



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA**

**LUCAS GALLAT DE FIGUEIREDO**

**BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CRUSTÁCEOS  
DECÁPODOS DE DIFERENTES AMBIENTES DO ESTUÁRIO DA BAIJA DE  
MARAJÓ, PARÁ.**

**BELÉM - PA**

**2016**

LUCAS GALLAT DE FIGUEIREDO

**BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CRUSTÁCEOS  
DECÁPODOS DE DIFERENTES AMBIENTES DO ESTUÁRIO DA BAIÁ DE  
MARAJÓ, PARÁ.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientadora: Dra. Lílian Lund Amado

Co-Orientador: Dr. Cléverson Rannieri dos Santos

**BELÉM - PA**

**2016**

LUCAS GALLAT DE FIGUEIREDO

**BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CRUSTÁCEOS  
DECÁPODOS DE DIFERENTES AMBIENTES DO ESTUÁRIO DA BAIJA DE  
MARAJÓ, PARÁ.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

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

---

Dra. Lílian Lund Amado (Orientadora e Presidente da Banca) - UFPA

---

Dr. Cléverson Rannieri dos Santos (Co-Orientador) - MPEG

---

Dra. Rossineide Rocha (Membro titular) - UFPA

---

Dr. Marcelo Petracco (Membro titular) - UFPA

---

Dr. Marcelo de Oliveira Lima (Membro titular) - IEC

**BELÉM - PA**

**2016**

## EPIGRAFE

*"Não importa o quão estreito seja o portão e quão repleta de castigos seja a sentença, eu sou o dono do meu destino, eu sou o capitão da minha alma."*

Invictus, William Ernest Henley

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade da vida, por sempre estar presente em momentos de angústia e ajudando a encontrar a solução.

Aos meus pais, Margaret Rose Gallat de Figueiredo e Gilberto Batista Farias e minha madrinha, Hélia Bernadete Gallat de Figueiredo, que sempre estiveram presentes em esforço, suor e apoio para a minha realização pessoal e profissional, na minha formação como pessoa, nos ensinamentos de caráter e respeito para com meus próximos.

A todos os componentes do grupo de pesquisa Biomarcadores de Poluição Aquática da Amazônia - Biopaq. Em especial aos alunos Carla Miranda e Johnata Azevedo pelo imenso apoio prestado em todas as etapas de realização deste trabalho, coletas, análises, interpretação de dados e pela companhia nos muitos sábados de trabalho em laboratório.

Aos meus orientadores Lílían Lund Amado e Cléverson Rannieri Meira dos Santos, pela confiança depositada mesmo em momentos de extremas dificuldades.

A grande parceira que a vida me presenteou, Natasha Costa, que desde o meu início da carreira acadêmica esteve ao meu lado, como um alicerce, conselheira, companheira, amiga fiel e confidente. Nas horas de desentendimentos nunca me abandonou e nem deixou de me repreender nas horas necessárias, sendo crucial no meu desenvolvimento e crescimento como pessoa e profissional.

Às instituições de pesquisa Instituto Evandro Chagas, Museu Paraense Emílio Goeldi, EMBRAPA e Universidade Federal do Pará pelo suporte dado para a realização deste trabalho.

E a todos que fizeram parte com esforço e dedicação para o andamento e conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

EPIGRAFE .....	i
AGRADECIMENTOS .....	ii
SUMÁRIO .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	v
RESUMO GERAL .....	1
INTRODUÇÃO GERAL .....	2
OBJETIVOS .....	6
OBJETIVO GERAL .....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
REFERENCIAS .....	7
CAPÍTULO 1 .....	11
INTRODUÇÃO .....	14
MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
ÁREA DE ESTUDO .....	17
PLUVISIODADE .....	18
AMOSTRAGEM .....	18
Camarões .....	18
Caranguejos .....	18
Águas Superficiais .....	19
Sedimentos .....	19
ANÁLISES .....	19
Metais em Sedimentos .....	19
Osmolaridade da Hemolinfa e Águas Superficiais .....	20
Biomarcadores .....	20
Glutathiona-S-transferase (GST) .....	20
Capacidade antioxidante total (ACAP) .....	21
Lipoperoxidação (LPO) .....	21
ESTATÍSTICA .....	22
RESULTADOS .....	22
SAZONALIDADE .....	22
SALINIDADE .....	23

SEDIMENTOS .....	24
OSMOLARIDADE DA HEMOLINFA E ÁGUAS SUPERFICIAIS .....	26
BIOMARCADORES .....	26
LPO.....	31
ACAP .....	31
GST.....	32
DISCUSSÃO .....	33
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS .....	37

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sítios de amostragem na baía do Marajó. ....	17
<b>Figura 2.</b> Precipitação nos anos de 2014 e 2015(dados do INMET-PA, Estação 82191). .....	23
<b>Figura 3.</b> Salinidade nos quatro ambientes nos diferentes períodos analisados. ....	24
<b>Figura 4.</b> Análise de Componentes Principais (PCA) dos biomarcadores analisados nos tecidos do <i>M. amazonicum</i> . (A) <i>Score plot</i> para os dois primeiros componentes; (B) <i>Loading plot</i> para os dois primeiros componentes. ....	27
<b>Figura 5.</b> Análise de Componentes Principais (PCA) dos biomarcadores analisados nos tecidos muscular e branquial do <i>U. mordax</i> . (A) <i>Score plot</i> para os dois primeiros componentes e (B) <i>Loading plot</i> para os dois primeiros componentes. ....	29
<b>Figura 6.</b> Níveis de biomarcadores (LPO, ACAP e GST) nos biomonitores (Ma: <i>Macrobrachium amazonicum</i> e Um: <i>Uca mordax</i> ) por tecidos (Brq: Brânquias e Mus: Músculo). ....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Metais ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) em sedimentos de fundo. ....	25
<b>Tabela 2.</b> Osmolaridade ( $\text{mmol.kg}^{-1}$ ) da hemolinfa e da água. ....	26



## RESUMO GERAL

Os estuários estão em zonas de transição entre os ambientes de água doce e os oceanos são desafiadores para os organismos, principalmente por possuírem um gradiente de salinidade, que altera a biodisponibilidade dos poluentes e sua toxicidade. Assim, este trabalho teve por objetivo analisar o efeito de poluentes sobre os biomarcadores no camarão *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda) e no caranguejo *Uca mordax* (Crustacea, Decapoda). Foram realizadas quatro coletas, jul/14 (transição 1), nov/14 (estiagem), mar/15 (chuvoso) e jul/15 (transição 2), nos municípios de Abaetetuba (ambiente com menor nível de antropização), Barcarena (ambiente com elevados níveis de antropização), Belém (ambiente com elevados níveis de antropização) e Vigia (ambiente com menor nível de antropização). De ambos os animais foram retiradas as brânquias e porções do músculo para se testar os biomarcadores de exposição ACAP (Capacidade Antioxidante Total) e GST (Glutathione-s-transferase) e de efeito LPO (Liperoxidação). A PCA (Análise de Componentes Principais) realizada para os biomarcadores dosados no *Macrobrachium amazonicum* mostrou que a ACAP no músculo desse animal foi o que se destacou, agrupando os dados no mês de novembro de 2014, período seco. No mês de março de 2015, período chuvoso, os pontos de Vigia e Abaetetuba, mostraram que os níveis de ACAP nas brânquias foram os responsáveis pelo agrupamento desses dados. Quanto a PCA dos biomarcadores no *Uca mordax* todos os pontos referentes ao mês de julho de 2014 foram influenciados positivamente pela ACAP nas brânquias e LPO no músculo. O aumento da atividade GST nas brânquias e músculo, LPO nas brânquias e osmolaridade da hemolinfa foram os dados mais relevantes para o agrupamento de todos os pontos nos meses de novembro de 2014 e março de 2015. No mês de julho de 2015 a ACAP do músculo foi o fator responsável pelo agrupamento dos dados. A partir dos dados obtidos, foi possível observar que os biomarcadores foram fortemente influenciados pela sazonalidade da região e pelos ciclos endógenos aos animais, como a muda e reprodução. Estes ciclos alteram o metabolismo dos animais modificando seus investimentos energéticos causando alterações nos biomarcadores. Ainda pode-se concluir que o *Uca mordax* apresentou respostas mais contundentes nos biomarcadores avaliados em relação ao *Macrobrachium amazonicum*.

**Palavras-Chave:** Caranguejo chama-maré, Camarão amazônico, Glutathione, Liperoxidação, Capacidade Antioxidante, Osmolaridade.

## INTRODUÇÃO GERAL

Existem diversas fontes poluidoras do ecossistema aquático, resultando em diferentes tipos de impactos. As atividades mineradoras causam alterações nas variáveis físico-químicas da água, como o aumento da acidez e turbidez, além de liberar compostos ricos em metais/metaloídes com potencial tóxico, como arsênio e mercúrio (Ashton et al, 2001; Farias, 2002).

Atividades portuárias afetam os sistemas hídricos de várias formas, como a utilização de químicos nas embarcações para sua manutenção, como o óxido de cobre, para evitar ferrugem (Rosa, 2002) e compostos orgânicos, como anti-incrustantes, que previnem a colonização do casco dos navios por organismos aquáticos (Thomas *et al.*, 2003). Existe ainda a probabilidade de acontecer acidentes, podendo causar vazamento das mais variadas substâncias para os recursos hídricos. Destaca-se o recente ocorrido com o navio Haidar, de bandeira libanesa que afundou no Porto de Vila do Conde no município de Barcarena - PA, aproximadamente 700 mil litros de óleo e 4.900 cabeças de gado se perderam na água em outubro de 2015 (Ministério Público Federal - MPF, 2015). Existem também os poluentes orgânicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) que tem como fontes de origem a queima de combustíveis (óleo diesel e gasolina), queima de carvão além de processos industriais (Netto et al, 2000).

Muitos desses compostos químicos utilizados em atividades humanas, assim como os que são gerados de forma residual, são despejados diretamente para os ambientes aquáticos, quase sempre sem nenhum tipo de tratamento prévio (Corsi et al., 2003). No ambiente esses compostos podem ser considerados contaminantes, que podem afetar tanto os organismos residentes do corpo hídrico como o ser humano, via cadeia alimentar (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1999).

Os estuários são zonas de reprodução para muitas espécies, ambientes de estoque pesqueiro, e de importância econômica e ecológica (Mclusky & Elliott, 2005). Por ser uma zona de mistura de águas está sujeita a grandes alterações físico-químicas da água. Destaca-se a salinidade, com flutuações diárias formando um gradiente ao longo do curso do estuário, seus valores diminuem a medida que a água salgada se dilui na água doce dos rios, sendo um fator relevante na adaptação dos organismos que vivem neste ambiente altamente instável (Bianchini *et al.*, 2007). O estuário amazônico se localiza na região norte do país, é formado pelo rio Amazonas ao norte, e pelos rios Pará e Tocantins ao sul, constituindo a maior bacia hidrográfica do mundo. Sua dinâmica possui forte interferência do rio Amazonas e sofre alterações no decorrer do ano,

causadas pelo intenso regime de chuvas, que é característica da região norte brasileira (Barthem; Goulding, 1997).

Quando o ambiente aquático sofre um aporte de substâncias estranhas ao meio (xenobióticos), e entram em contato com os organismos residentes causam danos em componentes estruturais (Newman, 1998). Assim, a ampliação de estudos envolvendo análises em nível molecular e celular observando alterações, é possível se aproximar do entendimento de modificações em níveis maiores de organização biológica, como populações e comunidades, sendo respostas rápidas aos impactos em larga escala (Cajaraville *et al.*, 2000). Essas alterações nos menores níveis biológicos, molecular e celular são consideradas biomarcadores (Zanette *et al.*, 2015)

Os biomarcadores representam alterações nas funções do organismo fornecendo uma resposta biológica e indicando que o organismo está fora das suas condições normais. As alterações podem ser causadas pela presença de poluentes ou por modificações nos fatores físico-químicos de seu ambiente (Amorim 2003). Biomarcadores podem ser classificados em biomarcadores de exposição, que nos mostram respostas biológicas frente à um estressor ambiental, e biomarcadores de efeito, que demonstram alterações na estrutura e/ou funcionamento de macromoléculas interferindo no bem estar do organismo (Cajaraville *et al.*, 2000).

Os organismos aeróbicos obtiveram uma significativa vantagem energética com a utilização do oxigênio na respiração celular (Storey, 1996). No entanto, Burdon (1999) diz que neste processo o oxigênio pode ser parcialmente reduzido originando as espécies reativas de oxigênio (EROs), compostos tóxicos, que são:  $O_2^-$  (radical ânion superóxido);  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio) e  $OH\cdot$  (radical hidroxila). Existe uma produção natural de EROs pelos organismos, assim a necessidade de manter suas concentrações em níveis toleráveis, fez com que os organismos aeróbios desenvolvessem um Sistema de Defesa Antioxidante (SDA), que é formado por compostos enzimáticos e não enzimáticos (Storey, 1996).

Agentes antioxidantes são aqueles retardam ou impedem a ação de agentes oxidantes, que são moléculas com o potencial de oxidar outras moléculas como as EROs (Halliwell, 1997; Batista, 2010). Entre as moléculas antioxidantes enzimáticas podemos citar a glutathiona-S- transferase, glutathiona-peroxidase, glutamato-cisteína ligase, catalase, etc. Dentre as moléculas antioxidantes não enzimáticas temos como principal representante a glutathiona reduzida (GSH), além de carotenoides, ácido ascórbico, vitamina E, ácido úrico e outras (Storey, 1996). Alterações causadas pelos

xenobióticos podem levar o organismo ao estado de estresse oxidativo, caracterizado pela quebra da homeostase entre agentes oxidantes e antioxidantes e tem como consequências danos em biomoléculas essenciais como lipídeos, proteínas e DNA (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A produção das EROs pode ser intensificada não somente pela exposição dos organismos a compostos xenobióticos, mas também por alterações sazonais que causam flutuações nos fatores físico-químicos da água (temperatura, salinidade etc.), disponibilidade de alimento e outras atividades normais ao organismo, como reprodução e crescimento (Niyogi et al., 2001b; Regoli et al., 2002). Tomando como exemplo as constantes variações de salinidade, os organismos devem se adaptar às novas condições rapidamente, havendo realocação de energia que seria utilizada para detoxificação, alimentação, reprodução e ecdise para manutenção do equilíbrio osmótico (Monserrat *et al.*, 2007). Para tanto, organismos osmorreguladores investem energia na manutenção uma concentração diferenciada de íons entre o meio interno e o externo (Schmidt-Nielsen, 2002).

Diversos autores já observaram em seus estudos que a salinidade é um importante fator ambiental e organismos como crustáceos podem apresentar modificações no balanço oxidativo e alterações morfológicas em locais onde essa variável oscila constantemente (Cailleaud *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Batista, 2010; Paital & Chainy, 2010; Freire *et al.*, 2011a; Chong-Robles *et al.* 2014; Zanette *et al.*, 2015). As flutuações na salinidade ainda alteraram a biodisponibilidade de xenobióticos o que pode intensificar ou reduzir seu potencial tóxico (Freire *et al.*, 2011b).

Um dos pontos mais importantes em estudos envolvendo biomarcadores de poluição é a escolha dos organismos a serem utilizados como biomonitores. Que devem ter ampla distribuição, elevada abundância, estar presente nos ambientes com e sem históricos de contaminação, ser de fácil captura e possuir valor comercial (Newman, 1998).

Um grupo diverso (com aproximadamente 52.000 espécies descritas), em que muitos indivíduos possuem uma série das características citadas acima são os crustáceos, invertebrados que ocupam diversas partes do ambiente aquático, desde fossas abissais até poças de maré, variando de tamanhos microscópicos até indivíduos com metros de envergadura (Martin & Davis, 2001).

Em sua maioria, os crustáceos são de ambientes marinhos, mas possuem representantes adaptados à água doce. As espécies que vivem em águas com baixas

salinidades passaram por uma série de adaptações morfológicas, bioquímicas, comportamentais e ecológicas (Augusto, 2005). Estas características têm chamado a atenção de pesquisadores no uso destes organismos como biomonitores (Montserrat *et al.*, 2007; Paital & Chainy 2010; Freire *et al.*, 2011; Zanette *et al.*, 2015).

Os crustáceos da ordem Decapoda possuem importância por colonizarem diversos habitats, como os caranguejos braquiúros que ocupam regiões de poças de maré até ambientes semi-terrestres (Boschi, 2000a), e os camarões dendrobranchiata que ocupam desde zonas costeiras até ambientes estuarinos (D'incao, 1995). Sua distribuição pode depender de vários fatores ambientais e ser atribuída tanto a estabilidade de determinados ecossistemas como características de tipo de fundo, disponibilidade de alimento, variações de marés e nível do mar, composição da comunidade, relação presa-predador, interações inter-específicas, estratégias reprodutivas, salinidade e etc. (Boschi, 2000b).

Além de serem encontrados ao longo do litoral paraense e região costeira, os crustáceos decápodos ocorrem no estuário da Bacia de Marajó, desde áreas mais salinas próximas ao oceano, em marismas, manguezais, e outros tipos de vegetação marginal da região como as aningas até nos rios e igarapés afluentes. Há ainda de se salientar a ocorrência dos decápodos dulcícolas que estendem sua distribuição para o interior da bacia Amazônica como, por exemplo, *Macrobrachium amazonicum* que tem ampla ocorrência em lagos e rios da Amazônia Central e vivem em águas interiores e estuarinas (Chaves & Magalhães, 1993). Esta espécie também é o principal camarão de água doce explorado comercialmente nos Estados do Pará e Amapá, pela pesca artesanal (Odinetz-Collart, 1987) e também na aquicultura (Valenti, 1985).

Em termos de papel ecológico, as espécies de decápodos tem importância fundamental como elo entre níveis da cadeia trófica aquática e manutenção de ecossistemas. Muitos caranguejos, por exemplo, agem como bioperturbadores, consumidores de folhas e sedimentos, predadores de propágulos, além de presas para muitas espécies de peixes (Lee, 1998; Kristensen, 2008).

No ambiente estuarino da Bacia de Marajó, são encontrados alguns caranguejos considerados dulcícolas e outras 29 espécies mais correlacionadas a áreas de maior salinidade, dentre estas podemos encontrar espécies eurialinas que atingem regiões com águas tipicamente doce como *Uca mordax* (Diele *et al.*, 2010). Devido à alta sensibilidade de caranguejos do gênero *Uca* a diversos estresses ambientais, têm-se sugerido a sua utilização como indicadores de ambientes saudáveis (Barnwell, 1986).

O fato destes crustáceos terem hábito bentônico aumenta as chances de entrarem em contato com poluentes, já que os sedimentos são considerados sumidouros de uma série de contaminantes ambientais (Simpson *et al.*, 2005). Muitas substâncias possuem características hidrofóbicas e acabam se depositando no sedimento, como os HPA's (Jacques *et al.*, 2007) e compostos metálicos. Devido a processos de ressuspensão, podem retornar à coluna d'água ou ainda ligar-se a compostos orgânicos sendo assimilados pelos organismos e entrando na cadeia alimentar aquática através de crustáceos bentônicos (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1999).

O grupo dos crustáceos, devido suas características adaptativas, estratégias de forrageio, ecologia e metabolismo podem oferecer respostas interessantes, visto que, entram em contato direto com compartimentos importantes do ambiente aquático, como o sedimento e a coluna d'água. Outro ponto importante para ampliar os estudos envolvendo esses animais é o fato que alguns possuem valor comercial e podem por meio da cadeia alimentar atingir a população humana trazendo compostos tóxicos bioacumuláveis.

Neste contexto, o presente trabalho aborda a avaliação espaço-temporal do ambiente, em diferentes pontos na baía de Marajó, PA, através do uso de biomarcadores em dois crustáceos decápodes, no camarão *Macrobrachium amazonicum* e no caranguejo *Uca mordax*. Esses organismos selecionados como biomonitores neste estudo, para observar possíveis alterações bioquímicas, e caso existam, se estão conectadas com possíveis variações do habitat, sejam elas de causas naturais ou antrópicas.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a qualidade ambiental a partir do uso de biomarcadores bioquímicos de exposição e efeito em crustáceos (camarões e caranguejos) oriundos de diferentes ambientes salinos e dulceaquícolas da Baía de Marajó, Estuário Amazônico, Brasil.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Avaliar as respostas de biomarcadores de exposição e efeitos em camarões (*Macrobrachium amazonicum*) e caranguejos (*Uca mordax*) capturados em

ambientes de distintos níveis de antropização da baía do Marajó, Estuário Amazônico, Brasil;

- 2) Mostrar se diferentes condições sazonais regionais alteram os níveis de biomarcadores de exposição e efeito em camarões (*Macrobrachium amazonicum*) e caranguejos (*Uca mordax*) da baía do Marajó, Estuário Amazônico, Brasil
- 3) Avaliar as relações entre a disponibilidade de metais nos sedimentos de fundo e os níveis dos biomarcadores de exposição e efeito em camarões (*Macrobrachium amazonicum*) e caranguejos (*Uca mordax*) da baía do Marajó, Estuário Amazônico, Brasil .

## REFERENCIAS

- Amorim L. C. A. 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 6. 158 - 170.
- Ashton, P. J.; Love, D.; Mahachi, H.; Dirks, P. 2001. An overview of the impact of mining and mineral processing operations on water resources and water quality in Zambezi, Limpopo and Olifants catchments in the Southern Africa. Zimbabwe: University of Zimbabwe. 362p.
- Augusto, A. S. 2005. A invasão da água doce pelos crustáceos: o papel dos processos osmorregulatórios. Universidade de São Paulo, FFCLRP, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. 143 p.
- Barnwell, F. H. 1986. Fiddler crabs of Jamaica (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae, Genus *Uca*). *Crustaceana*, Leiden. 50. 146 - 165.
- Barthem, R.; Goulding, M. Os bagres balizadores: ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos. Sociedade ed. Brasília: [s.n.]. 140p.
- Batista. H. U. 2010. Osmorregulação e ativação do sistema antioxidante por alteração de salinidade nas espécies de caranguejos *Uca maracoani* (Latreille, 1802-1803), *Uca thayeri* (Rathbun, 1900) e *Uca mordax* (Smith, 1870). Dissertação (Mestrado em Zoologia), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 62p.
- Bianchini, A.; Lauer, M. M.; Nery, L. E. M.; Colares, E. P.; Monserrat, J. M.; Santos Filho, E. A. 2007. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151. 423-436.
- Boschi, E. E. 2000a. Biodiversity of marine Decapod Brachyurans of the Americas. *Journal of Crustacean Biology*. 20 (2). 337 - 342.
- Boschi, E. E. 2000b. Species of Decapod Crustaceans and their distribution in the American Marine Zoogeographic Provinces. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero*, 13. 7 - 136.
- Burdon, R. H. 1999. Genes and the environment. London, Taylor & Francis, Cailleaud, K.; Maillet, G.; Budzinski, H.; Souissi, S. & Forget-Leray, L. 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora*

- affinis* (Calanoida, Copepoda). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 147. 841 - 849.
- Cailleaud, K.; Maillet, G.; Budzinski, H.; Souissi, S. & Forget-Leray, L. 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). Comparative Biochemistry and Physiology. 147. 841 - 849.
- Cajaraville *et al.*, 2000 Cajaraville, M. P.; Bebianno, M. J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C. & Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Science of Total Environmental, 247:295-311.
- Chaves, P. T. & Magalhães, C. 1993. O desenvolvimento ovocitário em *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae), camarão dulcícola da região Amazônica. Acta Amazônica. 23(1). 17-23.
- Chong-Robles, J.; Charmantier, G.; Boulo, V.; Lizárraga-Valdéz, J.; EnríquezParedes, L. M.; Giffard-Mena, I. 2014. Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during postembryonic development. Aquaculture. 422. 261–267
- Corsi, I.; Mariottini, M.; Sensini, C.; Lancini, L. & Focardi, S. 2003. Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integratind biomarker responses and target pollutant concentrations. Oceanologica Acta, 26.129-138.
- Diele, K.; Koch, V.; Abrunhosa, F. A.; Lima, J. D. F. & Simith, D. J. B. 2010. The Brachyuran Crab Community of the Caete´ Estuary, North Brazil: Species Richness, Zonation and Abundance. In: Saint-Paull, Ulrich & Schneider, Horacio Mangrove Dynamics and Management in North Brazil, Berlin, Springer .251- 263.
- D'incao, F. 1995. Taxonomia, padrões distribucionais e ecológicos dos Dendrobranchiata (Crustacea: Decapoda) do Brasil e Atlântico Ocidental. Tese de doutoramento, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 365p.
- Farias, C. E. G. Mineração e o meio ambiente no Brasil. 2002. Disponível em: <[http://www.cgee.org.br/arquivos/estudo011\\_02.pdf](http://www.cgee.org.br/arquivos/estudo011_02.pdf)>. Acesso em: 15/01/2016.
- Freire, C. A.; Togni, V. G. & Hermes-Lima, M. 2011a. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. Comparative Biochemistry and Physiology. 160. 291 - 300.
- Freire, C. A.; Welker, A.; Storey, J. M. & Hermes-Lima, M. 2011b. Oxidative stress in estuarine and intertidal species. In: Abele, D.; Zenteno-Savin, T. & Vásquez-Medina, J. P. Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems, New York, WileyBlackwell, p.41 - 57
- Halliwell B.; Gutteridge J. M. C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York.
- Halliwell B. 1997. Antioxidants: The Basis – What they are and how to evaluate them. In: Sies H (ed) Antioxidants in diseases: Mecanismos and therapy. Academic Press, California.
- Jacques, R. J. S.; Bento, F. M.; Camargo, F. A. 2007 O. Biodegradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos. Ciência e Natura. 29. 7 - 24.
- Kristensen, E. 2008. Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. Journal of Sea Research. 59. 30 - 43.
- Lee, S. Y. 1998. Ecological role of grapsid crabs in mangrove ecosystems: a review. Marine Freshwater Resources. 49. 335 - 343.
- Liu, Y.; Wang, W.-N.; Wang, A.-L.; Wang, J.-M. & Sun, R.-Y. 2007. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus*



- vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. *Aquaculture*. 265. 351-358.
- Martin J. W. & Davis G. E. 2001. An Updated Classification of the Recent Crustacea. Natural History Museum of Los Angeles County Science Serial. 39. 1 - 124.
- Mclusk, D. & Elliott, M. 2005. The estuarine ecosystem. Ecology, threats and management. Oxford, Oxford University Press. 214p.
- Ministério Público Federal - MPF. 2015. Disponível em: <[http://www.prpa.mpf.mp.br/news/2015/arquivos/Acao\\_cautelar\\_naufragio\\_Haidar\\_carregamento\\_bois\\_Barcarena.pdf](http://www.prpa.mpf.mp.br/news/2015/arquivos/Acao_cautelar_naufragio_Haidar_carregamento_bois_Barcarena.pdf)>. Acesso em 12/02/16.
- Monserrat, J. M.; Martínez, P. E.; Geracitano, L. A.; Amado, L. L.; Martins, C. M. G.; Pinho, G. L. L.; Chaves, I. S.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-Lima, J. & Bianchini, A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146. 221 - 234.
- Netto, A. D. P.; Moreira J. C.; Dias, A. E. X. O.; Arbilla, G.; Ferreira L. F. V.; Oliveira, A. S.; Barek, J. 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) e seus derivados nitrados (nhpas): uma revisão metodológica. *Química nova*. 23(6). 765 - 773.
- Newman, M. C. 1998. *Fundamentals of ecotoxicology*. Chelsea, USA, Ann Arbor Press, 402p.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G., 2001b. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Marine Environmental. Research*. 52. 13 - 26.
- Odinetz-Collart, O. 1987. La pêche crevettière de *Macrobrachium amazonicum* (Palaemonidae) dans le Bas-Tocantins, après lafermeture du barrage de Tucuruí (Brésil). *Revista Hydrobiologia Tropical*. 20(2). 134 - 144.
- Paital, B. & Chainy, G. B. N. 2010. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 151. 142 - 151.
- Regoli, F.; Nigro, M.; Chiantore, M.; Winston, G. W. 2002. Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Science Total Environmental*. 289. 205 - 211.
- Rodriguez-Ariza, A.; Alhama, J.; Díaz-Méndez, F. M. & López-Barea, J. 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. ***Mutation Research*, 438:97-107.**
- Rosa, M. L. Concentrações de metais pesados na biota e sedimentos do estuário da Lagoa dos Patos. 2002. Dissertação de Mestrado em Engenharia Oceânica - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 244p.
- Schmidt-Nielsen K. 2002. *Fisiologia animal – Adaptações e Meio Ambiente*. Editora e Livraria Santos, São Paulo.
- Simpson, S. L.; Batley, G. E.; Chariton, A. A.; Stauber, J. L.; King, C. K.; Chapman, J. C.; Hyne, R.V .; Gale, S. A.; Roach, A. C.; Maher, W. A. 2005) *Handbook for sediment quality assessment*, CSIRO – Centre for environmental contaminants research, Bangor: N. S. W. 117p.
- Storey, K. B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian. Journal of Medical and Biological Research*. 29. 1715 - 1733.
- Thomas, K. V.; McHugh, M.; Hilton, M.; Waldock. M. 2003. Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. *Environmental Pollution*. 123. 153 – 161.
- Valenti, W. C. 1985. *Cultivo de camarão de água doce*. São Paulo. Nobel. 82p.

Zanette, J.; Monserrat, J. M.; Bianchini, A. 2015. Biochemical biomarkers in barnacles *Balanus improvisus*: Pollution and seasonal effects. *Marine Environmental Research*. 103. 74-79.

## **CAPÍTULO 1**

**BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CRUSTÁCEOS  
DECÁPODOS DE DIFERENTES AMBIENTES DO ESTUÁRIO DA BAIÁ DE  
MARAJÓ, PARÁ.**

Lucas Gallat de Figueiredo<sup>a</sup>; Cléverson Rannieri Meira dos Santos<sup>b</sup>; LÍlian Lund  
Amado<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca

<sup>b</sup> Museu Paraense EmÍlio Goeldi, Coordenação de Zoologia

Correspondência deve ser enviada a Lucas Gallat de Figueiredo,  
[lucasgallat@hotmail.com](mailto:lucasgallat@hotmail.com)

**Resumo**

Com o intuito de analisar o efeito de poluentes sobre os biomarcadores do camarão *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda) e no caranguejo *Uca mordax* (Crustacea, Decapoda) foram realizadas amostragens nos meses de jul/14 (transição 1), nov/14 (estiagem), mar/15 (chuvoso) e jul/15 (transição 2), nos municípios de Abaetetuba, Barcarena, Belém e Vigia. Foram retiradas as brânquias e porções do músculo para testar os biomarcadores de exposição ACAP (Capacidade Antioxidante Total) e GST (Glutathione-s-transferase) e efeito LPO (Lipoperoxidação). Os biomarcadores do *Macrobrachium amazonicum* indicaram que a ACAP no músculo se destacou no mês de novembro de 2014 agrupando os dados desse período. No mês de março de 2015, período chuvoso, os pontos de Vigia e Abaetetuba, mostraram boa correlação com os níveis de ACAP nas brânquias. Quanto aos biomarcadores do *Uca mordax* todos os pontos referentes ao mês de julho de 2014 foram influenciados positivamente pela ACAP nas brânquias e LPO no músculo. O aumento da atividade GST nas brânquias e músculo, LPO nas brânquias e osmolaridade da hemolinfa foram mais importantes para todos os pontos dos meses de novembro de 2014 e março de 2015 agrupando esses dados. Para o mês de julho de 2015 todos os pontos foram influenciados pela ACAP do músculo. Os resultados dos biomarcadores foram influenciados pela sazonalidade da região e pelos ciclos endógenos aos animais, como a muda e reprodução. Estes ciclos alteram o metabolismo dos animais causando

alterações nos biomarcadores. Ainda pode-se concluir que o *Uca mordax* apresentou respostas mais contundentes nos biomarcadores avaliados em relação ao *Macrobrachium amazonicum*.

**Palavras-Chave:** Caranguejo chama-maré, Camarão amazônico, Glutathione, Lipoperoxidação, Capacidade Antioxidante.

## INTRODUÇÃO

Os estuários são relevantes aos ecossistemas aquáticos, pois são zonas de mistura entre águas continentais e costeiras. Nestes, as características físico-químicas das águas se alteram em curtos períodos (Mclusky & Elliott, 2005). No encontro das águas salinas oceânicas com águas doces dos rios, são formados gradientes de salinidade ao longo destes corpos hídricos. Esses ambientes são locais propícios ao desenvolvimento de inúmeros organismos aquáticos e reprodução de espécies com valor econômico (Mclusky & Elliott, 2005).

O estuário amazônico é formado pelo rio Amazonas, ao norte, e pelos rios Pará e Tocantins ao sul (Barthem; Goulding, 1997). Esse é composto por águas brancas e alcalinas com elevados níveis de material particulado disperso na coluna d'água (Gregório; Mendes, 2009). Neste, forma-se a baía do Marajó a partir do encontro dos rios Pará e Tocantins nas proximidades da cidade de Abaetetuba. Logo à jusante de Abaetetuba estão localizadas cidades economicamente importantes como Barcarena, Belém e municípios históricos para o estado, como o de Vigia.

Estas cidades possuem precárias condições de infraestrutura e serviços urbanos bem como o despejo inadequado de lixo sobre o solo que resulta na formação de lixões a céu aberto, fatores que resultam no lançamento de esgotos e chorume nas águas superficiais de toda região. Esta situação se agrava em Barcarena, com registros de lançamentos de efluentes domésticos e industriais não tratados a partir da área portuária e industrial do distrito de Vila do Conde, e Belém, uma metrópole densamente habitada e crescimento desordenado cujo lançamento de efluentes transforma seus rios em valões a céu aberto.

Portanto, a baía do Marajó é o destino final de diversos tipos de efluentes lançados a partir destas cidades localizadas as suas margens (Corsi et al., 2003). Estudos mostram que estes efluentes, usualmente, contêm compostos xenobióticos, substâncias que podem alterar os níveis de organização biológica, incluindo desde moléculas até estruturas populacionais (Newman, 1998), como ocorrido na Lagoa dos Patos, Amado et al. (2006) observou danos no DNA do peixe *Paralichthys orbignyanus* causados pelas altas concentrações de xenobióticos, Martinez-Diaz et al. (2007) afirma um início de poluição afetando fêmeas da espécie de caranguejo *Carcinus maenas* e na concha *Ruditapes philippinarum* na Península Ibérica, (Espanha), Pereira et al. (2009) observou

em seu estudo com o *C. maenas* na Lagoa Óbidos em Portugal um sinergismo de fontes poluidoras influenciando nos biomarcadores da população desse caranguejo.

Nos organismos aquáticos, os xenobióticos podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e até causar o estresse oxidativo quando em grande quantidade. Assim, o estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio na concentração de moléculas pró-oxidantes e antioxidantes no meio intracelular, situação que tem o potencial de ocasionar danos em moléculas importantes, como proteínas, lipídeos e DNA (Halliwell e Gutteridge 1999).

A produção de EROs causada pela exposição a xenobióticos pode levar a alterações nas atividades bioquímicas e celulares dos animais, levando a produção ou inibição de substâncias que podem ser usadas como biomarcadores (Zanatte et al., 2015). Muito embora os contaminantes sejam as principais causas do aumento de EROs, há registros de alterações nos níveis de biomarcadores associados a flutuações sazonais de salinidade e temperatura, hábito alimentar e ciclos endógenos aos organismos, como reprodução e crescimento (Niyogi et al., 2001b; Regoli et al., 2002).

Neste contexto, existem enzimas para defender o organismo contra as EROs como a Glutathione-S-transferase (GST) que, por biotransformação, retira xenobióticos de dentro da célula evitando o aumento da produção endógena de EROs. Ainda existem técnicas que medem as defesas contra EROs como a Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP), ensaio desenvolvido por Amado et al. (2009) que estima as defesas antioxidantes totais. As EROs podem oxidar moléculas lipídicas, o que contribui para perdas de funções celulares, caracterizando o estado de estresse oxidativo (Zanatte et al., 2015) e a peroxidação lipídica (LPO) vem sendo utilizado como biomarcador (Hermes - Lima et al., 1995; Hermes - Lima, 2004).

A quantificação de biomarcadores no meio biótico para avaliar o estresse frente a contaminantes ambientais são métodos que vem sendo aplicados em tecidos de organismos biomonitores. Os biomonitores, normalmente, são caracterizados por serem abundantes, de ampla distribuição, baixa mobilidade e de fácil captura, e podem ser usados para avaliação de exposição a substâncias tóxicas nos ecossistemas aquáticos e terrestres (Newman, 1998; Amado et al., 2009; Zanatte et al., 2015).

Nos ecossistemas aquáticos, os crustáceos são cada vez mais utilizados para avaliar o estresse oxidativo a partir de dosagens de GST, LPO e o método TOSC, (Capacidade total de eliminação de oxiradicais), análogo ao ACAP, como nos trabalhos de Pereira et al. (2009) com o caranguejo *Carcinus maenas*, Dorts et al. (2009) com o

camarão *Penaeus monodon*, Zanette et al. (2015) com a craca *Balanus improvisus* e Souza et al. (2014) com o camarão *Litopenaeus vannamei*.

Os camarões (*Macrobrachium amazonicum*) são encontrados em ambientes distintos na Amazônia (Porto, 2004; Pileggi & Mantelatto, 2010; Vergamini et al., 2011). Estes habitam tanto rios estuarinos de águas doces ou salobras (Odinetz-Collart & Rabelo, 1996) quanto lagos e rios na Amazônia Central (Mello 20013). Entre suas principais características, podemos citar que esses animais se reproduzem o ano inteiro (Bialezki et al., 1997; Sampaio et al., 2007) e suas maiores taxas reprodutivas ocorrem nos períodos de maior intensidade pluviométrica (Odinetz-Collart, 1993; Silva et al., 2002; Silva et al., 2005; Bentes et al., 2011), fato que pode estar relacionado com o aumento da disponibilidade de alimento nesse período, já que acontece o aumento na densidade do zooplâncton (Costa et al., 2016 b).

Caranguejos do gênero *Uca*, como o *U. mordax*, são onívoros e se alimentam de algas, protozoários e matéria orgânica (Crane 1975). Nas zonas tropicais se reproduzem o ano todo, porém as atividades reprodutivas aumentam nos períodos mais chuvosos (Adamczewska et al. 2000). São animais diurnos com maior mobilidade nos períodos entre marés e cavam tocas nos sedimentos, normalmente lamosos, fazendo a bioperturbação do solo e promovendo a ciclagem de nutrientes e energia do ambiente onde estão inseridos (Crane 1975). Estes animais podem ser encontrados desde o Golfo do México até o sul do Brasil e, uma característica importante, é o fato de habitarem regiões mais próximas a foz de rios. Nestas zonas a água do mar já está mais diluída e ocorre redução da salinidade (Melo, 1996; Masunari 2006.),

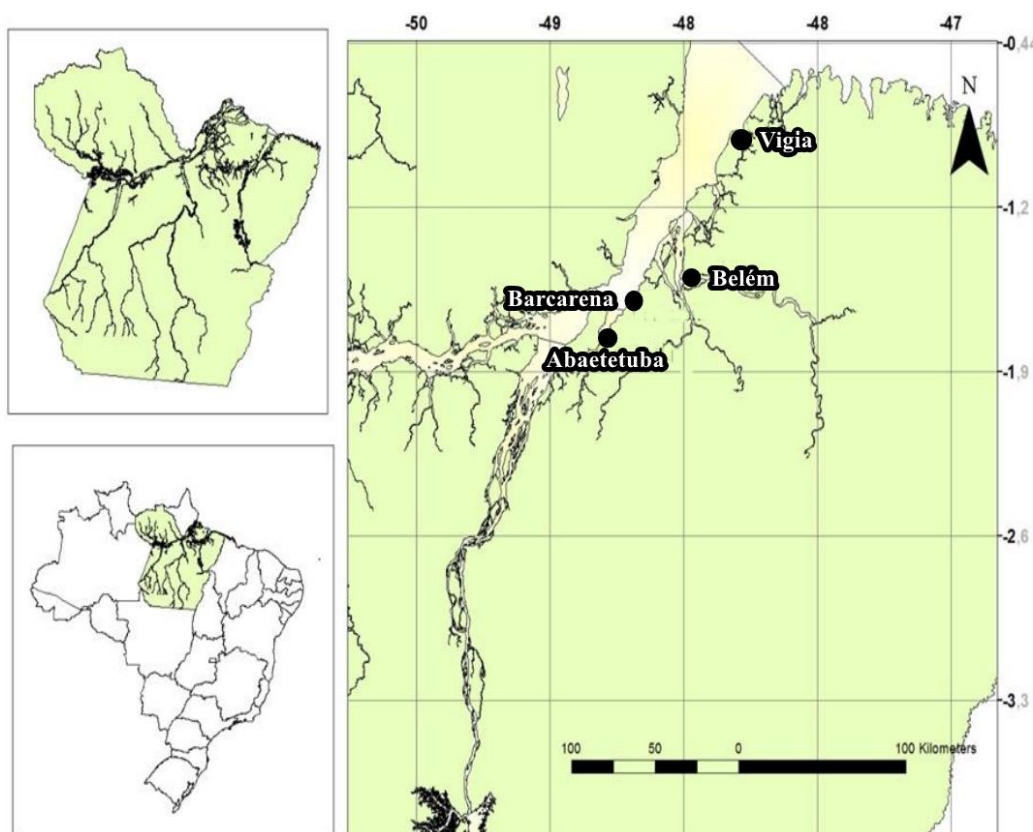
Desta forma, pode ser observado que tanto os camarões (*Macrobrachium amazonicum*) quanto os caranguejos (*Uca. mordax*) possuem ampla distribuição e sujeitos a exposição a vários contaminantes. Nestes, possíveis alterações a nível molecular poderão significar respostas às modificações no meio, caracterizando estes animais como potenciais biomonitoradores (Cajaraville et al., 2000). Assim, quantificar os níveis de GST, ACAP e LPO em nestas espécies de crustáceos decápodes em áreas da baía do Marajó são informações importantes para avaliar as respostas desses biomonitoradores frente a diferentes condições ambientais desta área estuarina.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDO

Para avaliar diferentes efeitos sobre os animais, foram selecionados rios com diferentes níveis de antropização nas cidades de Abaetetuba, Barcarena, Belém e Vigia. Em Abaetetuba, local mais distante do oceano, as amostragens ocorreram no rio Campumpema, corpo hídrico que apresenta suas características naturais bem preservadas. Na sequência foi selecionado o rio Dendê, localizado em Barcarena dentro da área portuária e industrial de Vila do Conde, onde as características naturais foram bastante modificadas e há registros de impactos ambientais a partir do lançamento de efluentes ácidos do processo de beneficiamento de caulim diretamente no leito do rio. Na cidade de Belém os estudos foram no rio Aurá que recebe tanto o lançamento de esgotos sanitários não tratados quanto de chumbo do lixão do Aurá. Em Vigia, área mais próxima do oceano, as amostragens foram feitas no rio Açaí, drenagem que mantém suas características naturais bem preservadas (Figura 1).



**Figura 1.** Sítios de amostragem na baía do Marajó.

## PLUVISIODADE

Para avaliar os efeitos da sazonalidade, dados da pluviosidade mensal, referentes aos anos de 2014 e 2015, foram obtidos junto ao Instituto de Meteorologia do Pará (INMET-PA).

## AMOSTRAGEM

Nos rios selecionados foram realizadas quatro amostragens sazonais nos meses de julho (transição) e novembro (seca) de 2014, março (chuvoso) e julho (transição) de 2015. Nestes foram capturados camarões e caranguejos e coletadas amostras de águas superficiais e sedimentos de fundo, conforme descrito a seguir.

### **Camarões**

Espécimes de camarões (*Macrobrachium amazonicum*) foram capturados com auxílio de armadilhas regionais denominadas "matapi" e uso de iscas de coco de babaçu. As armadilhas foram instaladas durante a maré baixa e removidas após 12 horas na maré baixa seguinte. Como critério de exclusão, as fêmeas ovígeras quando capturadas eram imediatamente devolvidas ao ambiente. Os animais capturados foram imediatamente crio-anestesiados para diminuir interferências nos resultados associados ao estresse nas etapas de captura.

No mesmo dia da captura, para todos os espécimes de camarão foram medidos o peso (g), comprimento total (cm) e comprimento do cefalotórax, excluindo o rostro (cm). Para padronização foram selecionados apenas camarões com maturidade sexual, ou seja, acima de 5,5 cm de comprimento total (Bentes, 2011). Os animais foram dissecados e destes foram separados porções do tecido branquial e muscular e esse material foi congelado e armazenado em - 80 °C até o momento das análises.

### **Caranguejos**

Espécimes de caranguejos (*Uca mordax*) foram manualmente capturados. Como critério de inclusão, para este estudo foram selecionados apenas os machos, que foram crio-anestesiados diminuir o estresse do animal durante a etapa de captura. Para os estudos de osmolaridade da hemolinfa, os animais foram capturados separadamente e retirado cerca de 1 mL de amostra do fluído a partir de um conjunto de 5 animais para cada ponto de coleta, foram coletados 10 réplicas em todos os pontos amostrados.

No mesmo dia da captura dos espécimes de caranguejos, foram medidos o peso (g), comprimento (cm) e altura da carapaça (cm). Para padronização foram selecionados apenas caranguejos na maturidade sexual, com largura da carapaça maior que 1,1 cm (Masunari & Dissenha, 2005; Fransozo et al., 2009). Os organismos passaram por uma etapa de dissecação, onde porções do tecido branquial e muscular foram retiradas, os tecidos foram congelados e armazenados em -80 °C até o momento das dosagens dos biomarcadores.

### **Águas Superficiais**

Para análises de osmolaridade, em frascos de polipropileno de 50 mL foram coletadas amostras de águas superficiais durante a maré baixa. Todas as amostras foram coletadas em contra fluxo a uma profundidade de aproximadamente 30 cm em relação a coluna d'água. Complementarmente, os dados de salinidade foram obtidos *in situ* a partir do uso de refratômetro manual.

### **Sedimentos**

Para amostragens de sedimentos de fundo foram usados coletores em aço inoxidável do tipo draga. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos até o momento das etapas de tratamento físico e químico. Para cada ponto de coleta foram coletadas 5 réplicas.

## **ANÁLISES**

### **Metais em Sedimentos**

As amostras de sedimento foram secadas em estufa (50°), maceradas e separadas granulometricamente em peneiras de aço-inox com 53 µm (>240 mesh). O sedimento fino foi pesado (0,2 g) e submetidos a abertura ácida em micro-ondas (Anton Paar) por três etapas a 250°, 1) 3 mL HNO<sub>3</sub> (SIGMA - ALDRICH, 65%) + 1 mL HCl (J. T. BAKER, 38%), 30 minutos, 2) 1 mL HF (SIGMA - ALDRICH, 40%) , 30 minutos, 3) 2 mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, solução supersaturada, (MERK) PA), 30 minutos. A solução resultante foi aferida para 25 ml com água ultra pura (Milli Q, Millipore). As análises foram realizadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, Varian, VISTA-MPX). Por problemas logísticos não foi realizada a coleta de sedimentos em julho de 2014.

## Osmolaridade da Hemolinfa e Águas Superficiais

As análises de osmolirdade na hemolinfa e nas águas superficiais foram realizadas em micro-osmômetro VAPRO-5520 VESCOR (Vapor Pressure Osmometer) utilizando uma alíquota de 10 µL de amostra para cada leitura.

## Biomarcadores

Para extração do conteúdo intracelular, foram pesados 0,250 g de cada tecido e quando necessário foram feitos *pools* gênicos para atingir esta massa. No caso dos camarões, o preparo de *pools* gênicos seguiu o critério de 3 indivíduos para brânquias e 1 para músculo. Para os caranguejos, o critério foi de 9 indivíduos para brânquias e 2 indivíduos para músculo. Na sequencia, para cada amostra foram acrescentados 1 mL de solução tampão, contendo Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (5 mM) e pH 8,0 (White et al., 2003). As amostras foram então processadas em agitador mecânico, tipo Potter, e centrifugadas à 20.000 rpm a 4 °C por 20 min. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado em alíquotas de 200 µL para as análises da atividade da Glutathiona-S-transferase (GST) e da Capacidade antioxidante total (ACAP). Para a análise de peroxidação lipídica (LPO) as amostras foram pesadas (0,100 g) processadas em agitador mecânico em metanol 100% (resfriado), centrifugadas (1000xg, 4°C, 10 min) e o sobrenadante foi utilizado para determinação da lipoperoxidação.

### Glutathiona-S-transferase (GST)

Os níveis de GST foram quantificados segundo o método proposto por Habig et al. (1974). Neste, é avaliada a conjugação de 1 mM de glutathiona (GSH; Sigma) com 1 mM do reagente 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB, Sigma). O processo é catalisado pela GST em meio de reação de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,00. A atividade da GST é expressa em U<sub>GST</sub>/mg de proteína, onde uma unidade (U) é a quantidade de enzima necessária para conjugar 1 µmol de CDNB/min/mg de proteína, à 25 °C e pH 7. O coeficiente de extinção molar (ε) utilizado para a formação do conjugado CDNB-GSH foi 9,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. A placa de análise foi montada a partir da adição de 5 a 20 µL do extrato de tecido, 220 a 235 µL do meio de reação (80 µL de CDNB + 3,8 mL de tampão fosfato) e 10 µL de GSH.

As dosagens de atividades enzimáticas foram normatizadas pela quantidade total de proteínas presentes nos extratos. A medida de proteínas totais foi efetuada com kit comercial Doles. Para tanto, foi adicionado 15 µL de extrato de tecido, 700 µL de reagente de cor (Biureto) e uma gota de NaOH (6 M) em um microtubo e dividido em duas alíquotas já na placa de reação. As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (Victor X3, Perkin Elmer) na faixa de 550 nm. Os resultados foram relativizados com a absorvância de uma quantidade conhecida de proteínas.

#### Capacidade antioxidante total (ACAP)

Os níveis de ACAP foram analisados a partir da determinação da concentração de espécies ativas de oxigênio (EAO) nas amostras com e sem exposição a um gerador de radicais peroxil. Os radicais peroxil foram produzidos por decomposição termal (35°) de 2'2'-azobis-2-metilpropilamida dihidroclorato (ABAP, 4 mM; Aldrich) (Winston et al., 1998). As leituras foram realizadas em leitora de microplaca de fluorescência (Victor X3, Perkin Elmer), em um meio contendo 30 mM de HEPES (pH 7,2), 200 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 µM H<sub>2</sub>DCF-DA. A geração de fluorescência total (lida em 485 nm e 530 nm para excitação e emissão respectivamente) é calculada pela integração da unidade de fluorescência (UF) durante o período de leitura, após ajustar os dados da UF para uma função polinomial de segunda ordem. A diferença relativa entre as áreas com e sem ABAP foram consideradas como medida da capacidade antioxidante total, onde a maior área significa uma menor capacidade antioxidante, uma vez que uma alta fluorescência foi obtida após adição de ABAP, indicando baixa competência para neutralizar radicais peroxil (Amado et al., 2009). A capacidade antioxidante total é expressa pelo inverso da área relativa. Assim, na placa de análise foram adicionados 127,5 µL do meio de reação, 10 µL do extrato de tecido, 7,5 µL de ABAP (7,5 µL de água ultra pura na leitura de branco) e 10 µL de H<sub>2</sub>DCF-DA.

#### Lipoperoxidação (LPO)

O conteúdo de lipídeos peroxidados foi determinado segundo o método FOX, descrito por Hermes-Lima et al. (1995) e adaptado por Monserrat et al. (2003). A peroxidação lipídica foi determinada usando FeSO<sub>4</sub> (0.25 mM), preparado no momento da análise, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25 mM) e laranja de xilenol (1 mM), o aumento na absorvância foi registrado a 550 nm em leitor de microplaca, após o tempo de incubação específico para cada tecido. Os resultados foram comparados ao hidroperóxido cumeno (CHP),

que é adicionado às amostras após o período de incubação, e expressos em nmol CHP/g tecido úmido. A placa de análise foi feita a partir de 90 µL de FeSO<sub>4</sub>, 35 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 35 µL de laranja de xylenol, 170 µL de água ultra pura, 20 µL de extrato de tecido e 10 µL de CHP.

## ESTATÍSTICA

Para a observação da distribuição dos dados de biomarcador para cada animal e concentrações de metal no sedimento nos diferentes períodos sazonais para os quatro pontos analisados, foi realizada a análise Componentes Principais (PCA) (Legendre & Legendre, 2012) no programa Minitab 16 (Minitab Inc., USA). Ainda foi feita uma análise de Correlação de Pearson entre os resultados de metais no sedimento e biomarcadores, a fim de se observar possíveis alterações nos biomarcadores causadas pelas concentrações dos metais analisados nesse compartimento, utilizando-se o mesmo programa.

Para testar as diferenças significativas entre os locais e entre os períodos amostrados realizou-se a Análise de variância (ANOVA) seguido do teste *a posteriori* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

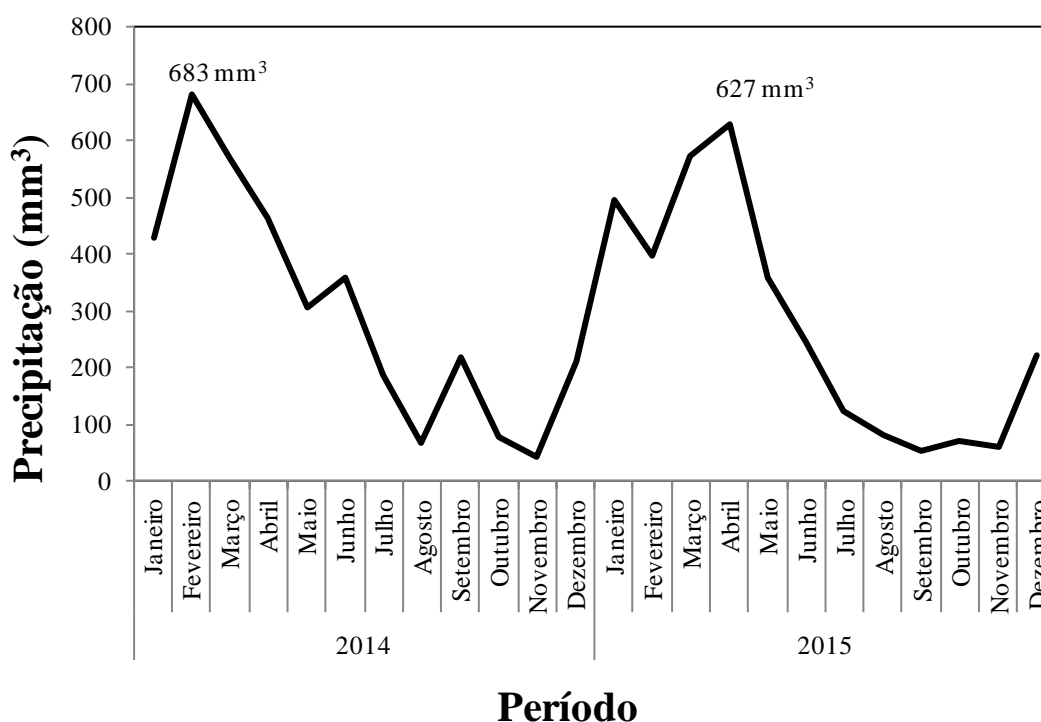
## RESULTADOS

### SAZONALIDADE

A figura 2 mostra que no ano de 2014 a máxima e mínima precipitação média mensal ocorreu, respectivamente, nos meses de fevereiro (683 mm<sup>3</sup>) e novembro (41 mm<sup>3</sup>), enquanto em 2015 a máxima e mínima foram em abril (627 mm<sup>3</sup>) e setembro (53 mm<sup>3</sup>). Estes dados mostram níveis máximos e mínimos numericamente semelhantes em ambos os anos e também evidenciam diferentes ciclos sazonais entre os mesmos. Os períodos entre o máximo e mínimo duram 8 meses e 5 meses em 2014 e 2015, respectivamente. Isto mostra que em 2014 as chuvas atingem seu ápice mais cedo e seu mínimo mais tarde quando comparado com 2015, dificultando amostragens sazonais em períodos uniformes.

Quanto aos meses de amostragem, os meses de julho de 2014 (188 mm<sup>3</sup>) e julho de 2015 (125 mm<sup>3</sup>) foram caracterizados como períodos de transição (chuvoso-seco) enquanto os meses de novembro de 2014 (41 mm<sup>3</sup>) e março de 2015 (571 mm<sup>3</sup>) foram identificados como seco e chuvoso, respectivamente. Esses dados mostram que o

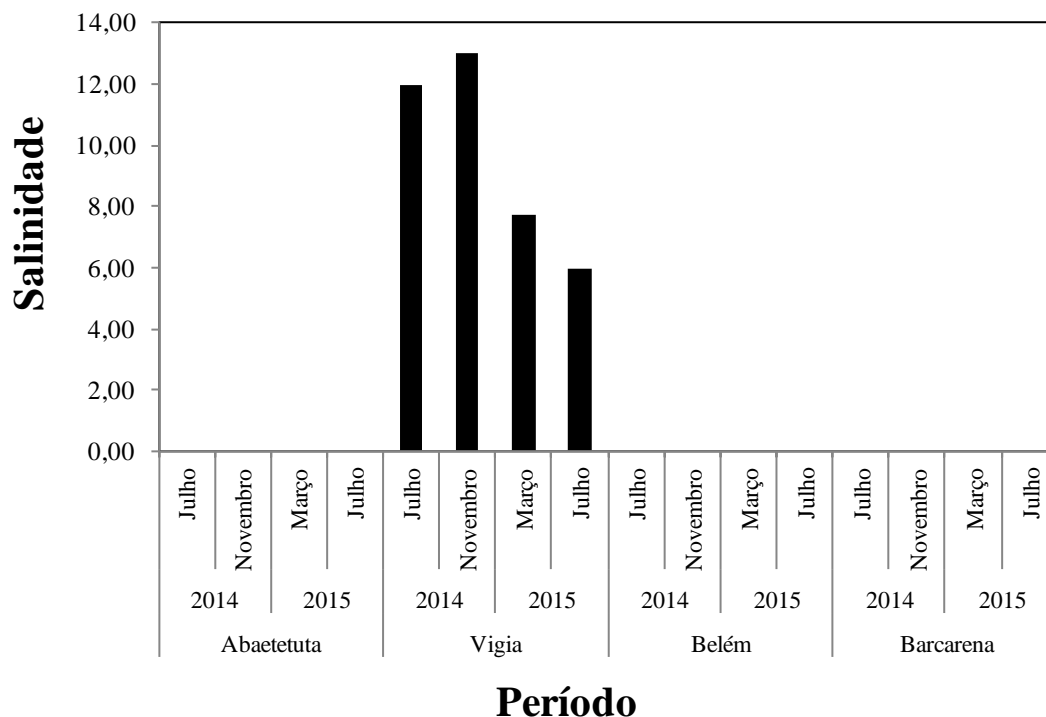
delineamento amostral foi bem distribuído e os dados de pluviosidade podem ser usados para avaliar correlações com os períodos sazonais.



**Figura 2.** Precipitação nos anos de 2014 e 2015(dados do INMET-PA, Estação 82191).

## SALINIDADE

Somente o ponto localizado em Vigia apresentou valores de salinidade diferentes de zero. O maior valor de salinidade (13,00) foi registrado no mês de novembro, período de menor intensidade pluviométrica. Provavelmente este nível está associado a maior intrusão das águas salinas do oceano atlântico no estuário. Ao contrário, no período de maior volume de chuvas a salinidade diminui (7,70), pois nesse caso haveria menor influência das águas oceânicas (Figura 3).



**Figura 3.** Salinidade nos quatro ambientes nos diferentes períodos analisados.

## SEDIMENTOS

A maioria dos metais analisados nos sedimentos apresentou valores dentro do permitido pelo CONAMA (2012). O níquel (Ni) teve concentrações maiores para todos os períodos nos pontos de Abaetetuba e Vigia, e em Belém e Barcarena esse metal apresentou concentrações elevadas em março e julho de 2015. O chumbo (Pb) apresentou valores acima dos regulamentares em março de 2015 apenas no ponto em Barcarena. Nos meses de março e julho de 2015 foi observado um aumento nas concentrações de metais nos sedimentos com destaque para as médias de Co, Ni, Mn e Cu.



**Tabela 1.** Metais ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) em sedimentos de fundo.

Ponto	Período*	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe
Abaetetuba	Nov/14	11,36 ± 1,30	50,22 ± 5,84	8,50 ± 1,97	390,37 ± 73,69	<b>19,45 ± 1,93**</b>	17,56 ± 3,01	61,24 ± 6,66	28239,16 ± 2421,73
	Mar/15	13,75 ± 2,12	62,02 ± 2,89	14,62 ± 0,88	641,03 ± 409,25	<b>28,54 ± 5,3**</b>	11,72 ± 10,57	73,86 ± 22,98	35795,11 ± 6088,38
	Jul/15	12,32 ± 5,19	50,57 ± 22,47	8,92 ± 3,66	440,23 ± 201,38	<b>18,43 ± 9,85**</b>	19,96 ± 12,55	102,24 ± 94,33	24714,71 ± 11403,60
Barcarena	Nov/14	5,91 ± 0,64	53,99 ± 6,25	3,44 ± 0,48	196,77 ± 42,62	14,81 ± 3,18	22,66 ± 4,04	48,82 ± 17,81	20094,23 ± 2523,67
	Mar/15	10,81 ± 1,71	81,07 ± 9,38	12,62 ± 2,18	402,89 ± 85,75	<b>26,75 ± 2,8**</b>	<b>41,47 ± 36,48**</b>	62,05 ± 52,04	32502,67 ± 2951,61
	Jul/15	9,02 ± 4,41	70,19 ± 21,90	11,06 ± 1,39	288,22 ± 78,06	<b>18,57 ± 4,25**</b>	29,47 ± 21,23	59,11 ± 41,84	26694,70 ± 8349,18
Belém	Nov/14	6,36 ± 0,24	55,58 ± 4,79	2,89 ± 1,36	201,61 ± 43,27	14,74 ± 2,36	20,31 ± 3,04	47,98 ± 17,22	20669,47 ± 2579,43
	Mar/15	10,78 ± 3,98	54,52 ± 2,43	10,21 ± 1,65	413,80 ± 144,56	<b>20,31 ± 3,77**</b>	14,69 ± 10,21	106,23 ± 153,63	24485,04 ± 3017,10
	Jul/15	14,73 ± 3,26	60,38 ± 4,47	16,03 ± 2,93	397,97 ± 88,00	<b>29,49 ± 3,38**</b>	12,79 ± 7,75	52,55 ± 7,69	30190,40 ± 5277,70
Vigia	Nov/14	9,60 ± 0,97	53,69 ± 4,48	8,87 ± 0,87	306,51 ± 66,51	<b>19,36 ± 1,80**</b>	24,49 ± 2,48	62,44 ± 6,35	24626,91 ± 2302,46
	Mar/15	13,83 ± 6,21	62,43 ± 8,02	14,52 ± 3,00	519,25 ± 64,94	<b>22,01 ± 6,09**</b>	21,86 ± 14,68	70,30 ± 17,16	31039,91 ± 6215,15
	Jul/15	11,97 ± 5,26	56,35 ± 12,13	12,18 ± 4,19	404,29 ± 160,59	<b>25,17 ± 8,03**</b>	15,99 ± 11,17	102,50 ± 109,50	28386,67 ± 5313,11

\* Por problemas logísticos, não houve coleta de sedimentos no mês de julho de 2014.

\*\* Destaque em negrito para os valores alterados segundo a Resolução CONAMA 454/2012.

## OSMOLARIDADE DA HEMOLINFA E ÁGUAS SUPERFICIAIS

Os maiores níveis de osmolaridade da hemolinfa foram registrados no ponto em Vigia em todos os períodos amostrados, com valores de 521,82 em julho de 2014, 579,72 em novembro de 2014, 486,55 em março de 2015 e 524,35 mmol.kg<sup>-1</sup> em julho de 2015. Os outros pontos amostrados apresentaram valores em torno de 415,00 mmol.kg<sup>-1</sup>, não se diferenciando entre si. A osmolaridade na água, assim como na hemolinfa, mostrou os maiores valores (48,00 a 172,00 mmol.kg<sup>-1</sup>) no ponto de Vigia em todos os períodos amostrados (Tabela 2), valores que podem estar associados ao ambiente de maior salinidade devido a maior proximidade dessa região com o oceano.

**Tabela 2.** Osmolaridade (mmol.kg<sup>-1</sup>) da hemolinfa e da água.

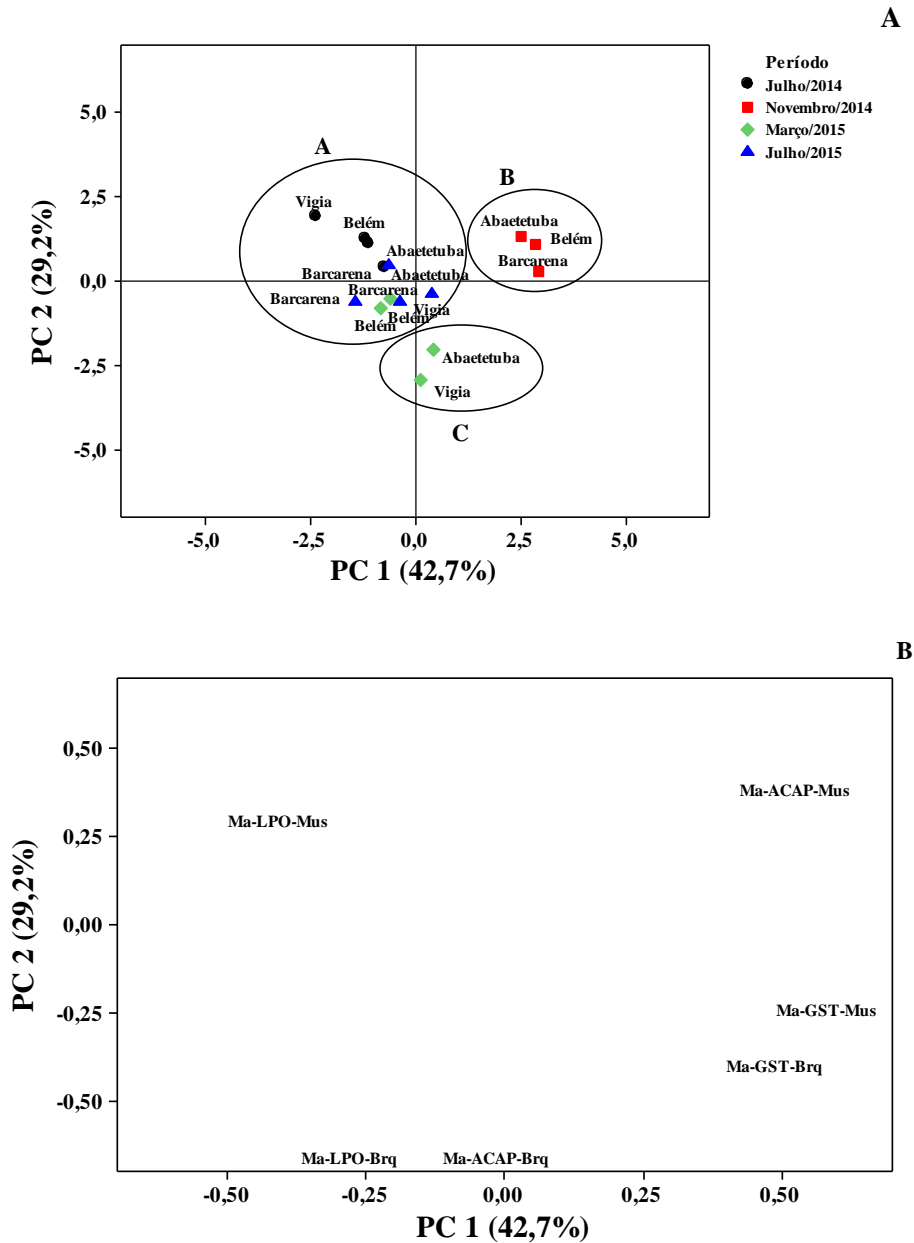
Ponto	Período	Hemolinfa		Água
		Média	Desvio Padrão	
Abaetetuba	Jul/14	406,00	± 34,28	27,00
	Nov/14	421,00	± 16,76	*NC
	Mar/15	405,70	± 20,62	22,00
	Jul/15	409,56	± 11,37	35,00
Barcarena	Jul/14	396,36	± 51,89	29,50
	Nov/14	449,45	± 12,13	34,50
	Mar/15	420,55	± 36,83	27,50
	Jul/15	410,00	± 24,46	33,00
Belém	Jul/14	384,40	± 30,06	28,50
	Nov/14	431,20	± 13,51	36,00
	Mar/15	423,40	± 26,51	41,00
	Jul/15	400,72	± 34,99	36,00
Vigia	Jul/14	521,82	± 24,53	172,00
	Nov/14	579,72	± 26,68	72,00
	Mar/15	486,55	± 45,42	48,00
	Jul/15	524,35	± 21,8	75,00

\* NC: Não coletado.

## BIOMARCADORES

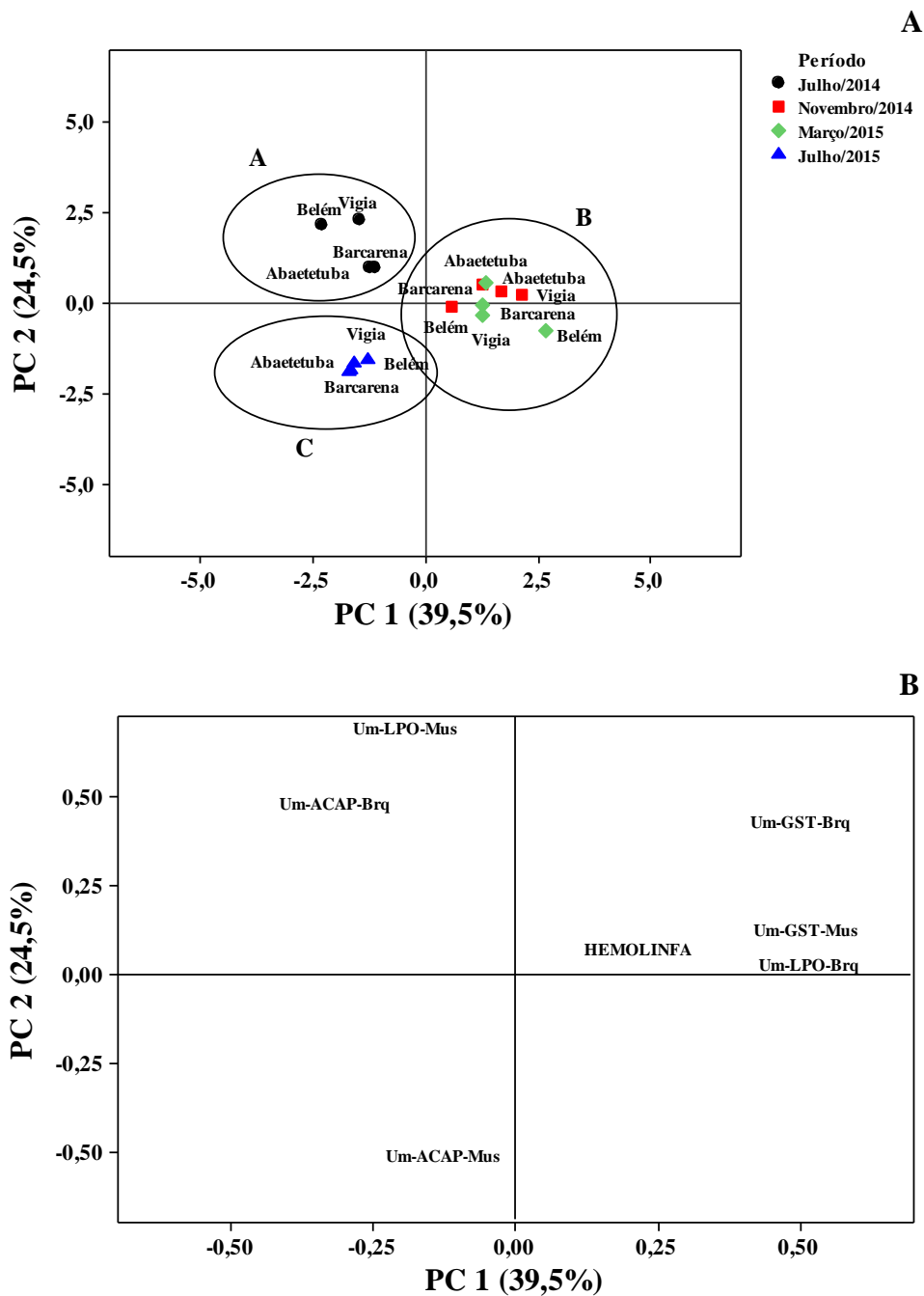
A PCA (Figura 4A e 4B) realizada para os biomarcadores dosados no *Macrobrachium amazonicum* mostrou a influência da sazonalidade nas respostas bioquímicas deste organismo. Foram formados três grupos, Grupo A, B e C. A PC1 separou bem o grupo A dos grupos B e C, enquanto que a PC2 separou bem os grupos B e C. O Grupo B reuniu todos os pontos do mês de novembro de 2014, período seco,

mostrando boa correlação entre os níveis de ACAP no músculo. O grupo C agrupou apenas os pontos de Vigia e Abaetetuba do mês de março de 2015, mostrando boa correlação com os níveis de ACAP nas brânquias. O grupo A reuniu os demais pontos, exceto o ponto de Vigia em julho de 2014. Estes resultados foram associados aos maiores níveis de LPO no músculo.



**Figura 4.** Análise de Componentes Principais (PCA) dos biomarcadores analisados nos tecidos do *Macrobrachium amazonicum*. (A) *Score plot* para os dois primeiros componentes; (B) *Loading plot* para os dois primeiros componentes.

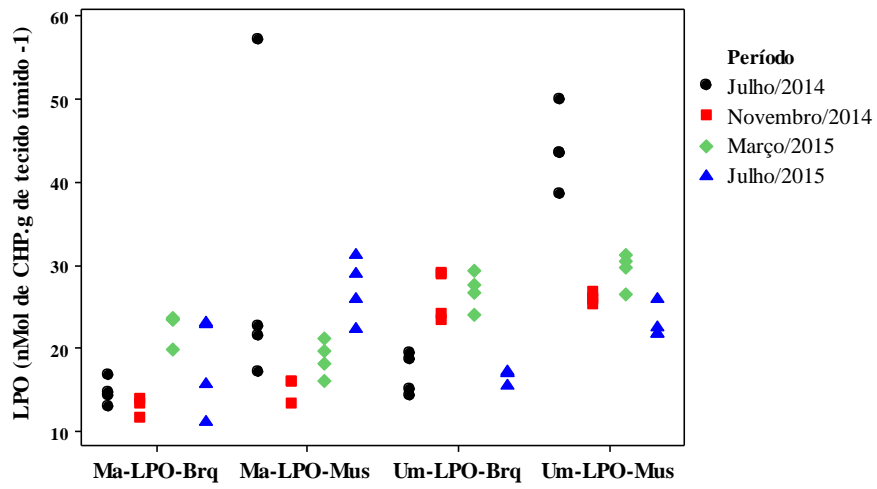
A PCA dos biomarcadores no *Uca mordax* separou os resultados em 3 grupos Grupo A, B e C. A PC1 separou bem o grupo B dos grupos A e C, enquanto a PC2 separou bem o grupo B do grupo C. No Grupo A foram reunidos todos os pontos referentes ao mês de julho de 2014, e este foi influenciado positivamente pela ACAP nas brânquias e LPO no músculo. O Grupo B está correlacionado com o aumento da atividade GST nas brânquias e músculo, LPO nas brânquias e osmolaridade da hemolinfa e é composto por todos os pontos dos meses de novembro de 2014 e março de 2015. O Grupo C reuniu todos os pontos no mês de julho de 2015 e foi influenciado pela ACAP do músculo (Figura 5A e 5B).



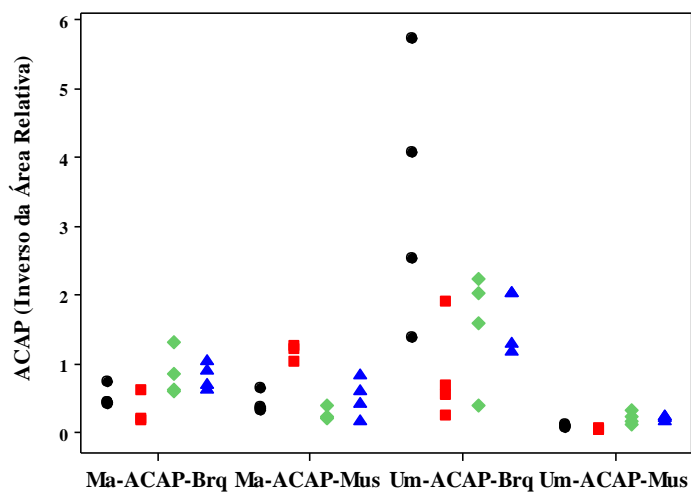
**Figura 5.** Análise de Componentes Principais (PCA) dos biomarcadores analisados nos tecidos muscular e branquial do *Uca mordax*. (A) *Score plot* para os dois primeiros componentes e (B) *Loading plot* para os dois primeiros componentes.

Os resultados para os biomarcadores testados foram organizados por períodos sazonais cada biomonitor (camarão e caranguejo) e seus tecidos (brânquias e músculo) na figura 6, onde (A) LPO, (B) ACAP e (C) GST.

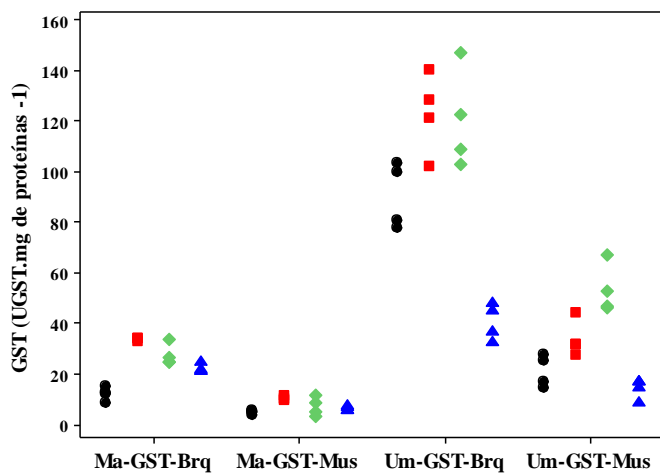
A



B



C



**Figura 6.** Níveis de biomarcadores (LPO, ACAP e GST) nos biomonitores (Ma: *Macrobrachium amazonicum* e Um: *Uca mordax*) por tecidos (Brq: Brânquias e Mus: Músculo).

### LPO

Não foram observadas diferenças temporais nos teores de LPO nos tecidos muscular e branquial do camarão ( $p=0,862$ ), entretanto, foram observadas diferenças espaciais na lipoperoxidação do músculo desse animal ( $p<0,000$ ), com valores mínimos e máximos de 17,36 (Barcarena, julho de 2014) e 57,34 nmol CHP.g tecido úmido<sup>-1</sup> (Vigia, julho de 2014), respectivamente.

Em todos os pontos coletados no mês de julho de 2014, o tecido muscular dos caranguejos tiveram os maiores valores de LPO (com mínimo de 38,82 nos animais de Barcarena e máximo de 50,16 nos de Vigia), em comparação aos demais períodos de amostragem ( $p<0,012$ ). Os valores médios para cada mês de coleta, foram 44,60 (julho de 2014); 26,20 (novembro de 2014); 29,52 (março de 2015) e 23,06 nmol CHP.g tecido úmido<sup>-1</sup> (julho de 2014). O tecido branquial não apresentou diferença significativa ao longo do tempo e locais estudados.

A lipoperoxidação no camarão, de modo geral, foi numericamente semelhante entre os tecidos analisados com médias totais de 17,51 nas brânquias e 23,27 nmol CHP.g tecido úmido<sup>-1</sup> no músculo, quanto ao *U. mordax*, a quantidade de lipídeos peroxidados teve médias maiores no tecido muscular (30,71 nmol CHP.g tecido úmido<sup>-1</sup> no músculo) que nas brânquias (21,84 nmol CHP.g tecido úmido<sup>-1</sup>). A LPO nas brânquias das duas espécies, não foi numericamente diferente, enquanto que a peroxidação lipídica no músculo do *U. mordax* apresentou maior quantidade que no *M. amazonicum*.

### ACAP

Os níveis de ACAP no camarão não mostraram diferenças espaciais em nenhum dos tecidos coletados ( $p=0,186$ ). No entanto a ACAP no músculo do camarão foi maior em novembro de 2014 com média de 1,17 ( $p=0,003$ ). Nos outros períodos as médias foram 0,42; 0,25 e 0,50 em julho de 2014, março de 2015 e julho de 2015 respectivamente. Não houve diferenças temporais nas brânquias do camarão ( $p=0,505$ ).

No caranguejo a ACAP nas brânquias foi maior em julho de 2014 com média de 3,44 ( $p < 0,012$ ). As médias dos outros períodos foram 0,85; 1,56 e 1,63 em novembro de 2014, março de 2015 e julho de 2015, na ordem. No mesmo período, também foram observadas diferenças espaciais para esse biomarcador nas brânquias dos animais, com valores mínimos nos animais de Abaetetuba (1,39) e máximos nos de Belém (5,75) ( $p = 0,000$ ). Não foram observadas diferenças temporais ou espaciais no músculo desse animal para esse biomarcador.

Os teores de ACAP no camarão não mostraram variações numéricas notáveis entre os tecidos analisados (0,64 nas brânquias e 0,55 no músculo), diferentemente do caranguejo, no qual, as brânquias apresentaram maior capacidade (1,87), em relação ao músculo (0,13), numericamente falando. Ao se comparar os níveis de ACAP entre os dois animais, o caranguejo mostrou valores maiores para os dois tecidos analisados.

### GST

A atividade da GST no camarão diferenciou-se temporalmente apenas nas brânquias ( $p = 0,000$ ), o menor valor médio mensal foi registrado em julho de 2014 (12,48  $U_{GST} \cdot g$  de proteína<sup>-1</sup>), período de transição, enquanto que a maior atividade desta enzima foi período seco, novembro de 2014 (34,04  $U_{GST} \cdot g$  de proteína<sup>-1</sup>). Espacialmente, os tecidos analisados não apresentaram diferenças ( $p = 0,405$ ) significativas na atividade da Glutathione S-Transferase.

Assim como nos camarões, a atividade dessa enzima apresentou diferenças temporais somente nas brânquias dos caranguejos ( $p = 0,001$ ), os menores e maiores valores médios mensais foram observados em julho de 2015 (40,89  $U_{GST} \cdot g$  de proteína<sup>-1</sup>) e novembro de 2014 (122,91  $U_{GST} \cdot g$  de proteína<sup>-1</sup>), respectivamente.

A atividade da enzima Glutathione-s-transferase foi numericamente maior nas brânquias de ambos os organismos estudados. Quando se compara a atividade desta enzima nos diferentes animais, foram observados maiores teores em ambos os tecidos do caranguejo quando comparados aos do camarão (23,50 nas brânquias e 7,35  $U_{GST} \cdot g$  de proteína<sup>-1</sup> no músculo do camarão, 93,66 nas brânquias e 30,84  $U_{GST} \cdot g$  de proteína<sup>-1</sup> do caranguejo).



## DISCUSSÃO

Na região amazônica há predominância de dois períodos sazonais, seco e chuvoso, e alguns meses de transição entre os mesmos. Esses períodos são caracterizados por inúmeros fatores, entre estes, as oscilações dos índices pluviométricos da região (Moraes et al., 2005; Amanajás et al., 2010; Costa et al., 2016a; Costa et al., 2016b). Essas diferentes pluviosidades influenciam nos habitats dos seres vivos no bioma amazônico e auxiliam na definição da colonização pelos organismos (Costa, 1991).

A variação de salinidade somente nas águas do município de Vígia decorre de sua localização geográfica, a nordeste do estado do Pará, mais próxima ao oceano atlântico, o chamado salgado paraense (Barthem; Goulding, 1997). Os valores de salinidade no estuário amazônico são influenciados pelos ciclos sazonais da região, no período chuvoso ocorre o aumento da vazão dos rios e das massas d'água, reduzindo a concentração de sais dissolvidos, no seco, as águas oceânicas atingem áreas mais internas do estuário, elevando os valores de salinidade (Cohem et al., 1995; Gregório e Mendes, 2008).

As oscilações de salinidade observadas no ponto em Vígia fazem com que os animais realizem mais trabalhos osmorregulatórios. Chong-Robles et al. (2014) em um experimento realizado com o camarão *Litopenaeus vannamei*, observou que variações de salinidade durante a ontogenia do animal são favoráveis ao seu desenvolvimento. Os caranguejos da espécie *U. mordax* são caracterizados como bons hipo-osmorreguladores, mantendo os valores de osmolaridade interna relativamente semelhantes ao do meio externo (D' Orazio e Holliday 1984; Wright et al. 1984; Holliday 1985; Zanders e Rojas 1996; Lin et al. 2002). A hipo-osmorregulação é um processo possibilita o animal passar muito tempo em terra durante o forrageio e reprodução, mantendo a osmolaridade interna constante enquanto exposto ao ar (Jones, 1941; Thurman, 2002).

As concentrações dos metais no sedimento acompanharam as oscilações na pluviosidade da região. O aumento no índice pluviométrico aumenta o movimento de massas d'água promovendo a lavagem do solo e a agitação do sedimento, liberando constituintes metálicos iônicos adsorvidos desse compartimento para coluna d'água. Esse carreamento de íons metálicos torna os organismos aquáticos mais expostos a essas substâncias que, dependendo da toxicidade, podem ser nocivas a estes animais (Pisanelli et al., 2009; Zheng et al., 2012; Brinkmann et al., 2013).

Por serem bentônicos, o camarão e o caranguejo possuem relação direta com o sedimento e entram em contato com substâncias adsorvidas nesse compartimento, como os compostos metálicos (Aviz et al., 2012). Vários estudos relatam a influência desses metais no metabolismo e atividades enzimáticas de organismos aquáticos (Chen e Chia, 1997; De Boeck et al., 2003; Valko et al., 2005; Grosell et al., 2007; Das et al., 2008; Lee et al. 2010; Cai et al., 2012; Gabriel et al. 2013; Martínèz-Ruiz e Martínèz-Jerónimo, 2015).

O Co pode causar danos em genes responsáveis pela síntese de moléculas antioxidantes em *Zebrafish* (Cai et al., 2012), além de elevar a produção intracelular de EROs (De Boeck et al., 2003). O Ni é outro metal que pode induzir respostas de defesas antioxidantes nos organismos (Valko et al., 2005; Das et al., 2008), assim como foi observado por Martínèz-Ruiz e Martínèz-Jerónimo (2015) onde esse metal levou uma população da alga *Ankistrodesmus falcatus* ao estado de estresse oxidativo.

A exposição ao Mn pode levar o organismo à condição de desbalanço oxidativo, elevando as quantidades de lipídeos peroxidados e ativação das vias de defesa enzimática em peixes (Gabriel et al. 2013). O Cu, em altas concentrações, prejudica a absorção de sódio pelos organismos, que é essencial para a manutenção da regulação osmótica, já que ambos se encontram no ambiente nas formas  $\text{Na}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , e competem pelos mesmos sítios de absorção nos organismos (Grosell et al., 2007). Tendo a absorção do sódio prejudicada o organismo intensifica as atividades osmorregulatórias, o que aumenta o gasto de energia elevando a produção de ATP, aumentando a produção de EROs endógena (Chen e Chia, 1997).

Com base nas correlações feitas entre os resultados dos biomarcadores e as concentrações de metal, o Cu foi correlacionado positivamente com LPO nas brânquias do *M. amazonicum* ( $p=0,01$ ;  $r=0,71$ ) e com ACAP no músculo do *U. mordax* ( $p=0,03$ ;  $r=0,62$ ). Dados mostram que esse metal em altas concentrações pode interferir nos processos osmoregulatórios, aumentando as taxas desse mecanismo e alterando os investimentos energéticos do animal, interferindo em seu metabolismo e desenvolvimento (Lee et al. 2010).

No período seco os crustáceos estão realizando o processo de muda (Luvizotto-Santos et al, 2003), que consiste na substituição do exoesqueleto, durante a muda acontecem alterações no metabolismo do animal, onde os gastos de energia são maiores, podendo elevar a produção de EROs intracelular (Silveira, 2008) e o incremento na produção de tais substâncias pode estimular o as defesas antioxidantes nos animais

(Halliwell & Gutteridge, 1999), fato que explica o aumento da ACAP no tecido muscular desses organismos, que é o principal fator no período seco para o *M. amazonicum*. Além disso, nesse período como consequência da redução da intensidade pluviométrica acontece a ressuspensão dos contaminantes por meio da sua ligação com partículas presentes na água e no sedimento (Lacerda, 2011) o que pode acarretar no aumento da produção interna de ERO's.

Em março de 2015 foi observado o aumento na quantidade de lipídeos peroxidados e maior ACAP no tecido branquial do *M. amazonicum* nos pontos em Vigia e Abaetetuba, considerados como menos antropizados, apesar de distintos ambientes salinos. Durante esse período aumenta a densidade da comunidade zooplanctônica, uma das principais fontes de alimento dos camarões (Fisher, 1979; Martins et al., 2006; Costa et al., 2016a; Costa et al., 2016 b). Com o aumento na disponibilidade de alimento, o animal aumenta as atividades de forrageio (Maciel, 2007) com o intuito de armazenar lipídios como reserva energética (Luvizotto-Santos et al., 2003), com maior quantidade de lipídeos as chances de serem peroxidados aumentam, fazendo com que haja a ativação das vias de defesas metabólicas totais, como a ACAP.

Os quatro pontos de coleta nos períodos de julho de 2014 e julho de 2015 e os pontos em Barcarena e Belém para março de 2015 foram influenciados, principalmente, pelo aumento na quantidade de lipídeos peroxidados no tecido muscular. Os meses de julho foram considerados períodos de transição, onde acontecem alterações climáticas em curtos períodos afetando o metabolismo do animal. As constantes alterações também podem alterar a disponibilidade de alimento, fator que altera o metabolismo do organismo. O *M. amazonicum* é um animal que, de modo geral, reproduz-se o ano inteiro, e ciclos endógenos, como a reprodução, alteram os investimentos energéticos do animal, causando o desbalanço oxidativo no mesmo. (Niyogi et al., 2001b; Regoli et al., 2002).

Nos meses de novembro de 2014 e março de 2015, considerados períodos seco e chuvoso, respectivamente, é onde acontecem os ciclos endógenos do animal, reprodução e muda, respectivamente. No caranguejo da espécie *Gecarcoidea natalis*, Adamczewska et al. (2000) verificaram a existência de diferenças sazonais na intensidade de exercícios dos animais, que durante o período mais chuvoso, migram para reprodução, e no seco evitam atividades fora das tocas. Os estudos também sugeriram haver diferenças na fisiologia e no metabolismo energético destes

organismos, que são consequências das diferenças comportamentais entre as estações chuvosa e seca.

No período chuvoso existe, ainda, o aumento na disponibilidade de alimento para o caranguejo e para o camarão (Fisher, 1979; Martins et al., 2006), assim durante essa estação os animais estão investindo em estocagem de lipídeos como reserva energética para prover energia durante a seca, para o momento da muda (Luvizotto-Santos et al., 2003). Assim durante os períodos de maior e menor intensidade pluviométrica o metabolismo dos animais reage de forma diferente, principalmente por conta das diferentes estratégias adotadas para cada período. Portanto, as alterações metabólicas nesses períodos podem ser causadas pelos diferentes investimentos energéticos adotados e pela ecologia do animal.

Os meses de julho de 2014 e 2015 apresentaram padrões diferentes entre si e dos outros períodos. Tendo sido considerado meses de transição, onde as oscilações climáticas são constantes. O clima é um dos fatores que podem alterar o metabolismo dos animais, assim os padrões metabólicos diferentes podem ser causas das inconstâncias climáticas. (Niyogi et al., 2001b; Regoli et al., 2002). Entretanto é possível observar alguns prováveis fatores para as alterações metabólicas observadas. Em 2014 a redução da intensidade das chuvas diminuiu de forma mais gradual, o que pode ter dado mais tempo aos animais para se acostumar ao novo clima, tendo um custo energético-metabólico menor para o animal. Em julho de 2015 a intensidade pluviométrica reduziu rapidamente podendo ter causado ao animal um estresse metabólico maior, e causando as diferenças nos padrões metabólicos para os meses de julho de 2014 e 2015.

O caranguejo e o camarão possuem ecologias semelhantes, são bentônicos, onívoros na fase adulta (Aviz et al., 2012), e em períodos de maior intensidade pluviométrica aumentam a taxa de reprodução (Odinetz-Collart, 1993; Silva et al., 2002; Silva et al., 2005; Bentes et al., 2011) Apesar de bentônico o *M. amazonicum* passa parte da vida adulta na coluna d'água, onde se alimenta do zooplâncton (Bentes et al., 2011) já o *U. mordax* passa toda a vida adulta em contato direto com o sedimento, onde constrói suas tocas (Crane 1975). Esse maior contato com os sedimentos onde os contaminantes estão mais concentrados, pode ter sido o fator responsável pelas respostas mais altas observadas nos biomarcadores do tecido do *U. mordax*, principalmente nas brânquias, já que esse tecido é o primeiro a entrar em contato com o meio externo via respiração. Fato que comprova a íntima relação desses animais com o

sedimento é que são considerados como bioperturbadores desse compartimento (Crane 1975).

## CONCLUSÃO

A sazonalidade é importante para a determinação de investimento energético dos animais, e em defesas antioxidantes. O período de transição, pela sua inconstância climática, demonstrou ser o mais impactante para os animais com sensíveis efeitos sobre seus metabolismos. A maior disponibilidade de metais nos sedimentos nesse período pode ter contribuído para estas alterações metabólicas. Nos períodos chuvoso e seco ficou evidenciada a influência dos ciclos endógenos no balanço energético e investimento metabólico dos animais.

O *U. mordax* foi o animal mais sensível as respostas dos biomarcadores, indicando este ser um melhor biomonitor em comparação com o *M. amazonicum*, apesar de serem necessários estudos complementares para melhor comprovação. Outras pesquisas envolvendo a análise de metais em crustáceos estuarinos devem ser futuramente desenvolvidas, considerando que foram observadas correlações entre a atividade dos biomarcadores e a concentração de metais no sedimento. Analisar a concentração de metais em outros compartimentos ambientais ou nos tecidos dos animais pode delinear melhor a relação da concentração de metais com os biomarcadores.

## AGRADECIMENTOS

Os autores do presente trabalho ao apoio técnico do Instituto Evandro Chagas (IEC) e ao apoio técnico e logístico do grupo de pesquisa BIOPAQ (Laboratório de Biomarcadores de Poluição Aquática) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

## REFERÊNCIAS

- Adamczewska, A. M., Morris, S. 2000. Respiratory gas transport, metabolic status, and locomotor capacity of the Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis* assessed in the field with respect to dichotomous seasonal activity levels. *Journal of Experimental Zoology*. 286. 552–562.
- Amado, L. L.; Longaray Garcia, M.; Ramos, P. B.; Freitas, R. F.; Zafalon, B.; Ribas Ferreira, J. L.; Yunes, J. S. & Monserrat, J. M. 2009. A method to measure total

- antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407. 2115-2123.
- Amado, L. L.; Robaldo, R. B.; Geracitano, L.; Monserrat, J. M.; Bianchini, A. 2006b. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian lounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Marine Pollution Bulletin*. 52. 207–213.
- Amanajás, J. C.; Braga, C. C.; Lima, F. J. L.; Guedes, R. V. S. 2010. Aplicação da análise fatorial em componentes principais a dados de precipitação no Estado do Amapá. *Revista de Geografia*. 27 (1). 107-119.
- Aviz, D.; Carvalho, I. L. R.; Rosa Filho, J. 2012. S.Spatial and temporal changes in macrobenthic communities in the Amazon coastal zone (Guajará Estuary, Brazil) caused by discharge of urban effluents. *Scientia Marina*. 76. 381-390.
- Barthem, R.; Goulding, M. 1997. Os bagres balizadores: ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos. Sociedade ed. Brasília: [s.n.]. p. 140 .
- Bentes, B. S.; Martinelli, J. M.; Souza, L. S.; Cavalcante, D. V.; Almeida, M. C; Isaac, V. J. 2011. Spatial distribution of the Amazon River prawn *Macrobrachium Amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) in two perennial creeks of an estuary on the northern coast of Brazil (Guajará Bay, Belém, Pará). *Brazilian Journal of Biology*. 71 (4). 925-935.
- Bialetzki, A.; Nakatani, K.; Baumgartner, G. & BondBuckup, G. 1997. Occurrence of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) in Leopoldo's Inlet (Ressaco do Leopoldo), upper Paraná river, Porto Rico, Parana, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 14(2). 379-390.
- Brinkmann, M.; Hudjetza, S.; Kammann, U.; Henniga, U. M.; Kuckelkorna, J.; Chinoraksa, M.; Cofallac, C.; Wisemand, S.; Giesyd, J. P.; Schäfferf, A.; Heckere, M.; Wölza, J.; Schüttrumpfc, H.; Hollert. H. 2013. How flood events affect rainbow trout: Evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquatic Toxicology*. 128. 13-24.
- Cai, G.; Zhu, J.; Shen, C.; Cui, Y.; Du, J.; Chen, X. 2012. The Effects of Cobalt on the Development, Oxidative Stress, and Apoptosis in Zebrafish Embryos. *Biological Trace Elements Research*. 150. 200–207.
- Cajaraville, M. P.; Bebianno, M. J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C. & Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of Total Environmental*, 247:295-311.
- Chen, J-C, Chia P-G. 1997. Osmotic and ionic concentrations of *Scylla serrata* (Forska 1) subjected to different salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 227.239-244.
- Chong-Robles, J.; Charmantier, G.; Boulo, V.; Lizárraga-Valdéz, J.; EnríquezParedes, L. M.; Giffard-Mena, I. 2014. Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during postembryonic development. *Aquaculture*. 422. 261–267
- Cohen, J. C. P.; Silva Dias, M. A. F; Nobre C. A. 1995. Environmental conditions associated with Amazonian squall lines: A case study. *Monthly Weather Review*. 123 (11). 3163 - 3174.
- Corsi, I.; Mariottini, M.; Sensini, C.; Lancini, L. & Focardi, S. 2003. Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integratind biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanologica Acta*, 26.129-138.

- Costa, B. N. S.; Pinheiro, S. C. C.; Amado L. L.; Lima, M. O. 2016 a. Microzooplankton as a bioindicator of environmental degradation in the Amazon. *Ecological Indicators*. 61. 526–545.
- Costa, B. N. S.; Pinheiro, S. C. C.; Lima, M. O.; Amado L. L. 2016 b. Microzooplankton as an indicator of environmental quality at an industrial complex in the Brazilian Amazon. *Ecological Indicators*. 66. 220–229
- Costa, K. M. P. 1991. Hidrologia e Biomassa Primária da Região Nordeste do Brasil entre as latitudes de 8°00'00"S e 2°44' 30"S e as longitudes de 35°56'30"W e 31°48'00"W. 217 f. Universidade Federal de Recife: Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – CGT, Recife.
- Crane J. 1975. Fiddler crabs of the world. Princeton: Princeton University Press. Hammer, Harper DAT, Ryan e PD (2001) PAST: Paleontological Statistics.
- D’Orazio S. E.; Holliday C. H. 1984. Gill Na, K-ATPase and osmoregulation in the sand fiddler crab, *Uca pugilator*. *Physiological Zoology*. 58. 364-373.
- Das, K. K.; Das, S. N.; Dhundasi, S. A. 2008. Nickel, its adverse health effects and oxidative stress. *Indian J. Med. Res.* 128. 412–425.
- De Boeck, M.; Kirsch-Volders, M.; Lison D. 2003. Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutation Research*. 533. 135–152.
- Fisher, T. R. 1979. Plankton and primary production in aquatic systems of the central Amazon basin. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*. 62. 31-38.
- Fransozo, V.C.; Mortari, R. C.; Benetti, A. S. 2009. Population biology of *Uca mordax* (Smith, 1870) (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) from the southeastern coast of Brazil. *Estudos de Biologia (UCP. Impreso)*. 31. 23-31.
- Gabriel, D.; Riffel, A. P. K.; Finamor, I. A.; Saccol, E. M. H.; Ourique, G. M.; Goulart, L. O.; Kochhann, D.; Cunha, M. A.; Garcia, L. O.; Pavanato, M. A.; Val, A. L.; Baldisserotto, B.; Llesuy, S. F. 2013. Effects of Subchronic Manganese Chloride Exposure on Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Tissues: Oxidative Stress and Antioxidant Defenses. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*. 64. 659 – 667.
- Gregório, A. M. D. S., Mendes, A.C. 2009. Characterization of sedimentary deposits at the confluence of two tributaries of the Pará River estuary (Guajará Bay, Amazon). *Cont. Shelf Res.* 29. 609–618.
- Grosell, M., Blanchard, J., Brix, K.V., Gerdes, R. 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquatic Toxicology*. 84. 162–172.
- Habig, W. H.; Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. 1974. Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biological Chemistry*. 249. 7130 - 7139.
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K. B. (Ed.). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. New Jersey: John Wiley & Sons. 319–368.
- Hermes-Lima, M.; Willmore, W. G. & Storey, K. B. 1995. Quantification of the lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*, 19:271-280.
- Jennifer Dorts, J.; Silvestre, F.; Tu, H. T.; Tyberghein, A.; Phuong, N. T.; Kestemont, P. 2009. Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28. 302–310.

- Jones L. L. 1941. Osmotic regulation in several crabs of the Pacific coast of North America. *Journal of Cellular Comparative Physiology*. 18. 79 - 92.
- Lacerda, L. D.; Miguens, F. C. 2011. A ressurreição do metal: A contaminação em sedimentos de estuários e deltas. *Ciência Hoje - Química Ambiental*. 48. 39 – 41.
- Lee, J. A.; Marsden, I. D.; Chris N. Glover, C. N. 2010. The influence of salinity on copper accumulation and its toxic effects in estuarine animals with differing osmoregulatory strategies. *Aquatic Toxicology*. 99. 65 – 72.
- Legendre, L.; Legendre, P. 2012. *Numerical Ecology*. Elsevier. Amsterdam.
- Lin, H. C.; Su, Y. C.; Su, S. C. 2002. A Comparative Study of Osmoregulation in Four Fiddler Crabs (Ocypodidae: Uca). *Zoological Science*. 19. 643 - 650.
- Luvizotto-Santos, R.; Lee, J. T.; Branco, Z. P.; Bianchini, A.; Nery, L. E. M. 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *Journal of Experimental Zoology*. 295A. 200 – 205.
- Maciel, C. R. 2007. Alimentação do camarão-da-Amazônia (*Macrobrachium Amazonicum*) durante a fase larval. 122 f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Martínez - 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*. 53. 66–76.
- Martínez-Ruiz, E. B.; Martínez-Jerónimo, F. 2015. Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the green microalga *Ankistrodesmus falcatus*: An integrative study. *Aquatic Toxicology* 169, 27–36
- Martins, A. A. V.; Costa, R. A. M.; Pereira, L. C. C. 2006. Space-time distribution of zooplankton community in an Amazonian artificial coastal lagoon in Bragança, Pará, Brazil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais*. 1 (3). 103 - 111.
- Masunari S. 2006. Distribuição e abundância dos caranguejos *Uca Leach* (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 23. 901–914.
- Masunari, S. & Dissenha, N. 2005. Alometria no crescimento de *Uca mordax* (Smith) (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 22(4). 984-990.
- Mcclusky, D. & Elliott, M. 2005. *The estuarine ecosystem. Ecology, threats and management*. Oxford, Oxford University Press. 214p.
- Melo, G. A. S. 2003. Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. In: Mello, G.A.S. *Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil*. São Paulo: Editora Loyla. 289 - 415.
- Melo, G.A.S. 1996. *Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro*. Plêiade/FAPESP, São Paulo.
- Monteiro, M. A. 2005. Mineração Industrial na Amazônia e suas Implicações para o Desenvolvimento Regional. *Novos Cadernos NAEA*. 8 (1). 141-187.
- Newman, M. C. 1998. *Fundamentals of ecotoxicology*. Chelsea, USA, Ann Arbor Press, 402p.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G., 2001b. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Marine Environmental. Research*. 52. 13 - 26.
- Odinetz - Collart, O. & Rabelo, H., 1996. Variation in egg size of the fresh - water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*. 16. 4.



- Odinetz-Colart, O. 1993. Ecologia e potencial pesqueiro do camarão-canela, *Macrobrachium amazonicum*, na Bacia Amazônica. In: Ferreira, E. J.; Santos, G. M.; Leão, E. L. M. & Oliveira, L.A. (Eds.) Bases Científicas para Estratégias de Preservação e desenvolvimento da Amazônia (2). INPA. 147-166 pp
- Pereira, P.; Pablo, H.; Subida, M. D.; Vale, C.; Pacheco, M. 2009. Biochemical responses of the shore crab (*Carcinus maenas*) in a eutrophic and metal-contaminated coastal system (Óbidos lagoon, Portugal). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72. 1471–1480
- Pileggi, L.G. & Mantelatto, F. L. 2010. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebr. Syst.* 24. 194-208.
- Pisanelli, B.; Benedetti, M.; Fattorini, D.; Regoli, F. 2009. Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilus galloprovincialis*: A possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers. *Chemosphere*. 77 (11). 1551 – 1557.
- Porto, L. A. C. 2004. Estudos morfológicos em populações do complexo *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) em diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo-USP. 149p.
- Regoli, F.; Nigro, M.; Chiantore, M.; Winston, G. W. 2002. Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Science Total Environmental*. 289. 205 - 211.
- Sampaio, C. M. S.; Silva, R. R.; Santos, J. A. & Sales, S. P. 2007. Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). *Braz. J. Biol.* 67(3). 551-559.
- Silva, K. C. A.; Cintra, I. H. A. & Muniz, A. P. M. 2005. Aspectos bioecológicos de *Macrobrachium amazonicum* (Heller,1862) a jusante do reservatório da hidroelétrica de Tucuruí – Pará. *Bol. Téc. Científ. CEPNOR* 5(1). 55-71.
- Silva, K.C.A.; Souza, R. A. L. & Cintra, I. H. A. 2002. Camarão-cascudo *Macrobrachium amazonicum* (Heller,1862) (Crustácea, Decapoda, Palaeminidae) no município de Vigia -Pará - Brasil. *Boletim. Técnico Científico. CEPNOR*. 2(1). 41-73.
- Souza, D. M.; Martins, A. C.; Jensen, L.; Wasielesky Jr, W.; Monserrat, J. M; Garcia, L. O. 2014. Effect of temperature on antioxidant enzymatic activity in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in a BFT (Biofloc technology) system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 47 (1). 1–10.
- Thurman, C. L, 2002. Osmoregulation in Six Sympatric Fiddler Crabs (genus *Uca*) from the Northwestern Gulf of Mexico. *Marine Ecology*. 23. 269 - 284.
- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Topics in Medicine. Chemistry*. 12. 1161 – 1208.
- Vergamini, F. G.; Pileggi, L. G. & Mantelatto, F. L. 2011. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contrib. Zool.* 80. 67-8.
- Wright, D. A.; Zanders, I. P.; Pait, A. 1984. Ionic regulation in three species of *Uca*: a comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 78. 175 - 179.
- Zanders I. P.; Rojas, W. E. 1996. Osmotic and ionic regulation in the fiddler crab *Uca rapax* acclimated to dilute and hypersaline seawater. *Marine Biology*. 125. 315 - 320.
- Zanette, J.; Monserrat, J. M.; Bianchini, A. 2015. Biochemical biomarkers in barnacles *Balanus improvisus*: Pollution and seasonal effects. *Marine Environmental Research*. 103. 74-79.

Zheng, Y.; Luo, X.; Zhang, W.; Wu, B.; Lin, Z.; Han, F.; Wang, X. 2012. Enrichment behavior and transport mechanism of soil-bound PAHs during rainfall-runoff events. *Environmental Pollution*. 171. 85 - 92.