA, Zanotto FP (2012) Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). *Ecotoxicol Environ Saf* 81: 114–121.
- Pinheiro MAA, Duarte LFA, Toledo TR, Adam ML, Torres RA (2013) Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environ Monit Assess* 185(10): 8273-8285.
- Rand, GM e Petrocelli, SR (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washington. 665p.
- Rebelo MF, Rodriguez EM, Santos EA, Ansaldo M (2000) Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp Biochem Physiol C* 125: 157–164.
- Ribeiro, CAO., Vollaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H. (2005) Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, 74: 53-69.
- Ruppert, EE., Fox, RS., Barnes, RD. *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. Roca: São Paulo, 2005.
- Santos, MCF (2002) Drinking and osmoregulation in the mangrove crab *Ucides cordatus* following exposure to benzene. *Comp Biochem Physiol* 133: 29–42.



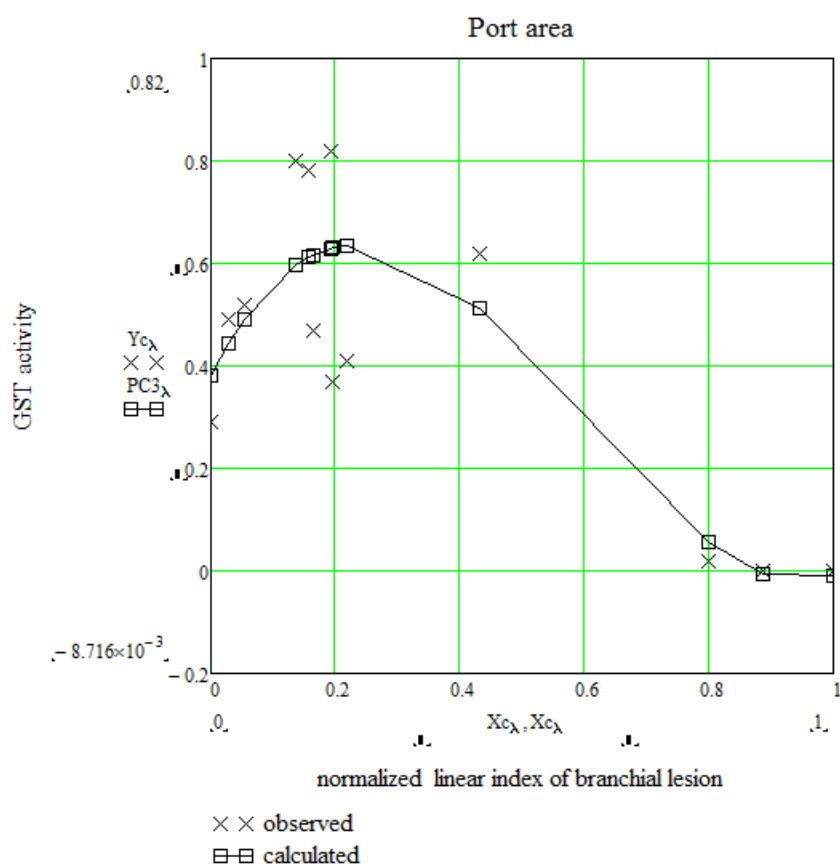
- Sousa DBP, Almeida ZS, Carvalho-Neta RNF (2013) Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes) to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil. *Am J Aquat Res* 41: 305-312
- Umbuzeiro, GA., Kummrow, F., Roubicek, DA. e Tominaga, MY (2006). *Environment International*, 32, 359–364.
- Valdez Domingos, FX., Azevedo, M., da Silva, MD., Randi, M., Freire, CA., Assis, HCS e de Ribeiro, CAO (2007). *Environmental Research*, 105, 350–363.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen, NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.
- Vasanthi LA, Muruganandam A, Revathi P, Baskar P, Jayapriyan K, Baburajendran R, Munuswamy N, (2014) The application of histo-cytopathological biomarkers in the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) to assess heavy metal toxicity in Pulicat Lake, Chennai. *Mar Pollut Bull* 81: 85–93.
- Ventura, EC., Gaelzer, LR., Zanette, J., Marques, MRF., Bainy, ACD. (2002) 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.
- Vitozzi, L. e DE Angelis, GA. (1991) Critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. *Aquatic Toxicology*, 19(2): 167-204.
- Yi, X., Ding, H., Lu, Y., Liu, H., Zhang, M., & Jiang, W. (2007). *Chemosphere*, 68, 1576–1581.
- Zagatto, PA., Bertolotti, E., Gherardi-Goldstein, E. e Souza, HB (1992) Avaliação de toxicidade em sistemas de tratamento biológico de efluentes líquidos. *Revista DAE*, 51 (166): 1-6.



**Figura 1.** Áreas de captura do caranguejo *Ucides cordatus* na Ilha de São Luis (Brasil), onde A1 corresponde a área portuária (uma região potencialmente contaminada) e A2 a área de referência.



**Figura 2.** Alterações branquiais identificadas em *U. cordatus* capturados na região portuária, Baía de São Marcos, Maranhão, Brasil. (A) infiltração hemocítica; (B) deformação canal marginal; (C) colapso das lamelas.



**Figura 3.** Correlação linear e ajuste dos polinômios entre a atividade de GST com os valores da escala de lesões branquiais observadas em *U. cordatus* capturados na área portuária, Baía de São Marcos, Maranhão, Brasil.

**Tabela 1.** Valores médios, máximos e mínimos da atividade da GST para área portuária e para a área de referência.

Área	Média±DP	Valor máximo	Valor mínimo
Portuária	1,03±0,07	2,69	0,00
Referência	0,78±0,59	0,92	0,03

## Journal Experimental of Biology

### Manuscript preparation

#### 1. General information

JEB requires authors to submit their manuscripts online using the [Bench>Press manuscript processing system](#). All manuscripts should adhere to the journal's [terms of submission](#).

Authors are required to read our [journal policies](#) before preparing their manuscripts and to complete and submit our [submission checklist](#) with their manuscripts. This form asks authors to confirm that they have followed best practice guidelines regarding experimental subjects, data reporting and statistics. The checklist is based on the [NIH Principles and Guidelines for Reporting Preclinical Research](#) and is intended to help ensure high standards for reporting and to aid reproducibility.

All pre-submission or general editorial queries should be directed to the [Editorial Office](#).

---

#### 2. Manuscript length

The following table shows the maximum word count of the main text (excluding title page, summary, references and figure captions) and maximum number of display items (figures and tables) for different article types.

Article type	Maximum word count	Maximum no. of display items
Research Article	7000	10
Short Communications	2500	3
Methods & Techniques	2500	3
Review	7000	8
Commentary	4500	5

Articles exceeding the limits specified above will be returned to authors at submission.

[Back to top](#)

---

### 3. Preparing the text and tables

The information below relates to a standard Research Article. For all other article types, please refer to the style and layout guidelines provided on our [article types](#) page.

#### 3.1 File formats

For manuscript text and tables, our preferred **file format** is **Microsoft Word .docx** (or **.doc**). We also accept Pages (rtf format) and LaTeX.

Please include tables as part of the manuscript file. Tables must be editable and not embedded as an image.

If you are submitting a LaTeX file, please include any component files, such as .st (style file), .cls (class file) and .bib (bibliography file) in your file submission. Please note that LaTeX files will be converted to Microsoft Word files during the production process and that authors will be required to check the conversion of symbols and special characters carefully at the proofing stage.

For mathematical equations, our preferred file format is MathType. We also accept Equation Editor (Microsoft Word) and LaTeX.

#### 3.2. Article sections

##### 3.2.1. Title page

This section should include a **title** of 120 characters or less that clearly and concisely summarises your specific findings and avoids specialist abbreviations, a **running title** of 40 characters or less, the full **names** (including middle initials) **and affiliations of all authors** (including present addresses for authors who have moved), and the **corresponding author's email address**. Please note any cases where authors contributed equally to the work. Please also include **3-6 key words** for indexing purposes (select key words that will make your manuscript easily searchable).

##### 3.2.2. Summary statement

Provide a brief Summary Statement for use in emailed and online tables of content alerts. The text should be between 15 and 30 words, and should explain, without overstatement, why someone should read the article. Please do not simply repeat the title, and avoid unfamiliar terms and abbreviations, as the text should be comprehensible to non-experts. We reserve the right to edit the text.

### 3.2.3. Abstract

Provide a brief abstract of no more than 250 words for Research Articles (150 words for Short Communications and Methods & Techniques). This should succinctly and clearly introduce the topic of the paper, summarise the main findings and highlight the significance of the data and main conclusions. The abstract is used by abstracting services without modification and is often read more frequently than the full paper and therefore needs to be comprehensible in its own right. Do not include subheadings or references, and avoid any non-standard abbreviations.

### 3.2.4. Introduction

This section should succinctly provide the background information that is required to set the results into their proper biological context. It should not contain subheadings.

### 3.2.5. Materials and methods

This section should include sufficient detail to understand and to replicate the experiments performed, in conjunction with cited references. It should be divided into sections, and should include subsections detailing reagents, animal models and statistical analysis. Provide names and locations (town, state, country) for ALL equipment and reagent suppliers. Give Latin names and taxonomic authority (e.g. Linnaeus) for all experimental species. Reporting standards should follow those recommended in our [journal policies](#) and [submission checklist](#).

### 3.2.6. Results

This section should describe the results of the experiments performed and should be broken up by subheadings to organise the findings presented and walk the reader through the results. Reproducibility of results must be included – see our [submission checklist](#) for further information. Please ensure that the distinction between new results and published findings/established facts is clear.

### 3.2.7. Discussion

This section should explain the significance of the results and should place them into the broader context of the current literature. The Discussion may contain subheadings to highlight important areas that are expanded on in the text.

### 3.2.8. Acknowledgements

This section should mention any individuals or groups that are not named as authors but have contributed to the research presented (e.g. in terms of reagents, time, expertise) or writing of the manuscript.

### 3.2.9. Competing interests

Include a statement to identify any potential influences that readers may need to know about when thinking about the implications of the presented research. For more specific information regarding the affiliations and associations that must be disclosed, please see our [journal policies](#) page. Authors without financial or competing interests should explicitly assert this and include the statement 'No competing interests declared'.



### 3.2.10. Author contributions

An author is someone who has made significant and substantial contributions to a study. JEB requires that the independent contributions of each author are stated in the manuscript. Please refer to [journal policies](#) for further information on our authorship policies. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that ALL co-authors have checked and confirmed their contribution statement prior to manuscript submission.

### 3.2.11. Funding

Details of all funding sources must be provided. It is the responsibility of the corresponding author to provide the relevant funding information from ALL authors. Please provide the official funding agency name as listed on the [Crossref Funder Registry](#), i.e. 'National Institutes of Health', not 'NIH', and all relevant grant numbers. If your Funder is not listed in the Registry, please provide the name in full. Where individuals need to be specified for certain sources of funding, please add initials after the relevant agency or grant number. Please use the following format: This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [hfygr667789]. Where no specific funding has been provided for the research, please state 'This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors'.

### 3.2.12. Data availability

All publicly available datasets supporting your work should be included in the Data availability section. Details should include repository name, identifier such as accession number or doi and, where possible, include a hyperlink to the URL of the dataset. Datasets should be made publicly available at the time of publication. For more information on our data deposition requirements, see please see our [Journal Policies](#).

Please note that JEB endorses the [Force 11 Data Citation Principles](#) and recommends that references to datasets should also be included in the reference list with DOIs/accession numbers and hyperlinks, where available.

### 3.2.13. References

All references cited in the text, tables and figure legends should be included in a single reference list at the end of the article. For specific information about reference formatting, please see the [references](#) section below.

### 3.2.14. Figure legends

Figure legends should be listed at the end of the manuscript. The first sentence of the legend should summarise the figure and be in bold. Each figure legend should stand alone and should contain enough information to ensure that the figure is understandable without having to refer to the main text. Figure panels should be labelled with uppercase letters (A, B, C, etc.), and each panel should be described in the legend. Any abbreviations not given in the main text should be defined. For further details on what should be included in figure legends, please refer to our [submission checklist](#).

### 3.2.15. Appendices

This optional section can be used for information that is critical to the manuscript but would interrupt the flow of the article and is not suitable for inclusion as [supplementary information](#). It should be formatted according to normal journal style. All figures, tables and equations should be numbered

separately from the main text as Fig. A1, Table A1, Eqn A1, etc. Please note that the text, figures and tables in an Appendix count towards the overall [manuscript length](#).

### 3.3. Preparing the text

#### 3.3.1. General information

- Prepare manuscripts in English (either US or UK spelling is acceptable but be consistent within the manuscript). Your writing should be comprehensible to editors and reviewers, and your writing style should be concise and accessible. If English is not your first language, please consider using a language editing service prior to submission.
- Ensure that the language in your manuscript is original and does not contain previously published passages of text (including those from your own publications) – see our [journal policies](#) for more details. All accepted manuscripts are routinely screened using plagiarism-detection software.
- Use 1.5 line spacing and continuous line numbering throughout the paper in order to facilitate online reviewing.
- Do not embed figures in the text.
- Cite each figure, table and movie in the text in numerical order. Figure or table parts should be labelled with uppercase letters (A, B, C, etc.). Use the following format for citations: Fig. 1A,B or Figs 1, 2 or Table 1 or Movie 1.
- If necessary, display equations should be cited using the following format: Eqn 1.
- For supplementary figures, tables and equations, cite as Fig. S1, Table S1, Eqn S1.
- Define abbreviations at first mention and include a List of Symbols and Abbreviations used.
- For special characters not available on a standard keyboard (e.g. Greek characters, mathematical symbols), use the Symbol font or the ‘Insert Symbol’ function in Microsoft Word, where possible. For special characters that are not available via this route, please use MathType characters; do not use embedded images (e.g. GIF).

#### 3.3.2. Units and nomenclature

- Units of measurement should follow the SI system, e.g. ml s<sup>-1</sup> rather than ml/s. Guidance on using the SI convention can be found [here](#). Type a space between a digit and a unit, e.g. 1 mm (except 1%, 1°C).
- Use s.e.m. and s.d. for standard errors, etc.
- Taxonomic nomenclature: the Latin names and taxonomic authority (e.g. Linnaeus) should be provided for all experimental species. All species names should be italicized.
- Genetic nomenclature: gene names should be in italic type, but the protein product of a gene should be in Roman type. Genetic nomenclature should be in accordance with established conventions and should be approved by the relevant nomenclature curator if applicable. See below for some relevant links.
- HGNC list of genome databases: <http://www.genenames.org/useful/all-links#ovgdb>
- *Caenorhabditis elegans*: <http://www.wormbase.org>
- *Dictyostelium*: <http://dictybase.org/>
- Chicken: <http://birdgenenames.org/cgnc/guidelines>
- *Drosophila*: <http://flybase.org/wiki/FlyBase:Nomenclature>
- Human: <http://www.genenames.org/about/guidelines>
- Maize: [http://www.maizegdb.org/maize\\_nomenclature.php](http://www.maizegdb.org/maize_nomenclature.php)
- Mouse: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/lists/lists.shtml>
- *Saccharomyces cerevisiae*: <http://www.yeastgenome.org/>
- *Schizosaccharomyces pombe*: <http://www.pombase.org/submit-data/gene-naming-guidelines>
- *Xenopus*: <http://www.xenbase.org/gene/static/geneNomenclature.jsp>
- Zebrafish: <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>

#### 3.3.3. References

### 3.3.3.1. References in text

References in the text should be cited using the Harvard (name, date) referencing system.

Each reference cited in the text (including those cited in supplementary information) must be listed in the Reference list and vice versa: please check these carefully.

Literature citations in text are as follows.

- One author – (Jones, 1995) or (Jones, 1995; Smith, 1996).
- Two authors – (Jones and Kane, 1994) or (Jones and Kane, 1994; Smith, 1996).
- More than two authors – (Jones et al., 1995) or (Jones et al., 1995a,b; Smith et al., 1994, 1995).
- Manuscripts accepted for publication but not yet published: include in Reference list and cite as (Jones et al., in press).
- Manuscripts posted on preprint servers but not yet published: include in Reference list and cite as (Smith et al., 2016 preprint).
- Citation of unpublished work: we discourage citation of unpublished data; if it is necessary, use the format (S. P. Jones, unpublished observations/data). Unpublished data cannot be included in the Reference list.
- PhD theses: include in Reference list and cite as (Smith, 2016).
- Website URLs: cite in the text but do not include in the Reference list; provide the URL and, if the website is frequently updated, the date that the site was accessed.
- Personal communications (i.e. the unpublished observations of other scientists): when a person who is not an author on the paper is the source of unpublished data, those data should be cited as a personal communication using the format (full name, institution, personal communication). Personal communications should not be cited in the Reference list and will only be published when substantiated by written permission (e.g. email) from the scientist cited.
- Dataset: we recommend that all publicly available datasets are fully referenced in the reference list with an accession number or unique identifier such as a DOI. Cite as (Jones and Jane, 1994).

### 3.3.3.2. Reference List

References are listed in alphabetical order according to surname and initials of first author.

- Use the following style:

#### *Journal*

**Rivera, A. R. V., Wyneken, J. and Blob, R. W.** (2011). Forelimb kinematics and motor patterns of swimming loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): are motor patterns conserved in the evolution of new locomotor strategies? *J. Exp. Biol.* **214**, 3314-3323.

#### *Book*

**Hochachka, P. W. and Somero, G. N.** (2002). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford, UK: Oxford University Press.

#### *Book chapter*

**Feller, G.** (2008). Enzyme function at low temperatures in psychrophiles. In *Protein Adaptation in Extremophiles* (ed. K. S. Siddiqui and T. Thomas), pp. 35-69. New York: Nova Science Publishers, Inc.

#### *Preprint server*

**Baillie-Johnson, P., van den Brink, S. C., Balayo, T., Turner, D. A. and Martinez Arias, A.** (2014). Generation of aggregates of mouse ES cells that show symmetry breaking, polarisation and emergent collective behaviour in vitro. *bioRxiv* doi:10.1101/005215.

#### *PhD thesis*

**Jones, A. R.** (2016). Title of thesis. *PhD thesis*, University of Washington, Seattle, WA.

#### *Dataset with persistent identifier*

Zheng, L.-Y., Guo, X.-S., He, B., Sun, L.-J., Peng, Y. and Dong, S.-S. (2011). Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *GigaScience Database*. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Kingsolver, J. G., Hoekstra, H. E., Hoekstra, J. M., Berrigan, D., Vignieri, S. N., Hill, C. E., Hoang, A., Gibert, P. and Beerli, P. (2001). Data from: The strength of phenotypic selection in natural populations. *Dryad Digital Repository*. <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.166>.

- If there are more than 10 authors, use 'et al.' after the 10th author.
- Within a group of papers with the same first author, list single author papers first, then papers with two authors, then et al. papers. If more than one reference exists for each type, arrange in date order. Use a and b for papers published in the same year.
- 'In press' citations must have been accepted for publication and the name of the journal or publisher included.

### 3.4. Preparing tables

Prepare tables in 'cell' format and include in the same file as the main text. Tables must be editable and not embedded as an image.

The title of the table should be a single sentence and should summarise the contents of the table. Details referring to one or more isolated item(s) in the table are best given in a table footnote. Units should be given in parentheses at the top of each column (do not repeat in the table).

### 3.5. Preparing display equations

Our preferred file format for equations is MathType. We also accept Equation Editor (Microsoft Word) or LaTeX.

Please number all display equations, consecutively. They should take the form:

$$Q = \frac{-\kappa A_p [p]}{\mu T_p}, \quad (1).$$

Units should be defined in the text rather than included in the equation.

[Back to top](#)

---

## 4. Preparing figures

### 4.1. General information

Figures should be numbered in a single series that reflects the order in which they are referred to in the text.

Figures should be prepared at the smallest size that will convey the essential scientific information; final figure size is at the discretion of the journal. For further information on how to arrange your figures to optimise viewing by reviewers and readers, download our [figure layout](#) guidelines.

At initial submission, you may submit a single PDF file containing all text and figures. Once an article has been accepted for publication, you are required to submit separate files for each figure (see below for file formats).

Figure legends should be included in the main text file and not in the figure file.

There are no charges for the use of colour in figures, although gratuitous use of colour in graphs and diagrams should be avoided and colour should only be used to improve scientific clarity.

We strongly encourage the use of colours that are suitable for colour-blind readers, particularly in the preparation of fluorescent microscopy images. Most notably, we discourage the use of red/green for the display of 2-channel images; authors should consider an alternative colour combination (e.g. magenta/green).

## 4.2. Preparing graphs and diagrams (line art)

### 4.2.1. General information

- The maximum figure size, including lettering and labels, is 180 mm × 210 mm.
- Line thicknesses and symbols should be of sufficient size to ensure clarity if the figure is reduced in size.
- For graphs, our preferred symbols are filled and open circles, triangles, squares, or diamonds; where possible, the same symbol should be used for the same entity in different figures.
- Colour: supply line art in RGB (not CMYK) mode, as this maximizes colour quality and is how the figures will be displayed online; do NOT use Spot, Pantone or Hex colours and do NOT assign a colour profile.
- Text labelling: use 12 pt bold uppercase letters (A, B, C, etc.) to distinguish figure panels; other labelling should be 8 pt Arial font (sentence case) (headings should be bold); for gene sequences, use Courier font to ensure that each letter is the same width; use Symbol font for Greek characters.

### 4.2.2. File formats

Authors should submit their source figures in an editable format (vector graphic) that retains font, line and shape information. This format ensures that we can edit where necessary and produce high-quality print and online PDFs.

**We accept the following file formats for graphs/line art: EPS, PDF, and WMF.**

- Applications such as Adobe Illustrator, Canvas, DeltaGraph, Corel Draw, Freehand, MatLab and SigmaPlot provide these formats.
- Please ensure that you 'export' or 'save' with (text/font) information included
- Save text/font information as 'text' not 'curves' or 'outlines'.
- If combining images, always 'embed' images; do NOT simply 'link' them. In Adobe Illustrator, copying and pasting or dragging an image directly from Adobe Photoshop will embed the image. Alternatively, if you use the 'Place' command, uncheck 'Link' in the dialogue box. For other software applications, please refer to the documentation (often there will be a 'link', 'proxy', 'OLE' or 'OPI' option, which must NOT be used with EPS files).
- *Note that submission of JPEG or TIFF format for graphs/line art may delay production of your article.*

## 4.3. Preparing photographic images

### 4.3.1. General information

Photographic images (also known as bitmap images) are made up of pixels (e.g. light, fluorescence and electron microscopy, gels, and traditional photography)

- The maximum figure size, including lettering and labels, is 180 mm x 210 mm.
- Images should be saved at a resolution of 300 pixels per inch. Any image quality option should be set to maximum.
- For micrographs, use a scale bar to show the magnification and give the length of this in the figure legend.
- Colour: supply images in RGB (not CMYK) mode, as this maximizes colour quality and is how the figures will be displayed online; do NOT use Spot, Pantone or Hex colours and do NOT assign a colour profile.
- Text labelling: use 12 pt bold uppercase letters (A, B, C, etc.) to distinguish figure panels; other labelling should be 8 pt Arial font (sentence case) (headings should be bold); for gene sequences, use Courier font to ensure that each letter is the same width; use Symbol font for Greek characters.

### 4.3.2. File formats

Accepted file formats are: **EPS/PDF** (vector based, such as Adobe Illustrator).

- EPS / PDF format for figures with mixed data, such as line drawn vector-graphs and Photographic Images.
  - TIFF format with text-layers enabled, for Photographic Images only.
  - ARIAL or HELVETICA must be the font choice used throughout figure preparation.
- PowerPoint images:** we do NOT accept PowerPoint files. Instead, please save as PDF using the instructions below.
- Go to 'print' and then choose 'Save as PDF' in the print dialogue box
  - You can download free software which will enable you to print EPS/PDF files to disk: [Download software for Windows](#)  
[Download software for Mac](#)

## 4.4. Image manipulation

Any alterations made to figures using computer software must be consistent with our [image manipulation](#) policy. The images presented in the manuscript must remain representative of the original data, and the corresponding author will be asked to confirm this at submission. Please read our requirements for preparing your figures ([download PDF](#)) to avoid a potential delay in the publication process or rejection on the basis of non-compliance with these guidelines.

All accepted manuscripts are routinely screened by our production department for any indication of image manipulation. If evidence of inappropriate manipulation is detected, the journal's Editors might ask for the original data to be supplied and, if necessary, may revoke the acceptance of the article.

## 4.5. Figure permissions

It is the responsibility of the author to obtain permission to use figures from another publication in any article submitted to JEB and to ensure that any such use is credited to the source. Any fees associated with use of the figure are the responsibility of the author. Written permission from the author and/or publisher of the original material, as appropriate, should be provided at the time of submission, otherwise publication may be delayed. If a figure has been modified from a previously published figure, please check with the copyright owners to see whether permission is required and include a complete citation/reference for the original article.

[Back to top](#)

---

## 5. Preparing movies

Our preferred **file format** for movies is **.mp4**, but we also accept **.mov**

Please provide a separate text file containing the titles and captions of all movies. Please keep captions as short as possible and ensure that they explain what is being shown in the movie and any necessary details of how the movie was made.

Movies should be numbered in a single series that reflects the order in which they are cited in the text, e.g. see Movie 1. Movie 2, etc.

In the final online article, all movies are displayed in the [supplementary information](#).

We have a limit of **50 MB** for all movie and supplementary information files. If your movies exceed this limit, please contact the [Editorial Office](#) for advice before submission; we may be able to reduce the size of your movie files without losing resolution or discuss other options for hosting. For example, if you have movies that exceed our file limits and that are supplementary to the core message of the paper (or if you wish to provide readers with a higher-resolution version of the movie than can be displayed within our file size limits), we encourage you to deposit them in a reliable data repository such as [Dryad](#) or [Figshare](#) and link to them from the main paper - please see our guidelines on Data deposition for further information. Alternatively, we may consider hosting large movies that are central to the article on the journal's [YouTube channel](#), again with a direct link from the main paper.

Please note that we reserve the right to make movies or other data forms available on an Open Access basis via The Company of Biologists' [website](#), [YouTube](#) and other online channels. Where we do, the movies and other data forms may on occasion be made available under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported \(CC-BY\) Licence](#). These terms permit the copying and/or adaptation of the movie and the distribution of the movie or any such adaptation by any means and in any medium or format to any other person, including for commercial purposes, provided that you are credited as the original author. There would be no additional cost to you, the author.

[Back to top](#)

---

## 6. Supplementary information

Data that are essential for interpretation of the results of the main paper should be included in the main paper. Supplementary information provides access to supporting data that do not appear in the printed article or PDF but that accompany the final version of a paper online.

These data are peer reviewed and subject to the same criteria as the data that are to be published in the paper itself. During peer review, editors and reviewers are asked to assess whether supplementary information is appropriate and essential for supporting the findings of a paper.

All supplementary data will be strictly limited to **a total of 50 MB per article**.

We only accept data files - such as datasets, movies, audio, figures and tables - as supplementary information. We do NOT accept text files that provide additional materials and methods, results or discussions related to the article; these should be included in the article itself. Statistical and computational analyses should ideally be included in the methods section or as an appendix in the

main article. Very large files or those requiring specialist software are not suitable as supplementary information. For large datasets, e.g. computational analyses, please see our guidelines on [data deposition](#).

Criteria for each supplementary information type are listed in the table below. The total number of supplementary information items of all types (figures, tables, movies, etc.) per article should not exceed the total number of figures and tables in the main article.

With the exception of movies (see section on [preparing the movies](#)) and large tables, **all supplementary information should be collated into a single PDF file**. If your table is very large, or you wish readers to be able to export and/or manipulate the data, we would prefer you to submit it as a Microsoft Excel file.

Use a separate numbering system from that used in the main article and use the format Fig. S1, Fig. S2, Table S1 etc. If a supplementary figure relates to a particular figure in the text, please cite it as close to this figure as possible. For the convenience of readers, please place each figure next to the corresponding legend in the supplementary information PDF. Please include a legend for each figure and a title for each table.

Please note that supplementary information files are not copyedited by JEB and therefore authors must ensure that all files are checked carefully before submission and that the style of terms and figures conforms to that of the article. Modification of supplementary information after publication will require a formal correction.

Refer to each piece of supplementary information at least once within the text of the main article (the article that is published in the print issue of the journal).



## 6 CONCLUSÕES

O conhecimento científico gerado a partir da análise de biomarcadores histológicos e bioquímicos em caranguejos *U. cordatus* foi fundamental para maior entendimento das respostas biológicas dos organismos da região portuária da Ilha de São Luis. Assim, os dados apresentados neste estudo permitem concluir que:

- O levantamento bibliográfico indicou a eficiência do uso de biomarcadores em crustáceos para o monitoramento de áreas portuárias;
- *U. cordatus* (adulto) comportou-se como uma espécie promissora para o monitoramento ambiental da região portuária da Ilha de São Luís;
- As lesões branquiais, a atividade da GST e o peso total de *U. cordatus* representam bons indicadores de estresse em geral e tornam esta abordagem adequada para o monitoramento ambiental sem a pretensão de quantificar o acúmulo de poluentes;
- O modelo matemático mostrou-se eficiente para relacionar lesões branquiais e atividade da GST em *U. cordatus*, a fim de fornecer um panorama do impacto ambiental ao qual esta espécie está submetida;
- Os resultados obtidos a partir de caranguejos da área de referência podem servir de base para comparar e avaliar mudanças que podem ser detectadas em caranguejos capturados em outros locais;
- Esta abordagem integrada é rápida, sensível, e relativamente barata para o monitoramento de manguezais a partir de uma espécie nativa com acentuada importância ecológica e econômica;
- A escolha de biomarcadores sensíveis juntamente com a seleção de áreas semelhantes em estrutura e composição são fatores importantes para o sucesso da análise.

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALCANTARA, E.H.; SANTOS, M.C.F.V. Mapeamento de Áreas de Sensibilidade Ambiental para a Preservação de Impactos Ambientais de Derrames de óleo nos Manguezais Próximos à área do Porto do Itaqui, São Luís, MA. **Anais do XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Goiânia, Brasil, INPE, p. 3605-3617, 2005.

AMARAL, V.; PENHA-LOPES, G.; PAULA, J. RNA/DNA ratio of crabs as an indicator of mangrove habitat quality. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 19, p. 56–62, 2009.

ANDRADE, C. E.; VASCONCELOS, J. A.; OLIVEIRA, S.M.; IVO, C. T. C. Biologia e pesca do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), no estuário do rio Curimatau, município de Canguaretama – Rio Grande do Norte. **Boletim Técnico Científico do CEPENE**, v. 15, n. 1, p. 31-41, 2007.

ANTAQ. **Portos brasileiros**. Disponível em:

<<http://www.antaq.gov.br/Portal/pdf/Portos/Itaqui.pdf>> Acesso em: 30 de dez. 2014.

ANTAQ. **Porto do Itaqui**. Disponível em:

<<http://www.antaq.gov.br/Portal/pdf/Portos/2012/Itaqui.pdf>> Acesso em 19 de fev. de 2015.

ANTO, M.; ARNAU, S.; BUTI, E.; CORTIJO, V.; GUTIERREZ, E.; SOLE, M. Characterisation of integrated stress biomarkers in two deep-sea crustaceans, *Aristeus antennatus* and *Nephrops norvegicus*, from the NW fishing grounds of the Mediterranean sea. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1455–1462, 2009.

ASTLEY, K. N.; MEIGH, H. C.; GLEGG, G. A.; BRAVEN, J.; DEPLEDGE, M. H. Multivariate Analysis of Biomarker Responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, p. 145-154, 1999.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 145, p. 282-287, 2007.

BARTLETT, A. J.; STRUGER, J.; GRAPENTINE, L. C.; PALACE, V. P. Examining impacts of current-use pesticides in Southern Ontario using in situ exposures of the amphipod *Hyaella azteca*. **Environ Toxicol Chem**, v., p., 2015.

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.

BEBIANNI, M. J.; PEREIRA, C. G.; REYA, F.; CRAVOA, A.; DUARTE, D.; D'ERRICOB G; REGOLI, F. Integrated approach to assess ecosystem health in harbor areas. **Science of the Total Environment**, v. 514, p. 92–107, 2015.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Biochemistry. 5.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan (Brazil)**, 2004.

BLACKMORE, G.; MORTON, B.; HUANG, Z. G. Heavy Metals in *Balanus amphitrite* and *Tetraclita squamosa* (Crustacea: Cirripedia) Collected from the Coastal Waters of Xiamen, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, p. 32-40, 1998.

BAYEN, S. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: A review. **Environment International**, v. 48, p. 84–101, 2004.

BAYEN, S. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: A review. **Environment International**, n. 48, p. 84–101, 2012.

BENETTI, A. S.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. Relative growth of *Uca burgersi* (Crustacea, Ocypodidae) from two mangroves in the southeastern Brazilian coast. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 94, p.67-72, 2004.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess. **Journ Fish Disea**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BHAVAN, P. S.; GERALDINE, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p. 331–339, 2000.

BOETS, P.; LOCK, K.; GOETHALS, P. L. M. Using long-term monitoring to investigate the changes in species composition in the harbour of Ghent (Belgium). **Hydrobiologia**, v. 663, p. 155-166, 2011.

BORGMANN, U.; NORWOOD, W.P. Spatial and temporal variability in toxicity of Hamilton Harbour sediments: Evaluation of the *Hyalella azteca* 4-week chronic toxicity test. **J Great Lakes Res**, v. 19, p. 72-82, 1993.

BOCCHETTI, R.; FATTORINI, D.; PISANELLI, B.; MACCHIA, S.; OLIVIERO, L.; PILATO, F.; PELLEGRINI, D.; REGOLI, F. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. **Aquatic Toxicology**, v. 89, p. 257-266, 2008.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (Brazil), 2015.

BUCHELI, T. D.; KENT, K. Induction of cytochrome P450 as biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. Critical Review in **Environmental Science Technology**, v. 25, p. 201-268, 1995.

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 and Pharmacology**, v. 21, p. 61-69, 2006.

CAMPOS, C. J. G. Content analysis method: tool for the analysis of qualitative data in the health sector. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 57, n. 5, p. 611-614, 2004.

CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BOCCIARELLI, T.; BOCCIO, PD.; FEDERICI, L.; DIILIO, C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, n. 90, p. 48-57, 2008.

CARVALHO-NETA, R.N.F.; ABREU-SILVA, A. L. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: An in situ study of estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, p. 11-17, 2010.

CARVALHO-NETA, R. N. F. Biomarcadores e inteligência artificial para monitoramento de impactos ambientais no Complexo Portuário de São Luís-Maranhão. 2010. 123f. **Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia** / Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 2010.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; TORRES, A. R.; ABREU-SILVA, A. L. Biomarkers in catfish *Sciades herzbergii* (teleostei: ariidae) from polluted and Non-polluted areas (São Marcos' Bay, northeastern brazil). **Appl Biochem Biotec**, v., p., 2012.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. **Latim American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 217-225, 2013.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; SOUSA, D. B. P.; ALMEIDA, Z. S.; SANTOS, D. M. S.; TCHAICKA, L. A histopathological and biometric comparison between catfish (Pisces, Ariidae) from a harbor and a protected area, Brazil. **Aquatic Biosystems**, v. 10, p. 12, 2014.

CASTIGLIONI, D. S.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. Comparative analysis of the relative growth of *Uca rapax* (Smith) (Crustacea, Ocypodidae) from two mangroves in São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 137-144, 2004.

CASTIGLIONI, D. S.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. Physiologic sexual maturity of the fiddler crab *Uca rapax* (Smith, 1870) (Crustacea, Ocypodidae) from two mangroves in Ubatuba, Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 49, p. 239-248, 2006.

CASTIGLIONI, D. S.; SILVA-CASTIGLIONI, D.; OLIVEIRA, P. J. A. Reproductive biology of *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae) in two mangrove areas from the south coast of state of Pernambuco, Brazil. **Journal of Integrated Coastal Zone Management**, v. 13, n. 4, p. 433-444, 2013.

CAVALCANTE, R. B.; CALIXTO, P.; PINHEIRO, M. M. K. Content analysis: general considerations, relationships with the research question, possibilities and limitations of the method. **Informação & Sociedade: Estudos**, v. 24, n. 1, p. 13-18, 2014.

COMPERE, WANSON, PEQUEUX, GILLES, GOFFINET. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. **Tissue & Cell**, v. 21, n. 2, p. 299-318, 1989.

CORREA, J. D.; FARINA, M.; ALLODI, S. Cytoarchitectural features of *Ucides cordatus* (Crustacea Decapoda) hepatopancreas: structure and elemental composition of electron-dense granules. **Tissue & Cell**, v. 34, n. 5, p. 315–325, 2002.

CORREIA, A. D.; COSTA, M. H.; LUIS, O. J.; LIVINGSTONE, D. R. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 289, p. 83– 101, 2003.

COSSA, D. A. Review of the *Mytilus* spp as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. **Oceanol Acta**, v. 12, p. 417–32, 1989.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, 1820-1830, 2008.

CHUPANI, L.; ZUSKOVA, E.; STARA, A.; VELISEK, J.; KOUBA, A. Histological changes and antioxidant enzyme activity in signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) associated with sub-acute peracetic acid exposure. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 48, p. 190 – 195, 2016.

DAHMS, H. U.; LI, X.; ZHANG, G.; QIAN, P. Y. Resting stages of *Tortanus forcipatus* (Crustacea, Calanoida) in sediments of Victoria Harbor, Hong Kong. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 67, p. 562-568, 2006.

DARBRA, R. M.; PITTAM, N.; ROYSTON, K. A.; DARBRA, J. P.; JOURNEE, H. Survey on environmental monitoring requirements of European ports. **J Environ Manag**, v. 9, p. 1396–1403, 2009.

DAVANSO, M. B.; MOREIRA, L. B.; PIMENTEL, M. F.; COSTA-LOTUFO, L. V.; ABESSA, D. M. S. Biomarkers in mangrove root crab *Goniopsis cruentata* for evaluating quality of tropical estuaries. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 80-88, 2013.

DAVIS, J. D.; MACKNIGHT, S. Environmental Considerations for Port and Harbor Developments. **USA: World Bank Technical**, 1990.

DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYORKOS, R. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Mar Pollut Bul**, v. 31, p. 19–27, 1995.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment in Invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 3, p. 161–72, 1994.

DEPLEDGE, M. H.; FORBES, T. L.; FORBES, V. E. Evaluation of Cd, Cu, Zn and Fe concentrations and tissue distributions in the benthic crab, *Dorippe granulata* (de Haan 1841) from Tolo Harbour, Hong Kong. **Environ Pollut**, v. 81, p. 15–19, 1993.

DIAS-NETO, J. (ORG.) 2011 Proposta de plano nacional de gestão para o uso sustentável do caranguejo-uçá, do guaiamum e do siri-azul. IBAMA. 156P.

DIELE, K. Life history and population structure of the exploited mangrove crab *U. cordatus* (L.) (Decapoda: Brachyura) in the Caeté estuary, North Brazil. 2000. 103 p. Tese (Doutorado) – Universität Bremen, Bremen, 2000.

DIELE, K.; KOCH, V.; SAINT-PAUL, U. Population structure, catch composition and CPUE of the artisanally harvested mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in the Caeté estuary, North Brazil: Indications for overfishing? **Aquatic Living Resources**, v. 18, n. 2, p. 169-178, 2005.

DIDHAM, R. K.; TYLIANAKIS, J. M.; HUTCHINSON, M. A.; EWERS, R. M.; GEMMELL, N. J. Are invasive species the drivers of ecological change? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, p. 470–474, 2005.

DISSANAYAKE, A.; BAMBER, S. D. Monitoring PAH contamination in the field (Southwest Iberian Peninsula): Biomonitoring using fluorescence spectrophotometry and physiological assessments in the shore crab *Carcinus maenas* (L.) (Crustacea: Decapoda). **Marine Environmental Research**, v. 70, p. 65-72, 2010.

DISSANAYAKE, A.; PIGGOTT, C.; BALDWIN, C.; SLOMAN, K. A. Elucidating cellular and behavioural effects of contaminant impact (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) in both laboratory-exposed and field-collected shore crabs, *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). **Marine Environmental Research**, v. 70, p. 368-373, 2010.

DISSANAYAKE, A.; GALLOWAY, T. S.; JONES, M. B. Seasonal differences in the physiology of *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda) from estuaries with varying levels of



anthropogenic contamination. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 93, p. 320-327, 2011.

DOUGHTIE, D. G.; RAO, K. R. Histopathological and ultrastructural changes in the antennal gland, midgut, hepatopancreas and gill of grass shrimp exposed to hexavalent chromium. **J. Invertebr. Pathol**, v. 43, p. 89–108, 1984.

FERNANDES, A. F. The use of biomarkers in aquatic toxicology studies. **Revista portuguesa de Zootecnia**, n. 1, v. 12, p. 67-86, 2005.

FILLMANN, G.; WATSON, G.; HOWSAM, M.; FRANCONI, E.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. Urinary PAH Metabolites as Biomarkers of Exposure in Aquatic Environments. **Environ Sci Technol**, v. 38, p. 2649-2656, 2004.

FORTES, L. F.; LABIDI, S.; CARVALHO-NETA, R. F. Projeto e construção de bio-ontologia para suporte a sistema multiagente de monitoramento ambiental do complexo portuário da ilha de São Luís do Maranhão. **Revista Científica - Cadernos de Pesquisa**, 2009.

FOSSI, M. C.; SAVELLI, C.; CASINI, S. Mixed function oxidase induction in *Carcinus aestuarii*. Field and experimental studies for the evaluation of toxicological risk due to Mediterranean contaminants. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 121, p. 321–331, 1998.

FREITAS, C. E.; ROCHA, O. Acute toxicity teste with tropical zooplankton *Pseudosida ramosa*: The importance of using native species as test organisms. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 60, p. 241-249, 2011.

FRÍAS-ESPERICUETA, M. G.; ABAD-ROSALESB, S.; NEVÁREZ-VELÁZQUEZA, A. C.; OSUNA-LÓPEZA, I.; PÁEZ-OSUNAC, F.; LOZANO-OLVERAB, R.; VOLTOLINAD, D. Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquatic Toxicology**, v. 89, p. 152–157, 2008.

FUKUYAMA, A. K.; SHIGENAKA, G.; COATS, D. A. Status of intertidal infaunal communities following the Exxon Valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska. **Marine Pollution Bulletin**, v. 84, p. 56–69, 2014.

GALASSI, S.; BETTINETTI, R.; NERI, M. C.; JEANNOT, R.; DAGNAC, T.; BRISTEAU, S.; SAKKAS, V.; ALBANIS, T.; BOTI, V.; VALSAMAKI, T.; FALANDYSZ, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. A multispecies approach for monitoring persistent toxic substances in the Gulf of Gdańsk (Baltic sea). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 39–48, 2008.

GERNHOFER, M.; PAWET, M.; SCHRAMM, M.; MÜLLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem, Stress and Recovery**, v. 8, p. 241-260, 2001.

GREGATI RA; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. Population biology of the burrowing crab *Neohelice granulata* (Crustacea: Decapoda: Varunidae) from a tropical mangrove in Brazil. **Zoologia**, v. 26, p. 32-37, 2009.

GRIFOLL, M.; JORDÀ, G.; ESPINO, M.; ROMO, J.; GARCÍA-SOTILLO, M. A management system for accidental water pollution risk in a harbour: the Barcelona case study. **J Mar Syst**, v. 88, p. 60–73, 2011.

GROVE, S. L.; PROBERT, P. K. Sediment macrobenthos of upper Otago Harbour, New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 33, p. 469–480, 1999.

GU, J.; LI, Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v., p., 2006.

GULER, Y.; FORD, A. T. Anti-depressants make amphipods see the light. **Aquatic Toxicology**, v. 99, p. 397–404, 2010.

HARTNOLL, R. G.; BRODERICK, A. C.; GODLEY, B. J.; SAUNDERS, K. E. Population structure of the land crab *Johngarthia lagostoma* on Ascension Island. **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, p. 57-61, 2009.

IVO, C. T. C.; DIAS, A. F.; BOTELHO; ERRO; MOTA, R. I.; VASCONCELOS, J. A.; VASCONCELOS, E. M. S. Caracterização da população do caranguejo-uçá *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763) capturado em estuários do nordeste do Brasil. **Bol. Tec. Cient. CEPENE**, v. 8, n. 1; p. 9-43, 2000.

JEBALI, J.; BEN-KHEDHER, S.; GHEDIRA, J.; KAMEL, N.; BOUSSETTA, H. Integrated assessment of biochemical responses in Mediterranean crab (*Carcinus maenas*) collected from Monastir Bay, Tunisia. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, p. 1714–1720, 2011.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Using biomarkers in fish to detect environmental contamination by Mercury (Hg). **Oecol Bras**, v. 12, p. 680-693, 2008.

JIMENEZ, B.; HERNANDEZ, L. M.; GONZALEZ, M. J. Congener Specific Analysis of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Crabs and Sediments from the Venice and Orbetello Lagoons, Italy. **Environ Sci Technol**, v. 32, p. 3853-3861, 1998.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, p. 207-221, 2008.

JOHNSTON, R. K.; MUNNS, W. R.; MUELLER, C.; NELSON, W. G.; PESCH, G. G. Marine ecological risk assessment pilot study for Allen Harbor, Narragansett Bay, Rhode Island, 1992.

KASSUGA, A. D.; MASUNARI, S. Distribuição espacial de juvenis de *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) no manguezal do Cabaraquara, Baía de Guaratuba, Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE CRUSTÁCEOS, 5., 2008. Resumos... Gramado, RS. p. 58-58.

KEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183–6188, 1976.

KOENIG, S.; SAVAGE, C. K. Non-destructive assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure by fluorimetric analysis of crab urine. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, p. 2003–2008, 2008.

KRAHN, M. M.; MYERS, M. S.; BURROWS, D. G.; MALINS, D. C. Determinação de metabólitos de xenobióticos na bÍlis de peixe de Águas poluídas. **Xenobiotica**, v. 14, n. 8, p. 633-646, 1994.

KRULL, M.; BARROS, F. Key Issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: A Critical Review. **J Braz Soc Ecotoxicol**, v. 7, p. 57-66, 2012.

LAWSON, S. L.; JONES, M. B.; MOATE, R. M. Effect of Copper on the Ultrastructure of the Gill Epithelium of *Carcinus maenas* (Decapoda: Brachyura). **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 63-72, 1995.

LEI, W.; WANG, L.; LIU, D.; XU, T.; LUO, J. Histopathological and biochemical alternations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. **Chemosphere**, v. 84, p. 689–694, 2011.

LEME, M. H. A. A comparative analysis of the population biology of the mangrove crab *Aratus pisonii* and *Sesarma rectum* (Brachyura, Grapsidae) from North coast of São Paulo State, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, p. 553-557, 2002.

LIMA, M. N. B.; MOCHEL, F. R.; CASTRO, A. C. L. Bioecologia do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda:Brachyura) na Área de Proteção Ambiental das Reentrâncias Maranhenses, Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 23, p. 01-10, 2010.

LIMA, G. V.; OSHIRO, L. M. Y. Maturidade sexual do caranguejo *Armases rubripes* (Rathbun) (Crustacea, Brachyura, Sesarmidae) da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1087-1086, 2006.

LEZCANO, A. H.; QUIROGA, M. L. R.; LIBEROFF, A. L.; VAN DER MOLEN, S. Marine pollution effects on the southern surf crab *Ovalipes trimaculatus*(Crustacea: Brachyura: Polybiidae) in Patagonia Argentina. **Marine Pollution Bulletin**, v. 91, p. 524–529, 2015.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, 1993.

LYSENKO, L.; KANTSEROVA, N.; KÄIVÄRÄINEN, E.; KRUPNOVA, M.; SHKLYAREVICH, G.; NEMOVA, N. Biochemical markers of pollutant responses in macrozoobenthos from the White Sea: Intracellular proteolysis. **Marine Environmental Research**, v. 96, p. 38-44, 2014.

MACFARLANE, G. R.; BOOTH, D. G.; BROWN, K. R. The Semaphore crab, *Heloecius cordiformis*: bio-indication potential for heavy metals in estuarine systems. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p. 153–166, 2000.

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** v. 72, p. 104–112, 2015.

MAJUMDER, S.; GHOSHAL, K.; SUMMERS, D.; BAI, S.; DATTA, J.; JACOB, S.T. Chromium(VI) Down-regulates heavy metal-induced metallothionein gene transcription by

modifying transactivation potential of the key transcription factor, metal-responsive transcription factor. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 278, p. 26216–26226, 2003.

MANN, R. M.; HYNE, R. V.; SPADARO, D. A.; SIMPSON, S. L. Development and application of a rapid amphipod reproduction test for sediment-quality assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 1244–1254, 2009.

MARTÍN-DÍAZ, M. L.; BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T. A. Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 66-76, 2007a.

MARTÍN-DÍAZ, M. L.; KALMAN, J.; RIBA, I.; REGUERA, D. F.; BLASCO, J.; DELVALLS, A. The use of a metallothionein-like-proteins (MTLP) kinetic approach for metal bioavailability monitoring in dredged material. **Environment International**, v. 33, p. 463–468, 2007b.

MARTÍN-DÍAZ, M. L.; SALES, D.; DELVALLS, T. A. Toxicokinetic approach for the assessment of endocrine disruption effects of contaminated dredged material using female *Carcinus maenas*. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 495-503, 2008a.

MARTÍN-DÍAZ, M. L.; BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T. A. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 631-640, 2008b.

MARTÍN-DÍAZ, M. L.; JIMÉNEZ-TENORIO, N.; SALES, D.; DELVALLS, T. A. Accumulation and histopathological damage in the clam *Ruditapes philippinarum* and the crab *Carcinus maenas* to assess sediment toxicity in Spanish ports. **Chemosphere**, v. 71, p. 1916–1927, 2008.

MARTÍN-DÍAZ, M. L.; BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T. A. The use of a kinetic biomarker approach for in situ monitoring of litoral sediments using the crab *Carcinus maenas*. **Marine Environmental Research**, v. 68, p. 82–88, 2009.

MAZON, A. F.; NOLAN, D. T.; LOCK, R. A. C.; FERNANDES, M. N.; BONGA, W. S. E. A short-term in vitro gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Toxicology In Vitro**, v. 18, p. 691–701, 2004.

MARSDEN, I. D.; RAINBOW, P. S. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology—the amphipod example? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 300, p. 373–408, 2004.

MARIA, V. L.; SANTOS, M. A.; BEBIANNO, M. J. Contaminant effects in shore crabs (*Carcinus maenas*) from Ria Formosa Lagoon. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 150, p. 196–208, 2009.

MELO, G.A.S. 1996. Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do Litoral Brasileiro. **Editora Plêiade/FAPESP**, São Paulo, SP, Brasil. 604 p.

MMA, 2009. Programa Nacional do Meio Ambiente II PNMA II - Fase 2 2009 – 2014. Componente desenvolvimento institucional, Subcomponente monitoramento ambiental. **Ministério do Meio Ambiente /Secretaria de Biodiversidade e Florestas**. Brasília.

MMA, 2012. Erosão e Progradação do Litoral Brasileiro – Maranhão. **Ministério do Meio Ambiente/ Projeto de Gestão Integrada dos Ambientes Costeiro e Marinho**. Brasília.

MORAES, E. E. B.; NUNESMAIA, B. J. B.; PINHEIRO, M. A. A. Population biology of the ‘uçá’-crab, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura: Ucididae), in mangroves of the Joanes River, Bahia State, Brazil. **Nauplius**, v. 23, n. 1, p. 59-71, 2015.

MOURA, N. F. O.; COELHO, P. A. Maturidade sexual fisiológica em *Goniopsis cruentata* (Latreille) (Crustacea, Brachyura, Grapsidae) no Estuário do Paripe, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 4, p. 1011-1015, 2004.

MOUREAUX, C.; SIMON, J. MANNAERTS, G.; CATARINO, A. I.; PERNET, P.; DUBOIS, P. Effects of field contamination by metals (Cd, Cu, Pb, Zn) on biometry and mechanics of echinoderm ossicles. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 698–707, 2011.

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy JF, Shugart LR (Eds.) **Biomarkers of Environmental Contamination**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3/16, 1990.

MILER, P. S.; LACY, R. C.; MEDINA-MIRANDA, R.; LÓPEZ-ORTIZ, R.; DÍAZ-SOLTERO, H. Confronting the invasive species crisis with metamodel analysis: An explicit, two-species demographic assessment of an endangered bird and its brood parasite in Puerto Rico. **Biological Conservation**, v. 196, p. 124–132, 2016.

MOREIRA, S. M.; MOREIRA-SANTOS, M.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, R. An in situ postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations. **Environmental Pollution**, v. 139, p. 318-329, 2006.

MORILLO, J.; USERO, J. Trace metal bioavailability in the waters of two different habitats in Spain: Huelva estuary and Algeciras Bay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 851–859, 2008.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Orgs). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. p.413-429.

NASROLAHI, A.; SMITH, B. D.; EHSANPOUR, M.; AFKHAMI, M.; RAINBOW, O. S. Biomonitoring of trace metal bioavailabilities to the barnacle *Amphibalanus amphitrite* along



the Iranian coast of the Persian Gulf. **Marine Environmental Research**, v. 101, p. 215- 224, 2014.

NEGRO, C. L. Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 87-94, 2015.

NEGRI, A.; LLEWELLYN, L. Comparative analyses by hplc and the sodium channel and saxiphilin 3h-saxitoxin receptor assays for paralytic shellfish toxins in crustaceans and molluscs from tropical north west Australia. **Toxicon**, v. 36, p. 283-298, 1997.

NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S.; DATTA, A. G. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relations with polyararomatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v. 52, p. 13-26, 2001.

NORENA-BARROSO, E.; SIMÁ-ÁLVAREZ, R.; GOLD-BOUCHOT, G. E; ZAPATA-PÉREZ, O. Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the the Estuary of Chetumal, Mexico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 263- 269, 2004.

NORDHAUS, I.; DIELE, K.; WOLFF, M. Litter processing and population food intake of the mangrove crab *Ucides cordatus* in a high intertidal forest in northern Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 67, p. 239–250, 2006.

NUDI, A. H.; WAGENER, A. L. R.; FRANCONI, E.; SCOFIELD, A. L.; SETTE, C. B.; VEIGA, A. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. **Environment International**, v. 33: 315–327, 2007.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the

Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 53-69, 2005.

OLMOS, F. R.; SILVA, S. Guar: Ambiente, flora e fauna dos manguezais de Santos Cubato – Brasil. So Paulo: **Empresa das artes**, 2003.

OLSZANSKA, A.; SOLARZ, W.; NAJBEREK, K. To kill or not to kill—Practitioners’ opinions on invasive alien species management as a step towards enhancing control of biological invasions. **Environmental Science & Policy**, v. 58, p. 107–116, 2016.

PAEZ-OSUNA, F.; BDJORQUEZ-LEYVA, H.; RUELAS-LNZUNZA, J. Regional variations of heavy metal concentrations in tissues of barnacles from the subtropical pacific coast of Mexico. **Environment International**, v. 25, p. 647-654, 1999.

PAIVA, M. P. Recursos pesqueiros estuarinos e marinhos do Brasil. Fortaleza: **Edioes UFC**, 1997.

PANDYA, P. J. Benthic Community Structure of Mahi River Estuary with Special Reference to Animal-sediment Relationship (Ph.D. thesis). **The Maharaja Sayajirao University of Baroda** (India), 2011.

PEREIRA, P.; PABLO, H.; SUBIDA, M. D.; VALE, C.; PACHECO, M. Biochemical responses of the shore crab (*Carcinus maenas*) in a eutrophic and metal-contaminated coastal system (O’bidos lagoon, Portugal). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1471–1480, 2008.

PECKMANN, J.; SENOWBARI-DARYAN, B.; BIRGEL, D.; GOEDERT, J. L. The crustacean ichnofossil *Palaxius* associated with allianassid body fossils in an Eocene methane-seep limestone, Humptulips Formation, Olympic Peninsula, **Washington**, 2007.

PINHEIRO, M. A. A.; HATTORI, G. Embryology of the mangrove crab *Ucides Cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). **Journal of Crustacean Biology**, V. 23, N. 3, P. 729-737, 2003.

PINHEIRO, M. A. A.; FISCARELLI, A. G.; HATTORI, G. Growth of the Mangrove Crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Journal of Crustacean Biology*, v. 25, n. 2, p. 293-301, 2005.

PINHEIRO, M. A. A.; FRANSOZO, A. Reproduction of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Brachyura: Portunidae) in the southern coast of Brazil. *Journal of Crustacean Biology*, v. 22, n. 2, p. 416-428, 2002.

PINHEIRO, M. A. A.; SILVA, P. P. G.; DUARTE, L. F. A.; ALMEIDA, A. A.; ZANOTTO, F. P. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, v. 81, p. 114–121, 2012.

PINHEIRO, M. A. A.; DUARTE, L. F. A.; TOLEDO, T. R.; ADAM, M. L.; TORRES, R. A. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. ***Environmental Monitoring and Assessment***, v. 185, n. 10, 2013.

PINHEIRO, M.A.A.; FISCARELLI, A.G. Manual de apoio à fiscalização do caranguejo-uçá. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) / Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira das Regiões Sudeste e Sul (CEPSUL) 1ª ed. Itajaí, 60 p. 2001.

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.

PHILLIPS, J. Applying a mathematical model of sustainability to the Rapid Impact Assessment Matrix evaluation of the coal mining tailings dumps in the Jiului Valley, Romania. Resources, ***Conservation and Recycling***, v. 63, p. 17– 25, 2012.

PHILLIPS, J. The application of a mathematical model of sustainability to the results of a semi-quantitative Environmental Impact Assessment of two iron ore opencast mines in Iran. **Applied Mathematical Modelling**, n. 37, p. 7839–7854, 2013.

PRIETO, M. A.; VÁZQUEZ, J. A.; MURADO, M. A. Mathematical modeling of area under the curve assessment criteria to quantify the antioxidant and pro-oxidant capacity: Coffee extracts as a case study. **Food Research International**, v. 64, p. 962–975, 2014.

RAINBOW, P. S.; FIALKOWSKI, W.; SMITH, B. D. The Sandhopper *Talitrus saltator* as a Trace Metal Biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, p. 193-200, 1998.

RAINBOW, P.S. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. **Environment International**, n. 33, p. 576–582, 2007.

RAINBOW, P. S.; BLACKMORE, G. Barnacles as biomonitors of trace metals availabilities in Hong Kong coastal waters: changes in space and time. **Marine Environmental Research**, v. 51, p. 441-463, 2001.

REBELO, M. F.; RODRIGUEZ, E. M.; SANTOS, E. A.; ANSALDO, M. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 125, p. 157–164, 2000.

REVATHI, P.; VASANTHI, A. L.; MUNUSWAMY, N. Effect of cadmium on the ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 74, p. 623–629, 2011.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva. **Roca**: São Paulo, 2005.

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.

SANTOS, M. C. F. Drinking and osmoregulation in the mangrove crab *Ucides cordatus* following exposure to benzene. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 29–42, 2002.

SANT'ANNA, B. S.; PINHEIRO, M. A. A.; MATAQUEIRO, M.; ZARA, F. J. Spermathecae of the mangrove crab *Ucides cordatus*: a histological and histochemical view. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 87, p. 903-911, 2007.

SANTOS, P. V. C. J.; ALMEIDA-FUNO, I. C. S.; PIGA, F. G. Perfil socioeconômico de pescadores do município da Raposa, estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 6, p. 1-14, 2011.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar, São Paulo: **Caribbean Ecological Research**, p.64, 2003.

SCHWAIGER, J.; WANDE, R.; ADM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathologic indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **J Aqu Eco St Rec**, v. 6, p. 75-86, 1997.

SCHRAMM, M.; BEHRENS, A.; BRAUNBECK, T.; ECKWERT, H.; KOHLER, H. R.; KONRADT, J.; MULLER, E.; PAWERT, M.; SCHWAIGER, J.; SEGNER, H.; TRIEBSKORN, R. Cellular, histological and biochemical biomarkers. In: Gerhardt, A. (Ed.), *Biomonitoring of Polluted Water*. **Lewis Publishers**, Boca Raton, pp. 33–63, 2000.

SEEBAUGHA, D. R.; L'AMOREAUXA, W. J.; WALLACE, W. G. Digestive toxicity in grass shrimp collected along an impact gradient. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 609– 617, 2011.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic Biol Med**, v. 27, p. 916–921, 1999.

SOUSA, D. B. P.; 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 **Lat Am J Aquat Res**, v. 41, p. 305-312, 2013.

SOUSA, D. B. P.; ALMEIDA, Z. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Biomarcadores em duas espécies de bagres estuarinos da costa maranhense. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 65, p. 369-376, 2014.

PINHEIRO-SOUSA, D. B. Um modelo preditivo baseado em biomarcadores em peixes aplicado a uma área protegida do Maranhão. **Mestrado (Dissertação)**. Universidade Estadual do Maranhão, 2015. 86p.

SOUZA-FILHO, P. W. M. Costa de manguezais de macromaré da Amazônia: cenários morfológicos, mapeamento e quantificação de áreas usando dados de sensores remotos. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 4, n. 23, p. 427-435, 2005.

SOUSA, J. K. C. Avaliação de impactos ambientais causados por metais-traço em água, sedimento e material biológico na Baía de São Marcos, São Luís – Maranhão. **Tese (Doutorado)** – UFPB/CCEN, 2009.

STENTIFORD, G. D.; FEIS, S. W. A histopathological survey of shore crab (*Carcinus maenas*) and brown shrimp (*Crangon crangon*) from six estuaries in the United Kingdom. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 136–146, 2005.

STANEK, K.; DROBNE, D.; TREBS, P. Linkage of biomarkers along levels of biological complexity in juvenile and adult diazinon fed terrestrial isopod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea). **Chemosphere**, v. 64, p. 1745–1752, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R. Hematological characteristics of Brazilian Teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo State, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, p. 109-115, 2003.

TAGLIARI, K. C.; CECCHINI, R.; ROCHA, J. A. V.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. **Mutation Research**, v. 561, p. 101–117, 2004

TAMSE, C. T.; GACUTAN, R. G.; TAMSE, A. F. Changes induced in the gills of Milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) fingerlings after acute exposure to Nifurprinol (Furanace; P-7138). **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v. 54, p. 591–596, 1995.

TAKEUCHI, I.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; MIYAZAKI, N. Butyltin concentrations along the Japanese coast from 1997 to 1999 monitored by *Caprella* spp. (Crustacea: Amphipoda). **Marine Environmental Research**, v. 57, p. 397–414, 2004.

TEKMAN, B.; OZDEMIR, H.; SENTURK, M.; CIFTCI, M. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 148, p. 117-121, 2008.

TOSTI, E.; GALLO, A. Best Biomarker and Bioindicator for Marine Environmental Pollution. **J Marine Sci Res Development**, v. 2, p. 101, 2012.

TORRES, H. S. Biomarcadores histopatologias em duas especies de bagres (Pisce, Ariidae) de importância econômica na Baía de São Marcos Maranhão. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

UNDAP, S. L.; MATSUNAGA, S.; HONDA, M.; SEKIGUCHI, T.; SUZUKI, N.; KHALIL, F.; QIU, X.; SHIMASAKI, Y.; ANDO, H.; SATO-OKOSHI, W.; SUNOBE, T.; TAKEDA, S.; MUNEHARA, H.; OSHIMA, Y. Accumulation of organotins in wharf roach (*Ligia*

*exotica* Roux) and its ability to serve as a biomonitoring species for coastal pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 96, p. 75–79, 2013.

VASANTHI, L. A.; REVATHI, P.; ARULVASU, C.; MUNUSWAMY, N. Biomarkers of metal toxicity and histology of *Perna viridis* from Ennore estuary, Chennai, South East Coast of India. **J. Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 84, p. 92–98, 2012.

VASANTHI, L. A.; MURUGANANDAM, A.; REVATHI, P.; BASKAR, P.; JAYAPRIYAN, K.; BABURAJENDRAN, R.; MUNUSWAMY, N. The application of histocytopathological biomarkers in the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) to assess heavy metal toxicity in Pulicat Lake, Chennai. **Marine Pollution Bulletin**, v. 81, p. 85–93, 2014.

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**, v. 54, p. 775–779, 2002.

VERSLYCKE, T.; GHEKIERE, A.; JANSSEN, C. R. Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 306, p. 245–267, 2004.

VICTOR, B.; NARAYANAN, M.; NELSON, D. J. Gills pathology and hemocyte response in mercury exposed *Macrobrachium idea* (Heller). **J Environ Biol**, v. 11, p. 61–65, 1990.

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

WANG, M.; WANG, G. Oxidative damage effects in the copepod *Tigriopus japonicus* Mori experimentally exposed to nickel. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 273–284, 1990.



WEIS, J. S.; BERGEY, L.; REICHMUTH, J.; CANDELMO, A. Living in a Contaminated Estuary: Behavioral Changes and Ecological Consequences for Five Species. **BioScience**, v. 61, n. 5, p. 375-385, 2011.

WUNDERLICH, A. C.; PINHEIRO, M. A. A.; RODRIGUES, A. M. T. Biologia do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) na Baía da Babitonga, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 25, n. 2, p. 188-198, 2008.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006. 478 p.

ZCE. 2003. *Zoneamento Costeiro do Estado do Maranhão*. FSADU/UFMA. São Luís, 254 p.

ZUCCHI, T. M. A. D.; POLI, P.; MELLO, M. A.; ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, F. D.; CASTRO, V. L. S. S. Biomarcadores: sentinelas ambientais. In: BINSFELD, P. C. (Org.). **Biossegurança em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. p. 171-181.