



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação

**BIOACUMULAÇÃO DE METAIS E PRESENÇA DE
METALOTIONEÍNA NO CARANGUEJO-UÇÁ, *Ucides
cordatus* (LINNAEUS, 1763)**

CARMEN HELLEN DA SILVA ROCHA

SÃO LUÍS

2017

CARMEN HELLEN DA SILVA ROCHA

**BIOACUMULAÇÃO DE METAIS E PRESENÇA DE
METALOTIONEÍNA NO CARANGUEJO-UÇÁ, *Ucides
cordatus* (LINNAEUS, 1763)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Iranaldo Silva Santos

SÃO LUÍS

2017

Rocha, Carmen Hellen da Silva

BIOACUMULAÇÃO DE METAIS E PRESENÇA DE METALOTIONEÍNA NO CARANGUEJO-UÇÁ, *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763), Carmen Hellen da Silva Rocha – São Luis: MA, 2017.

Orientador: Ricardo Luvizotto Santos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, 2017.

CARMEN HELLEN DA SILVA ROCHA

**BIOACUMULAÇÃO DE METAIS E PRESENÇA DE
METALOTIONEÍNA NO CARANGUEJO-UÇÁ, *Ucides
cordatus* (LINNAEUS, 1763)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biodiversidade e Conservação da
Universidade Federal do Maranhão
como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Biodiversidade e Conservação.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

1º Examinador: Profa. Dra. Mariana Basso Jorge
Universidade Federal do Maranhão

2º Examinador: Prof. Dr. Jomar Livramento Barros Furtado
Universidade Federal do Maranhão

“Eu não vim até aqui pra desistir agora...Se depender de mim eu vou até o fim...”
(Humberto Gessinger)

Dedico
Á família! Mãe, Avó, irmãos, primas e tios.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo ao Deus que me deu forças pra concluir mais uma etapa.

Á minha família por todo o apoio, incentivo e paciência que sempre tiveram. Mãe e Avó obrigada por tudo, por acreditarem em mim até mais do que eu mesmo. Aos meus irmãos, Radna (que ouviu todas as minhas reclamações e me consolou nas vezes que pesava e as lágrimas rolavam), Milena e Wagner. A Minha Vovozinha mais fofa do mundo inteiro por todas as suas orações e palavras de confiança e incentivo. As minhas primas, Rose e Raissa por estarem sempre presente e me fazerem sorrir sempre. Aos meus tios Cléia e Santana, obrigada pelos abrigos pra fugir do barulho e conseguir estudar. Eu amo muito, imensuravelmente, cada um de vocês, não há palavras, canções, ou quaisquer formas de manifestações artísticas capaz de expressar.

Ao meu orientador Ricardo Luvizotto Santos por ter me aceito como orientada, por toda a sua paciência, disposição, tranquilidade e bom humor que foram essenciais para que eu não pirasse. Ao co-orientador Iranaldo Silva dos Santos, aprendi absurdamente sobre análises químicas com o senhor. Á professora Mariana Basso Jorge por ter sido um anjo maravilhoso, me sanou inúmeras dúvidas, o mundo precisa de mais seres humanos como você. Ao professor Eduardo Bezerra por sua compreensão, intervenção e conselhos. Sou muito grata ao senhor por ter acreditado em mim e me feito sorrir em meio ao choro.

Á Thamires e Beldo pela companhia, risadas, discussões acadêmicas e reflexões sobre a vida.

A Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de pós-graduação em Biodiversidade e Conservação pela oportunidade de desenvolver esse estudo e concluir o mestrado. Á Capes pela concessão da bolsa que tornou possível a permanência no programa e arcar alguns custos para realização desta pesquisa.

RESUMO

Os processos de urbanização e industrialização em regiões costeiras geram resíduos que podem impactar a biota local, sendo os metais pesados elementos de grande relevância nos estuários. Esses contaminantes podem ser assimilados pelos organismos podendo acumular-se nos tecidos e/ou causar efeitos tóxicos. O estudo de biomarcadores de exposição aos metais, como as metalotioneínas, as quais são responsáveis por manter a homeostase através da regulação de metais essenciais e detoxificação dos não essenciais, auxiliam no entendimento da disponibilidade química destes contaminantes no ambiente e sua assimilação pela biota. Além disso, medidas biométricas podem indicar os efeitos dos metais sobre a população, como a relação peso-largura e o fator de condição, que fornecem informações sobre o grau de bem estar da espécie. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo determinar as concentrações de metais e metalotioneínas em caranguejos da espécie *Ucides cordatus* de duas áreas de mangues equatoriais com fontes de contaminação distintas. Foram feitas duas campanhas amostrais na estação seca e duas na estação chuvosa quando foram coletados 104 machos adultos os quais foram levados ao laboratório onde foram limpos, pesados com auxílio de balança analítica e medidos com paquímetro digital. Em seguida, foram sacrificados para retirada do hepatopâncreas para as análises de metais (Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sc, Se, Sn, V, e Zn) e metalotioneínas. Para a análise de metais as amostras foram digeridas em forno digestor e analisadas em espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado. As metalotioneínas foram analisadas por espectrofotometria utilizando uma leitora de microplacas. Os resultados demonstraram diferenças significativas na massa corpórea, largura e comprimento de carapaça e no fator de condição entre as áreas e os períodos de coleta, sendo que no geral, os caranguejos que apresentaram os maiores valores biométricos foram aqueles coletados no manguezal mais distante da área industrializada. Também foram observadas diferenças significativas dos níveis de metais e metalotioneínas entre as áreas e os meses de coleta. Os metais que tiveram as maiores concentrações foram Fe, Mn, Cu e Zn. Houve forte correlação da síntese de metalotioneínas com a presença de metais. Quando maiores as concentração de metais, maiores foram os de metalotioneínas. Maiores níveis de pluviosidade levaram a uma maior concentração de metais nos caranguejos e conseqüente síntese de metalotioneínas.

Palavras-Chave: Biomarcadores; biometria; mangue; poluição marinha.

ABSTRACT

The urbanization and industrialization processes in coastal regions generate residues that can impact local biota, being heavy metals the elements of great relevance in estuaries. These contaminants can be assimilated by organisms that can accumulate in the tissues and/or cause toxic effects. The study of biomarkers of exposure to metals, such as metallothioneins, which are responsible for maintaining homeostasis through the regulation of essential metals and detoxification of nonessentials, help in understanding the chemical availability of these contaminants in the environment and their assimilation by biota. In addition, biometric measurements may indicate the effects of metals on the population, such as the weight-to-width ratio and the condition factor, which provide information on the species healthiness. The present study aimed to determine the concentrations of metals and metallothioneins in crabs *Ucides cordatus* caught in two equatorial mangrove areas with distinct sources of contamination. Two sampling campaigns were carried out in the dry season and two in the rainy season when 104 adult males were collected, cleaned in laboratory and weighed with an analytical balance and measured with a digital caliper. They were then sacrificed to remove hepatopancreas for analysis of metals (Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sc, Se, Sn, V, and Zn) and metallothioneins. Samples were digested in a digester furnace and analyzed in an atomic emission spectrometer with inductively coupled plasma. Metallothioneins were analyzed by spectrophotometry using a microplate reader. The results showed significant differences in body mass, carapace width and length, and the condition factor between the areas and the collection month. In general, the crabs that presented the highest biometric values were those collected in the mangrove distant from industrialized area. Significant differences were also observed in the levels of metals and metallothioneins between areas and collection month. Metals with the highest concentrations were Fe, Mn, Cu and Zn. There was a strong correlation between the metallothioneins synthesis and the presence of metals. High concentration of metals coincided with higher concentration of metallothioneins. The rainfall led to a higher concentration of metals in the hepatopancreas and consequent synthesis of metallothioneins.

Keywords: Biomarker; crab biometry; mangle; marine pollution.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MT: Metalotioneínas

MTF -1: Fator de Transcrições de Metais I

ICP-OES: Espectrômetro de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado

GSH: Glutationa Reduzida

AI: Área Industrializada

ANI: Área Não Industrializada

CCBS: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

CCET: Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica das áreas de coleta

Figura 2. Metais encontrados em maiores concentrações no hepatopâncreas de *Ucides cordatus* na área industrializada (A) e não industrializada (B).

Figura 3. Metais encontrados em menores concentrações no hepatopâncreas de *Ucides cordatus* na área industrializada (A) e não industrializada (B).

Figura 4. Média e erro padrão da concentração de metalotioneínas (A) e somatório de metais (B) durante os meses de outubro (out) e dezembro (dez) (estação seca) e março (mar) e maio (mai) (estação chuvosa) na área industrializada (AI) e não industrializada (ANI).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de recuperação dos materiais de referência certificados.

Tabela 2. Coeficiente de correlação de Pearson (r), entre os metais e metalotioneínas em hepatopâncreas de *U. cordatus*.

Tabela 3. Dados biométricos com os valores de média e erro padrão por período e local de coleta. Letras iguais indicam valores semelhantes ($p > 0,05$) do parâmetro biométrico. (Out = outubro; Dez = dezembro; Mar = março; Mai = maio; ANI = Área não industrializada; AI = Área industrializada).

Tabela 4. Representação algébrica das retas e curvas de função potência da relação peso-comprimento para *U. cordatus*. R^2 = Coeficiente de determinação da regressão linear. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre áreas. Letras iguais com asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os meses de uma mesma área.

SUMÁRIO

| | |
|--|--------|
| 1.CAPÍTULO I..... | II |
| 1.1.Apresentação Geral | II |
| 1.2.Revisão Bibliográfica | IV |
| 1.3.Objetivo Geral | XI |
| 1.4.Objetivos Específicos | XI |
| 1.5.Referências | XII |
| 2.CAPÍTULO II | XX |
| 2.1.Introdução..... | XXI |
| 2.2. Materiais e Métodos..... | XXII |
| 2.3.Resultados..... | XXVII |
| 2.4.Discussão..... | XXXII |
| 3.CONCLUSÃO..... | XXXVI |
| 4.REFERÊNCIAS..... | XXXVII |
| 5.ANEXOS (curvas de calibração e análises de metais) | XLIII |

CAPÍTULO 1

1. APRESENTAÇÃO GERAL

O crescimento social, econômico e demográfico requer investimentos em infraestrutura, como transportes e indústrias. No entanto, estas mudanças causam alterações na qualidade dos ecossistemas e quase todas as atividades antropogênicas afetam as regiões costeiras (Pereira e Ebecken, 2009). A urbanização e industrialização nestas regiões acabam por impactar os ecossistemas devido ao descarte inadequado de efluentes os quais ou não foram tratados ou passaram por sistemas ineficientes de tratamento (Galindo e Moreira, 2009; Rubinger, 2009). Essas áreas constituem os ecossistemas mais ameaçados por serem o principal local das atividades econômicas, e em 2001, concentravam 60% da população mundial (Hixon et al., 2001). A descarga contínua e a liberação de compostos químicos nocivos nessas regiões perturbam a estrutura e equilíbrio desses ecossistemas (Delunardo, 2010) contaminados principalmente, por metais pesados, compostos químicos orgânicos e nutrientes, muitos dos quais comprometem a biota local (Ferreira, 2009).

A presença de compostos tóxicos no ambiente, ainda que em baixas concentrações, representa risco não só pelo fato de serem potencialmente nocivos, mas também pelas interações que podem desenvolver com outras substâncias do meio (Sousa, 2009). A exposição frequente aos organismos vivos, e consequente interação com os mesmos, causa diversas alterações fisiológicas, podendo gerar graves consequências às populações, comunidades e ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição dos seres vivos a esses compostos (Jesus e Carvalho, 2008).

Dentre os contaminantes ambientais, destacam-se os metais pesados, disponíveis no ambiente por diferentes vias, sejam por fontes naturais a partir do intemperismo das rochas, ou antropogênicas, através dos resíduos urbanos, industriais e agrícolas (Demirak et al., 2006). Os metais diferenciam-se dos compostos orgânicos tóxicos por serem absolutamente não degradáveis, de maneira que podem se acumular no ambiente e na biota ampliando as probabilidades de intoxicação (Bard e Zoski, 2000; Zhang et al., 2012; Ye et al., 2015). A necessidade de quantificar o teor desses metais lançados no ecossistema levou ao desenvolvimento de diversas pesquisas a fim de analisar a presença desses nos diferentes compartimentos ambientais e os impactos que podem causar (Yabe,

1998). E como estão entre os contaminantes mais tóxicos e persistentes do ambiente aquático, suas fontes, transporte e destino precisam ser avaliados (Campos, 2002).

Os organismos vivos são utilizados como biomonitores para fornecer informações sobre a presença desses poluentes no ambiente (Zhou et al., 2008), pois refletem a fração biodisponível destes (García-Seoane et al., 2016; Morrison et al., 2017). Dentre os grupos mais utilizados, destacam-se os macroinvertebrados bentônicos por sua facilidade de coleta, ampla distribuição e baixa mobilidade (Armitage e Pardo, 1995; Barbour et al., 1999). Dentro deste grupo, os crustáceos podem ser usados no monitoramento da contaminação ambiental, por serem organismos que acumulam contaminantes tanto da água quanto do sedimento (Ricciard et al., 2010) mas são resistentes quanto a toxicidade (Cossa, 1989), como por exemplo, o caranguejo de mangue *Ucides cordatus* que é considerado uma espécie sentinela devido à sua sensibilidade aos xenobióticos tóxicos nos ambientes naturais (Duarte et al., 2016).

Os efeitos desses agentes químicos sobre a biota podem ser mensurados a partir da utilização de biomarcadores, uma vez que as alterações comportamentais são sempre precedidas por alterações moleculares e celulares nos organismos expostos (Albuquerque, 2007). Entende-se por biomarcadores os fluidos corpóreos, as células ou os tecidos que indicam nos níveis bioquímicos ou celulares a presença de contaminantes (Wanick, 2007). A medida da qualidade do ambiente em que um organismo está inserido a partir da determinação da concentração de metais nos mesmos, fornece informações sobre os prováveis danos causados a eles (Guimarães e Sijolo, 2008), bem como a utilização de biomarcadores fornece dados sobre os efeitos que podem atingir magnitude nos demais níveis de organização ambiental.

Um importante biomarcador utilizado para avaliar contaminação por metais são as metalotioneínas (Silva Junior et. al, 2012), que estão presente em todos os organismos vivos, sendo sua síntese induzida por exposição aos metais pesados (Melendez et.al,2012). As metalotioneínas (MT) são proteínas citosólicas de baixo peso molecular, com aproximadamente 6 a 7 KDa, compostas por uma única cadeia de aminoácidos, cuja síntese é induzida pela presença dos metais. Apesar dessa indução resultar no aumento da ligação dos metais a ela, quando a capacidade das ligações das metalotioneínas são excedidas, metais como Cd e Hg ligam-se a outras proteínas de alto peso molecular, iniciando seus efeitos tóxicos (Inácio, 2006). As MTs são responsáveis pela regulação intracelular, suprimindo a demanda biológica de elementos essenciais e protegendo a célula de efeitos deletérios ocasionados pela exposição elevada, tanto dos elementos essenciais

quanto não essenciais. Uma das principais vantagens de sua utilização como biomarcador se dá pelo fato de sua síntese ser um indicador precoce de exposição aos metais (Melendez et. al, 2012).

A ativação de mecanismos de resposta às substâncias tóxicas pode interferir nos parâmetros biométricos das espécies que, portanto, também podem ser utilizados como indicadores de mudanças provocadas por impactos ambientais (Barrilli et. al, 2015), visto que mudanças no peso e comprimento e no fator de condição de espécies em relação a áreas com maior ou menor impacto ambiental podem ocorrer como consequência de gastos energéticos em outros processos fisiológicos, dificultando a investida em crescimento somático (Ferkau e Fischer, 2006).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Metais Pesados

De acordo com Duffus (2002), metal pesado é todo elemento que apresenta massa específica elevada (variando entre 3,5 a 7,0 g/cm³), elevada massa atômica (>23) e elevado número atômico (= ou >20), sendo os mais comuns: sódio, potássio, bário, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel, magnésio, arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho, tungstênio, cromo, cobalto e manganês. Apresentam densidade relativa maior que seis e geralmente estão relacionados à poluição e um alto caráter tóxico, no entanto qualquer metal, mesmo os essenciais, podem ser tóxicos acima de certas concentrações (Ferreira, 2009).

Os metais podem ser classificados como essenciais e não essenciais, dependendo da função biológica que desempenham (Lavraras, 2012). Valls e Lorenzo (2002) classificam estes elementos em três categorias: essenciais e basicamente não tóxicos, como o cálcio e o magnésio; essenciais mas prejudiciais em concentrações elevadas, como ferro, manganês, zinco, cobre, cobalto, níquel e molibdênio; e não essenciais e tóxicos como mercúrio e cádmio.

Metais essenciais em excesso ou metais não essenciais, uma vez presentes no organismo, podem ocasionar disfunção de órgãos internos, perturbar as reações imunológicas, alterar os parâmetros sanguíneos, reduzir as qualidades de adaptação de um organismo, a vitalidade e resistência às doenças (Staniskiene et. al, 2006). Além disso, podem causar inibição de enzimas, interferência nos sistemas de transportes de íons metálicos essenciais a partir de biomoléculas e unidades celulares funcionais,

modificação, desnaturação e inativação de enzimas, ruptura de células e integridade da membrana (Gadd, 1994).

Os metais são produzidos e liberados por variadas fontes naturais e antropogênicas (Demirak et al., 2006; Suárez-Serrano et al., 2010; Roig et al., 2015; Torres et al., 2016) e a assimilação destes pelos organismos pode ocorrer tanto por absorção direta através da água, quanto indiretamente através da alimentação (Hamilton et al., 1998; Ferreira, 2009).

Segundo Pereira e Ebecken (2009), estes metais são introduzidos nos ambientes costeiros associados ao material particulado em suspensão, dissolvidos na coluna d'água ou por deposição atmosférica. A presença desses metais no ambiente pode ocasionar efeitos adversos tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana, dependendo da disponibilidade nos vários compartimentos ambientais (Pacyna e Pacyna, 2001). A contaminação antrópica do ambiente por metais tem se tornado uma das grandes preocupações atuais, devido aos impactos que podem ocasionar na água, sedimento e seres vivos (Jesus et. al, 2004), causando toxicidade nos organismos de interesse comercial.

Uma característica que afeta a toxicidade do metal é a sua espécie, ou seja, a forma que se encontra na natureza, bem como a forma de transporte e biodisponibilidade do mesmo (Lima e Merçon, 2011). A disponibilidade (biológica) por sua vez, representa o potencial que um elemento químico tem de ser absorvido pelos seres vivos (Guimarães e Sijolo, 2008). Portanto a acumulação de metais nos organismos torna-se diretamente relacionada com a fração disponível desses metais no ambiente (Lima e Merçon, 2011).

De acordo com Roig et al. (2015), embora as concentrações de metais presentes na água sejam baixas ou indetectáveis pelos métodos analíticos convencionais, ainda sim podem ser bioacumulados em níveis elevados pelos organismos, uma vez que a complexidade dos ecossistemas aquáticos e as variáveis ambientais influenciam na disponibilidade dos poluentes. Os organismos ao bioacumular metais pesados podem representar risco para o homem ou qualquer outro organismo inserido na cadeia trófica (Gbogbo e Otoo, 2015). Diante de sua toxicidade, persistência e bioacumulação, estão entre os principais poluentes do ambiente aquático com concentrações cada vez mais crescentes devido aos resíduos domésticos, minerações, atividades agrícolas e industriais (Aoun et al., 2015).

Um exemplo claro da bioacumulação de elementos químicos pode ser constatada nas pesquisas feitas por Genuis e Kelln (2015) em que relacionam casos de

Alzheimer com a exposição por metais e DDE, um subproduto do DDT (diclorodifeniltricloroetano). Este último foi usado durante décadas na agricultura brasileira e também no combate às endemias como malária e dengue; por sua elevada persistência (décadas), ainda se pode encontrar resíduos de DDT e DDE nos ambientes aquáticos e terrestres. Tais substâncias contêm mercúrio, chumbo e cádmio em sua composição; por essa razão, esses metais são encontrados em organismos que habitam países que ainda utilizam ou que utilizaram por muito tempo o DDT. Isso se dá devido à biomagnificação na cadeia alimentar e também devido às constantes exposições ao ambiente afetado por tais substâncias tóxicas.

2.2. Biomarcadores

Uma vez que as análises químicas do ambiente ou nos organismos por si só, não são capazes de prever o real efeito da presença dos metais, e a dificuldade de se extrapolar os resultados dos testes de toxicidade em laboratório para o que realmente ocorreria em campo, utilizam-se biomarcadores a fim de ampliar as ferramentas de avaliação ambiental (Peakall, 1994).

Diversos parâmetros biológicos podem ser alterados como consequência da interação de substâncias químicas com o organismo e podem ser utilizados como indicadores quando existe relação entre intensidade da exposição e efeito da substância (Amorim, 2003). Desta forma, um biomarcador é qualquer alteração em nível celular, molecular, genético, enzimático ou hormonal que sirva como indicador de estresse ou doença de um organismo (Sahu et al., 2011). Podem ser classificados como biomarcadores de exposição, efeito ou suscetibilidade (Who, 1993; Azevedo e Chasin, 2004).

Os biomarcadores de exposição indicam que um organismo esteve em contato com determinado agente químico não informando, no entanto, o grau de efeito adverso que essa exposição pode causar. Os de efeito são aqueles capazes de demonstrar os efeitos ocasionados no organismo, através da avaliação de alterações em diferentes níveis biológicos, mostrando sinais com relação aos danos ou repostas dos indivíduos expostos. Biomarcadores de suscetibilidade por sua vez são indicadores de processos de resistência aos agentes tóxicos, indicando as variações das respostas ao longo do tempo e dependem das características individuais dos organismos expostos.

Portanto, o estudo dos biomarcadores nas ciências ambientais propõe relacionar as alterações biológicas resultantes da exposição ou do efeito dos contaminantes do meio ambiente (Bainy, 2001) permitindo detectar previamente os efeitos de poluentes nos organismos antes que afetem os níveis de organização ecológica superiores (populações, comunidade e ecossistemas) (Depledge e Fossi, 1994). A utilização de biomarcadores em níveis mais baixos na organização biológica são amplamente utilizados para medir alterações no organismo decorrentes da presença de xenobióticos e avaliar o estado de saúde do organismo (Huggett et al., 1992), podendo avaliar desde o grau do impacto na biota, até os estressores ou poluentes responsáveis por este efeito (Fuentes-Rios et al., 2005).

Para a análise dos biomarcadores o ideal é procurar eliminar a influência de fatores biológicos, como peso, idade, sexo e estágio reprodutivo, de modo que as respostas sejam influenciadas apenas pelos poluentes (Silva-Junior et al., 2012). Faz-se necessário a seleção de espécies biomonitoras adequadas, que sejam abundantes, acessíveis, apresentem ciclo de vida longo e que sejam representativas no ambiente em questão (van der Oost et al., 2003).

2.3. Metalotioneínas (MTs)

As MTs foram descobertas em 1957 por Margoshes e Vallee, no córtex renal de equinos associadas com Cd. As MTs são proteínas estáveis e ligam-se aos íons de metais através das cisteínas presentes em sua estrutura, formando ligações metal-tiolato (Kagi e Schaffer, 1988). As MTs desempenham papel no transporte e armazenamento de metais essenciais e também proteção contra o efeito desses metais, essenciais ou não essenciais, pois elas se ligam aos íons metálicos livres tornando-os menos disponíveis para interagir com outras biomoléculas (Langston et al., 2003).

As MTs são induzidas para reduzir o efeito tóxico dos metais e são o primeiro sinal estável de exposição aos metais em nível celular (Filipovic e Raspor, 2003). Por este motivo são amplamente utilizadas como biomarcador validado para avaliar a contaminação de ambientes aquáticos por metais em níveis traço (Hauser-Davis et al., 2012).

A indução da síntese de MT provoca aumento da ligação dos metais a essa proteína, logo, os efeitos tóxicos de metais como mercúrio e cádmio ocorrem quando a capacidade de ligação das MTs com o metal é excedida, permitindo que estes metais se associem com outras proteínas de alto peso molecular no citosol (Inácio, 2006). A

ativação da transcrição dos genes que codificam as MTs depende de regiões reguladoras, os elementos de resposta a metais (MRE), que é ativado ao interagir com MTF1 (fator de transcrição), sendo que a ativação desde pode ser ocasionada a partir da ligação do zinco a este fator (Westin e Schaffner, 1988; Maur et al., 2000; Selvaraj et al., 2005; Wanick, 2007).

O estresse oxidativo ocasionado pela presença de metais também pode ativar o gene da MT indiretamente pelo aumento do zinco livre, já que a MT assim como outras proteínas, libera zinco em condições redox pela oxidação dos tióis, que são responsáveis pela coordenação da ligação de zinco (HaQ et al., 2003). Portanto, biomarcadores bioquímicos como as MTs são eficazes pois geralmente são os primeiros a serem detectados, são altamente sensíveis à presença de determinados poluentes, possuem alta especificidade e fornecem informações a respeito do efeito causado por determinado xenobiótico (Walker, 1996; Amorim, 2003), antes que sejam observados em nível de populações (Lama e Gray, 2003; Freire et al., 2008).

2.4. *Ucides cordatus* - caranguejo-uçá

O gênero *Ucides* compreende espécies conhecidas popularmente como caranguejo-uçá ou caranguejo-vermelho. São espécies de grande importância nas áreas que ocorrem devido a sua utilização como recurso pesqueiro pelas populações ribeirinhas (Pinheiro et al., 2016).

O caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Crustacea; Brachyura; Ocypodidae) é um crustáceo semiterrestre de regiões tipicamente estuarinas que habita manguezais, estendendo-se desde o norte da Florida (EUA) até o litoral de Santa Catarina, Brasil (Valentim Neto, 2004; Wunderlich, et al., 2008; Wellens et al; 2015). É uma espécie amplamente distribuída e faz parte da dieta de comunidades costeiras, considerada uma espécie sentinela devido a sua resistência aos xenobióticos tóxicos (Pinheiro et al., 2016). São abundantes em regiões de mangue e apresentam endemismo e mobilidade reduzida, alimentando-se de folhas e sedimentos, possuem vida relativamente longa e crescimento lento (Pinheiro et al., 2012). É muito utilizado como fonte de alimento em várias regiões brasileiras e, portanto, de grande importância econômica (Hattori e Pinheiro, 2003), além disso, é considerado um componente central da macrofauna bêntica dos manguezais (Moraes et al., 2015).

Vale ressaltar que o mangue constitui um ecossistema altamente influenciado pela interação entre a biota e o ambiente (Christofolletti, 2005) e que além de fornecer diversos recursos vivos para o extrativismo, constituem um berçário natural para muitas espécies de organismos marinhos e estuarinos que utilizam este ambiente para a desova, refúgio, reprodução, crescimento e alimentação (Oliveira, 2013). Além disso, protegem a linha da costa e servem de barreira geoquímica aos poluentes (Spalding et al., 2010). Apesar de toda a relevância ecológica, este habitat tem sido alterado devido a sobre-exploração de produtos florestais e expansão das populações humanas nas zonas costeiras (Ferreira e Lacerda, 2016), conseqüentemente, a qualidade do ambiente é ameaçada por componentes físicos e químicos (Adamczuk et al., 2015), tais como assoreamento, eutrofização, poluição por substâncias tóxicas, metais pesados entre outros (Avigliano et al., 2015; Tiquio et al., 2017).

A biota constitui uma ferramenta importante de avaliação e monitoramento ambiental, pois a presença dos contaminantes pode ser medida diretamente através dela (Rodrigues et al., 2012). Dessa forma, o caranguejo-uçá pode ser utilizado para o biomonitoramento de ambientes poluídos por metais, pois se encontra disponível o ano todo e possui alta capacidade de bioacumulação, sendo que as concentrações de metais nos tecidos refletem os níveis ambientais (Aoun et al., 2015).

2.5. Biometria e fator de condição

As relações de peso e largura são importantes para se obter informações sobre as taxas de crescimento, para compreender o ciclo de vida de uma determinada espécie, diagnosticar alterações decorrentes de impactos ambientais, como poluição, desmatamento ou sobre-exploração, em comparação com as populações livres de impactos antrópicos (Castiglioni et al., 2006). Essas relações fornecem informações sobre o tipo de crescimento de caranguejos, que pode ser alométrico ou isométrico.

A classificação do tipo de crescimento em isométrico e alométrico positivo ou negativo se dá em relação ao incremento nessas variáveis, sendo alométrico negativo, quando há um maior incremento na largura, alométrico positivo, quando o maior incremento se dá no peso e isométrico, quando peso e largura crescem na mesma proporção (Pinheiro e Hattori, 2006; Mohapatra et al. 2010; Ahmad dar et al. 2012; Lira et al. 2012). Segundo Araújo e Calado (2008) e Araújo et al. (2012), *U. cordaus* apresenta

crescimento do tipo alométrico negativo, tendendo à isometria, indicando que esses caranguejos crescem mais em largura do que em peso.

As relações de peso e largura, assim como o fator de condição, são ainda pouco estudadas para crustáceos, destacando-se neste sentido, o estudo de Pinheiro e Fiscarelli (2009) e Araújo et al. (2012) que avaliaram a relação peso e comprimento e o fator de condição alométrico de Le cren (1951) para caranguejos-uçá.

3 OBJETIVO GERAL

Analisar a concentração dos metais Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sc, Se, Sn, V, e Zn e de metalotioneínas no hepatopâncreas de caranguejos *Ucides cordatus* coletados em manguezais com pressões antrópicas distintas e em diferentes épocas do ano.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a influência da proximidade das fontes poluidoras e da estação chuvosa nos teores de metais acumulados nos caranguejos.
- Determinar a correlação dos níveis de metais acumulados com o biomarcador (metalotioneína) e a biometria dos caranguejos.

4. REFERÊNCIAS

- Adamczuk, M.; Mieczam, T.; Nawrot, D.; Rechulicz, J. 2015. Indirect effect of environmental factors on interactions between microbial and classical food webs in freshwater ecosystems. **Annales de Limnologie - International Journal Limnology**, 51: 49–58.
- Albuquerque, C. 2007. **Uso da Acetilcolinesterase e Metalotioneína em Peixes na Avaliação do Efeito da Contaminação na Baía de Guanabara (Dissertação)**. Rio de Janeiro.
- Amorim, L.C.A. 2003. O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, 1:124-132.
- Aoun, M.; Aranudquilhem, C.; El Samad, O.; Khozam, R.B.; Lobinski, R. 2015. Impact of a phosphate fertilizer plant on the contamination of marine biota by heavy elements. **Environmental Science Pollution Research**, 22:14940–14949.
- Araújo, M. S. L. C.; Calado, T. C. S.2008. Bioecologia do Caranguejo-Uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus) no Complexo Estuarino Lagunar Mundáu/Manguaba (CELMM), Alagoas, Brasil. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, 8(2):169-181.
- Araújo, M.S.L.C.; Castiglioni, D.S.; Coelho, P.A. 2012. Width-weight relationship and condition factor of *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda, Ucididae) at tropical mangroves of Northeast Brazil. **Iheringia Série Zoologia**, 102(3):277-284.
- Armitage, P. D.; Pardo, I.1995.Impact assessment of regulation at the reach level using mesohabitat information. *Regulated Rivers: Research and Management*, 10:147-158.
- Ahmad dar, S.; Najar, A. M.; BaLkhi, M. H.; Rather, M. A.; Sharma, R. 2012. Length weight relationship and relative condition factor of *Schizopyge esocinus* (Heckel, 1838) from Jhelum River, Kashmir. **International Journal of Aquatic Science**, 3:29-36.
- Avigliano, E.; Schenone, N.F.; Volpedo, A.V.2015. Heavy metals and trace elements in muscle of silverside (*Odontesthes bonariensis*) and water from different environments (Argentina): aquatic pollution and consumption effect approach. **Science of the Total Environment**, 506(500): 102–108.
- Azevedo, F. A., Chasin, A. D. M. 2004. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: InterTox.
- Barbour, M. T.; Gerritsen, J.; Snyder, B.D.; Stribling, J.B.1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. 2. ed. **Washington: United States Environmental Protection Agency/Office of Water (EPA 841-B-99-002)**.
- Bainy, A.C.D.; Marques, M.R.F. (2001). Expressão do complexo citocromo P4501A e das metalotioneínas na avaliação da contaminação aquática. In: Crapez, M.; Moraes, R.;

- Pfeiffer, W.; Farina, M.; Bainy, A.; Teixeira, V. (Eds.). **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Arte e Ciência Villipress. p.271 - 286.
- Bard, A. J.; Zoski, C. G., 2000. Voltammetric Retrospective. **Analytical Chemistry**, 72(9): 346-352.
- 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 Neotropica**, 15(1):1-9.
- Campos, M. L. A. M.; Bendo, A.; Viel, F.C. 2002. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle de contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. **Química Nova**, 25: 808-813.
- Castiglioni, D. S.; Negreiros-Fransozo, M. L.; Mortari, R. C. 2006. Biologia populacional do caranguejo violinista *Uca rapax* (Smith, 1870) (Crustacea, Ocypodoidea) proveniente de uma área de manguezal degradado em Paraty, RJ, Brasil. **Atlântica**, 28:73-86.
- Chistofoletti, R. A. 2005. **Ecologia trófica do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763) (CRUSTACEA-OCYPODIDAE) e o fluxo de nutrientes em bosques de mangue, na Região de Iguapé (SP)**. (Tese).
- Cossa, D.1989. A review of the *Mytilus* spp as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. **Oceanologica Acta**, 12:417–32.
- Delunardo, F. A. C. 2010. **Danos Genotóxicos, Mutagênicos e Morfológicos em *Hippocampus reidi* Exposto ao Petróleo (Dissertação)**. Vila Velha.
- Demirak, A.; Yilmaz, F.; Tuna, A.L.; Ozdemir, N. 2006. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. **Chemosphere**, 63: 1451–1458.
- Depledge, M. H; Fossi, M.C.1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology**, 3:161-72.
- 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.
- Duffus, J.H. 2002. Heavy metals - A meaningless term? **Pure and Applied Chemistry**, 74: 793-807.
- Ferreira, A.D. 2009. Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, água e em *Leucopternis lacernulata* (gavião pomba). Estudo de caso: Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Gaia Scientia**, 3(2): 23 – 31.
- Ferreira, A.C.; Lacerda, L.D. 2016. Degradation and conservation of Brazilian mangroves, status and perspectivas. **Ocean e Coastal Management**, 125: 38-46.

- Ferkau, C.; Fischer, K. 2006. Costs of reproduction in male *Bicyclus anynana* and *Pieris napibutterflies*: effects of mating history and food limitation. **Ethology**, 112:1117-1127.
- Freire, M.M.; Santos, V.G.; Ginuino, I.S.F.; Arias, A.R.L. 2008. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, 12(3):347-354.
- Filipovic V, Raspor B. 2003. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. **Water Research**, 37(13): 3253-3262.
- Fuentes-Rios, D.; Orrego, R.; Rudolph, A.; Mendonza, G.; Gavilán, J.F.; Barra, R. 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Ghuichenot 1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. **Chemosphere**, 61(2):192-199.
- Gadd, G.M. 1994. **Interactions of Fungi with Toxic Metals**. Plenum Press, New York.
- Galindo, T. P.; Moreira, L.M. 2009. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). **Genetics and Molecular Biology**, 32(2): 394-398.
- García-Seoane, R; Fernández, J.A; Villares, R. Aboal, J.R. 2016. Use of macroalgae to biomonitor pollutants in coastal waters: Optimization of the methodology. **Ecological Indicators**, 84: 710–726.
- Genuis, S.J.; Kelln, K.L. 2015. Toxicant Exposure and Bioaccumulation: A Common and Potentially Reversible Cause of Cognitive Dysfunction and Dementia. **Behavioural Neurology**, 2015:1-10.
- Guimarães, V; Sijolo, J.B. 2008. Detecção de contaminantes em espécie bioindicadora (*Corbicula fluminea*) - Rio Ribeira de Iguape – SP. **Química Nova**, 31(7):1696-1698.
- Gbogbo, F.; Otoo, S. D. 2015. The concentrations of five heavy metals in components of an economically important urban coastal wetland in Ghana: public health and phytoremediation implications. **Environmental Monitoring and Assessment**, 187(10): 655.
- Haq, F.; Mahoney, M.; Koropatnick, J. 2003. Signaling events for metallothionein induction. **Mutation Research**, 533:211-226.
- Hauser-Davis R.A.; Gonçalves, R.A.; Zioli, R.L.; Campos, R.C. 2012. A novel report of metallothioneins in fish bile: SDS-PAGE analysis, spectrophotometry quantification and metal speciation characterization by liquid chromatography coupled to ICP-MS. **Aquatic Toxicology**, 116-117: 54-60.

Hamilton, D.P.; Malik, D.S.; Sastry, K.V. 1998. Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murrel (*Channa punctatus*). **Environment International**, 24 (4): 433-438.

Hattori, G.Y; Pinheiro, M.A.A. 2003. Fertility of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), at Iguape (São Paulo), Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 20 (2):309-313.

Hixon, M. A., Boersma, P., Hunter, M. L., Micheli, Fiorenza, Norse, E., et al. 2001. **Oceans at risk: Research priorities in marine conservation biology**. In M.E. Soulé e G.H. Orians (Eds.), Conservation biology: Research priorities for the next decade (pp. 125–154). Washington, DC: Island Press.

Hugget, R.J. 1992. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Lewis Publishers, Boca Raton, 347p.

Inácio, A.F. 2006. **Metalotioneínas e metais em *Geophagus brasiliensis*- Acará (Dissertação)**.

Jesus, H.C.; Costa, E.A.; Mendonça, A.S.F.; Eliana Zandonade, E. 2004. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. **Química Nova**, 27(3): 378-386.

Jesus, T.B.; Carvalho, C.E.V.; 2008. Utilização de bioindicadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia brasiliensis**, 12 (4): 680-693.

Kagi, J.H.; Schaffer, A. 1988. Biochemistry of metallothionein. **Biochemistry**, 27 (23): 8509-8515.

Lama, P.K.S.; Gray, J.S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programs. **Marine Pollution Bulletin**, 46(2): 182-186.

Langston WJ, Chesman BS, Burt GR, Hawkins SJ, Readman J, Worsfold P. 2003. **Site characterization of the South West European Marine sites**. Plymouth Sound and Estuaries cSAC, SPA. Occasional Publications. Marine Biological Association of the United Kingdom (9) 202p.

Lavraras, R. T. 2012. **Determinação de metais (Cu, Fe, Zn, Pb, Cd e Ni) em tecidos de organismos marinhos da baía da Ilha Grande, RJ, Brasil**. (Dissertação).

Le Cren, E. D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition factor in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, 20:201-219.

Lima, V.F.; Merçon, F. 2011. Metais Pesados no Ensino de Química. **Química Nova na Escola**, 33(4):199-205.

Lira, J.J.P.R.; Calado, T.C.S.; Araújo, M.S.LC. 2012. Condition factor of *Goniopsis cruentata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae) from Mundaú/Manguaba estuarine complex, Alagoas, Brazil. **Iheringia Série Zoologia**, 102 (3):285-291.

Margoshes, J.H.; Vallee, B.L.A. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. **Journal of the American Chemical Society**, 69: 4813-4814.

Maur, A.A.D.; Beser, T.; Wang, Y.; Gunes, C.; Lichtlen, P.; Georgiev, O.; Schaffner, W. 2000. Characterization of the mouse gene for the heavy metal-responsive transcription factor MTF-1. **Cell Stress Chaperones**, 5(3): 196–206.

Melendez, L. B.; Kütter, V. T.; Montes-Bayón, M.; Sella S. M.; Silva-Filho, E. V. 2012. Determinação de Metalotioneínas e Fitoquelatinas utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS. **Revista Virtual de Química**, 4 (6):612-622.

Moraes, E.E.B.; Nunes-Maia, 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, Brazil. **Nauplius**, 23:1.

Morrison, L.; Bennion, M.; McGrory, E.; Hurley, W.; Johnson, M.P. 2017. *Talitrus saltator* as a biomonitor: An assessment of trace element contamination on an urban coastline gradient. **Marine Pollution Bulletin**, 120: 232–238.

Mohapatra, A.; Mohanty, R.K.; Mohanty, S.K.; Dey, S.K. 2010. Carapace width and weight relationships, condition factor, relative condition factor and gonado-somatic index (GSI) of mud crabs (*Scylla* spp.) from Chilika Lagoon, India. **Indian Journal of Marine Sciences**, 39:120-127.

Oliveira, P.J.A.; Coelho, P.A.; Castiglioni, D.S. 2013. Population biology of *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae) from two tropical mangroves sites in northeast coast of Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, 8(2): 89-103.

Pacyna, J.M.; Pacyna, E.G. 2001. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. **Environmental Reviews**, 9: 269–298.

Peakall, D.B. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. **Ecotoxicology**, 3:157-160.

Pereira, G.C.; Ebecken, N.F.F. 2009. Knowledge discovering for coastal waters classification. **Expert Systems with Applications**, 36:8604–8609.

Pinheiro, M. A. A. e Hattori, G. Y. 2006. Relative growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) at Iguape, São Paulo, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49:813-823.

- Pinheiro, M. A. A.; Fiscarelli, A. G. 2009. Length-weight relationship and condition factor of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52:397-406.
- Pinheiro, M.A.A., Silva, P.P.G., Duarte, L.F.A., Almeida, A.A., Zanoto, F.F., 2012. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 81:114–121.
- Ricciard, F.; Matozzo, V.; Binelli, A.; Marin, M.G. 2010. Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments. **Water research**, 44: 1725–1736.
- Rodrigues, V.G.S.; Fujikawa, A.; Abessa, D.M.S.; Hortellani, M.A.; Sarkis, J.A.S.; Sijolo, J.B. 2012. Uso do Bivalve Límnico *Anodontites tenebricosus* (LEA, 1834) no Biomonitoramento de Metais do Rio Ribeira de Iguape. **Química Nova**, 35(3):454-459.
- Roig, N.; Sierra, J.; Moreno-Garrido, I.; Nieto, H.; Gallego, E.P.; Schuhmacher, M.; Blasco, J. 2015. Metal bioavailability in freshwater sediment samples and their influence on ecological status of river basins. **Science of the Total Environment**, 540:287-296.
- Rubinger, C.F. 2009. **Seleção de Métodos Biológicos para Avaliação Toxicologia de Efluentes Industriais**. (Dissertação).
- Sahu, P.; Neha, P.; Dhar, D.R.; Sweta, P.; Shilp, C.; Tanushree, C. 2011. Biomarkers: An emerging tool for diagnosis of a disease and drug development. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, 1(1): 09-16.
- Selvaraj, A.; Balamurugan, K.; Yepiscoposyan, H.; Zhou, H.; Egli, D.; Georgiev, O.; Thiele, D.J.; Schaffner, W. 2005. Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes. **Genes e Development**, 19(8): 891–896.
- Silva Junior, D.R. Gomes, V.S.; Linde-Arias, A.R.; Vianna, M. 2012. Metallothionein in the pond perch *Diplectrum radiale* (Teleostei) as a biomarker of pollution in Guanabara Bay estuary, Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, 7(1):83-88.
- Sousa, J. K. C. 2009. **Avaliação de impactos ambientais causados por metais-traço em água, sedimento e material biológico na Baía de São Marcos, São Luís–Maranhão**. (Tese) João Pessoa–PB-Brasil.
- Spalding, M.; Kainuma, M.; Collins L. 2010. **World Atlas of Mangrove**. London: Earthscan Publications. 336p.
- Suárez-Serrano, A. et al. 2010. *Procambarus clarkia* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73: 280–286.

Staniskiėne, B.; Matusevicius, P.; Budreckiėne, R.; Skibniewska, K.A. 2006. Distribution of heavy metals in tissues of freshwater fish in Lithuania. **Polish Journal of Environmental Studies**, 15(4):586-591.

Torres, P.; Cunha, R.T.; Micaelo, C.; Rodrigues, A.S. 2016. Bioaccumulation of metals and PCBs in *Raja clavata*. **Science of the Total Environment**, 573: 1021–1030.

Tiquio, G. J. P.; Marmier, N.; Francour, P. 2017. Management frameworks for coastal and marine pollution in the European and South East Asian regions. **Ocean e Coastal Management**, 135:65-78.

Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F.; Fabbri, R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, 44 (1): 69-84.

Yabe, M.J.S.; Oliveira, E. 1998. Metais pesados em guas superficiais como estratgia de caracterizao de bacias hidrogrficas. **Qumica Nova**, 21(5): 551-556.

Ye, H.; Zang, S.; Xiao, H.; Zhang, L. 2015. Speciation and ecological risk of heavy metals and metalloid in the sediments of Zhalong Wetland in China. **International Journal Environment Science Technology**, 12:115-124.

Valentim Neto, P.A. 2004. **Possveis Causas do Caranguejo-Ua, *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763) no Esturio do Rio Jaguaribe – Cear.** (Dissertao).

Valls, M; Lorenzo, V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. **FEMS Microbiology Reviews** 26(4):327-338.

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**, 13: 57-149.

Walker, C. H.; Sibly, R.M.; Hopkin, S.P.; Peakall, D.B. 1996. **Principles of ecotoxicology**. Bristol: Taylor & Francis.

Wanick, R.C. 2007. **Identificao de metalotionenas em ostra *Grassostrea rhizophoriae* (GUILDING, 1828) para aplicaoes ambientais**. Dissertao (mestrado).

Westin, G.; Schaffner, W. 1988. A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. **The embol Journal**, 7(12): 3763–3770.

Wellens, S.; Sandrini-Neto, S.; Gonzlez-wanguemert, M.; Lana, P. 2015. Do the crabs *Goniopsis cruentata* and *Ucides cordatus* compete for mangrove propagules? A field-based experimental approach. **Hydrobiologia**, 757(1):117–128.

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.

Wunderlich, A. C.; Pinheiro, M.A.A.; Rodrigues, A.M.T. 2008. Biology of the mangrove uçá crab, *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura), in Babitonga Bay, Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 25(2):188-198.

Zhang G.S.; Liu, D.Y.; Wu, H.F.; Chen, L.L.; Han, Q.X. 2012. Heavy metal contamination in the marine organisms in Yantai Coast, Northern Yellow Sea of China. **Ecotoxicology**, 21:1726- 1733.

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, 606 (2): 135–150.

CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido à revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*

Metais Pesados e Metalotioneínas em *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763) (Crustacea: Brachyura: Ucididae), em dois manguezais equatoriais.

Carmen Hellen da Silva Rocha ^a, Mariana Basso Jorge ^b, Iranaldo Silva Santos ^c, Ricardo Luvizotto-Santos ^{*b}.

^a Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil; Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação. Avenida dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, MA, 65085-580.

^b Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil. Departamento de Oceanografia. Avenida dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, MA, 65085-580.

^c Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil. Departamento de Química. Avenida dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, MA, 65085-580.

RESUMO: As regiões costeiras constituem um dos ambientes mais impactados devido à intensa urbanização e presença de portos e indústrias, sendo que os metais pesados estão entre os contaminantes de grande relevância cujos teores têm aumentado causando risco aos ecossistemas estuarinos e à populações que exploram seus recursos. O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração dos metais Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sc, Se, Sn, V, e Zn e metalotioneínas (MTs) no hepatopâncreas de caranguejos machos adultos da espécie *Ucides cordatus* em duas áreas de mangue com impactos distintos, em estação seca e chuvosa. Os metais foram analisados através de espectrometria utilizando ICP-OES e as MTs foram analisadas por método colorimétrico. Houve diferença significativa nas concentrações de metais e metalotioneínas em função da área de coleta e da estação climática. A biometria indicou que os maiores caranguejos foram coletados na área não industrializada, os quais apresentaram melhor fator de condição. Os metais encontrados em maiores concentrações foram Fe, Mn, Cu e Zn, sendo que estes apresentaram forte correlação com as metalotioneínas e biometria dos caranguejos-uçá.

Palavras-chave: Biomarcadores; biometria; mangue; poluição marinha.

ABSTRACT: Coastal regions are one of the most impacted ecosystems due to the urbanization and industries in their surroundings. The presence of heavy metals has increased as a consequence of these impacts in those environments causing risk to the ecosystems and to the population that uses its resources. The aim of this study was to evaluate the concentration of metals Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sc, Se, Sn, V, e Zn and metallothioneins (MTs) in hepatopancreas of adult male crabs *Ucides cordatus* caught in two mangrove areas with distinct impacts in dry and rainy season. Metals were analyzed by spectrometry using ICP-OES and MTs by colorimetric method. There was a significant difference in the concentrations of metals and metallothioneins depending on the collection area and the climatic season. Biometrics indicated that the largest crabs were collected in the non-industrialized area, which presented a better condition factor. The metals found in higher concentrations were Fe, Mn, Cu and Zn, and these showed a strong correlation with metallothioneins and biometry of uçá crabs.

Key words: Biomarker; crab biometry; mangle; marine pollution.

1.Introdução

Os manguezais, além de extremamente importantes para a fauna marinha que utiliza esse ecossistema para refúgio, reprodução e alimentação, representam também o meio de subsistência para as populações tradicionais (Wu et al., 2014). Por outro lado, a descarga contínua de resíduos industriais, o processamento e transporte de minério e a urbanização nas regiões costeiras têm levado ao desequilíbrio desses ecossistemas, principalmente pela contaminação por metais (Pacyna e Pacyna, 2001).

Os metais são considerados poluentes ambientais por conferirem efeitos deletérios e permanentes (Gao e Chen, 2012) e não serem biodegradáveis, configurando efeito tóxico quando em altas concentrações (Barbieri et al., 2010), cuja bioacumulação depende da disponibilidade química e de fatores bióticos e abióticos (Fernandes et al., 2008).

As análises químicas tradicionais não são capazes de fornecer informações conclusivas sobre a interação dos contaminantes com a biota (Aly et al., 2014; Beg et al., 2015) e portanto, cada vez mais pesquisadores optam por estudos integrados utilizando os biomarcadores para melhor compreender as interações entre os xenobióticos e os organismos (Langston et al., 2003). Os organismos são capazes de desenvolver mecanismos de regulação desses poluentes, como por exemplo as metalotioneínas (MTs) que são proteínas que se ligam aos metais e são responsáveis pelo seu transporte e eliminação (Durkalec et al., 2017). As MTs são o primeiro sinal de exposição aos metais (Buzzi e Marcovecchio, 2016). Quando ocorre um aumento da concentração de metais no organismo, a síntese de metalotioneínas é aumentada, ligando-se a eles através das cisteínas presentes em sua estrutura (Lavraras, 2014; Kagi, 1991), formando ligações metal-tiolato (Kagi e Schaffer, 1988).

A avaliação de efeitos causados por xenobióticos através de biomarcadores, requer a utilização de espécies biomonitoras (Birk et al., 2012), ou seja, espécies que sejam representativas para o ambiente em estudo e apresentem características como sensibilidade e que expressem respostas biológica frente à exposição. O caranguejo de mangue *Ucides cordatus* é um macro invertebrado bentônico, e uma das espécies mais estudadas nos manguezais por possuir características que permitem estudar a bioacumulação de contaminantes. Dentre estas características destacam-se a baixa mobilidade, o fato de alimentar-se de matéria orgânica dos sedimentos, possuir uma taxa

de crescimento lenta, ter um ciclo de vida relativamente longo e de serem fáceis de capturar (Christofoletti, 2005; Pinheiro et al., 2005; Pinheiro et al., 2012).

Os efeitos de estressores naturais ou antrópicos podem ter reflexo sobre o desenvolvimento corporal de algumas espécies de caranguejos, uma vez que os organismos presentes em áreas mais impactadas apresentam maior assimetria corporal, devido ao maior gasto energético inerente ao estresse (Matheson e Gagnon, 2012; Lezcano et al., 2015). Jerônimo e Balbino (2012) consideram que esse desequilíbrio energético pode inclusive alterar o ciclo de reprodução de uma determinada espécie.

A biometria de espécies monitoras é uma ferramenta capaz de fornecer informações sobre a estrutura e maturidade morfológica (Lima e Oshiro, 2006), estimar o tipo de crescimento que os organismos apresentam quando as condições são favoráveis ou desfavoráveis ao ainda o bem estar do indivíduo (Rodrigues e D'incao, 2015), além de mostrar possíveis diferenças adaptativas (Moraes et al., 2015) e taxas de crescimento desigual de áreas impactadas em comparação às populações de áreas mais preservadas (Araújo et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi analisar a concentração de metais e MTs no hepatopâncreas de caranguejos machos adultos da espécie *U. cordatus* coletados em manguezais com pressões antrópicas distintas e em diferentes épocas do ano, buscando determinar a influência do local e da estação chuvosa nos teores de metais acumulados, bem como determinar a correlação desses metais com o biomarcador e os dados biométricos dos caranguejos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Área de estudo

Os caranguejos foram coletados em duas áreas de manguezais da margem equatorial brasileira, sendo um bosque localizado próximo ao Complexo Portuário do Itaquí (CPI), cujas coordenadas situam-se a 02°43' 43,5'' S e 44°21' 44,5'' O, e outro bosque distante 44 km da área industrializada, com coordenadas a 2°26' 48,3'' S e 44°04' 41,6'' O (Figura 1).

O bosque de mangue localizado nas proximidades da área industrializada (AI) está situado na baía de São Marcos (Maranhão, Nordeste do Brasil) onde estão estabelecidas diversas indústrias, uma usina termoeletrica, além de integrar o segundo maior complexo portuário em movimentação de cargas da América Latina, desenvolvendo importante atividade no transporte de minérios, petróleo e seus subprodutos, fertilizantes e grãos (Alcântara e Santos, 2005), situado entre os paralelos

02°34'S e 02°36'S e os meridianos 44°21'O e 44°24'O, a 11 km do centro da cidade de São Luís (MA), tendo como limites ao norte, manguezais e matas de terra firme e a leste e sudeste florestas de mangue (EMAP, 2014). Apesar dessa intensa ocupação industrial, comunidades tradicionais utilizam os recursos desta região para subsistência e atividades econômicas derivadas da pesca. A área em questão já foi alvo de estudos que constataram a contaminação da água e do sedimento por metais (Cu, Pb, Zn, Cd, Ni, Fe, Al e Mn) (Sousa, 2009) e as transformações ambientais e sociais ocasionadas pela instalação da usina termelétrica próxima ao porto (Carvalho, 2011), implicando em diferentes impactos ambientais para esta área (Chagas, 2013).

O bosque de mangue da área não industrializada (ANI), localizado na baía de São José, no município de Raposa, MA é local de captura de recursos pesqueiros praticada pela população local, cujo acesso só é possível por embarcações de pequeno porte. Resíduos de óleo dessas embarcações parecem ser os principais poluentes nesta área. Não há dados publicados quanto aos níveis de contaminantes nas proximidades deste bosque.

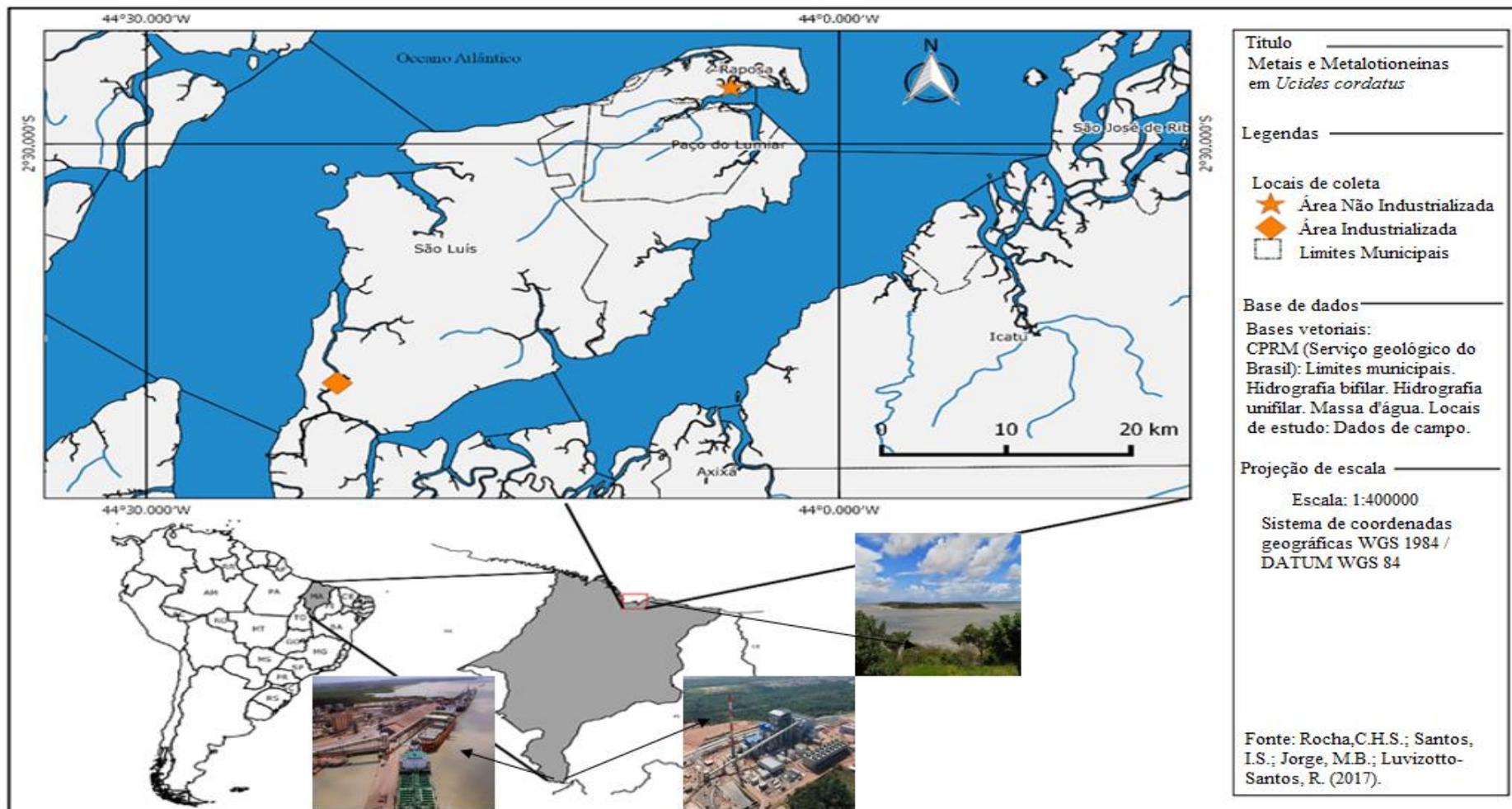


Figura 1. Localização geográfica das áreas de coleta.

2.2. Coleta dos Caranguejos

A coleta dos caranguejos foi feita em quatro campanhas amostrais, divididas em estação seca (outubro e dezembro de 2015) e estação chuvosa (março e maio de 2016), através da técnica do braceamento (Santa Fé e Araújo, 2013; Cortês et al., 2014). A caracterização sexual dos organismos foi obtida macroscopicamente tendo em vista que estes indivíduos adultos apresentam dimorfismo sexual evidente no abdômen (Amaral et al., 2014). Os indivíduos foram transportados em baldes contendo lama do local da coleta. Foram coletados 13 indivíduos por área/mês amostral, sendo obtidas, em laboratório, as medidas da largura e comprimento da carapaça, com o auxílio de um paquímetro digital e a massa úmida corporal determinada em uma balança digital (0,01g). O tecido hepatopancreático foi retirado com pinça de plástico e armazenado em tubos plásticos em ultrafrizer a -60°C até o momento das análises.

2.3. Análise de Metais

Toda vidraria e demais utensílios foram previamente lavados com detergente neutro (Extran, Merck), descontaminados com ácido nítrico (10 %, Merck) e posteriormente lavados com água deionizada. Os procedimentos de digestão e análises seguiram as normas EPA (2007). As amostras de tecido foram secas em estufa a 60°C até apresentar peso constante. Aproximadamente 0,1 g de tecido hepatopancreático foi pesado direto nos tubos de teflon em balança analítica de alta precisão. Foi adicionado 1 ml de ácido nítrico em cada um dos tubos os quais foram submetidos ao aquecimento de 200°C durante 20 minutos em forno micro-ondas digestor (Batch/Mars 6/CEM). Após a digestão, cada amostra foi transferida para tubos falcon de 50 mL e o volume ajustado a 30 mL com água deionizada. Todas as amostras foram filtradas com microfiltro de $0,45\ \mu\text{m}$. Procedimento idêntico foi realizado nos materiais de referência certificado Tort-3 (liofilizado de hepatopâncreas de crustáceos) e Dorm-4 (liofilizado de músculo de peixe).

As análises foram feitas em espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), em quatriplicata, utilizando a vista Axial, na condição 1 do plasma e tempo de exposição de 30s. Seis padrões analíticos foram utilizados para fazer as curvas de calibração, com concentrações que variaram de 0,001 a 1 ppm (m/v). As concentrações finais de metais foram expressas em $\mu\text{g/g}$.

2.4. Análise de Metalotioneínas

As concentrações de MTs foram medidas nas amostras de hepatopâncreas de acordo com a metodologia descrita por Viarengo et al. (1997), com adaptações: o tempo de centrifugação foi ajustado para 20.000 g por 90 minutos, durante a primeira centrifugação e 45 minutos para as demais; e o comprimento de onda foi ajustado de 415 para 405 nm.

Neste estudo amostras de 0,2 g de hepatopâncreas foram homogeneizadas em 2 mL de solução tampão contendo sacarose 500 mM, Tris-HCl 20 mM e mercaptoetanol 0,01 % com pH 8,6. Foi empregada uma solução padrão de GSH em diferentes concentrações (15, 30, 60, 90, 120, 240, 420 $\mu\text{mol GSH/L}$) para construir uma curva de calibração (Martins e Bianchini, 2009). A concentração de MT nos extratos foi medida por espectrofotometria utilizando-se o reagente -SH de Ellman (1959), (5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico ácido, DTNB). A concentração foi determinada em leitora de microplacas (Thermo Plate /Tp-reader) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de GSH/g de massa úmida}$.

2.5. Parâmetros Biométricos

A razão entre o peso (Hw) de cada indivíduo e a largura da carapaça (Cw) foi submetida à análise de regressão usando a função de potência ($y = ax^b$) e após transformação dos dados, foi usada a função logarítmica ($\ln y = \ln a + b \ln x$), em que x é a variável independente (Cw), y é a variável dependente (Hw), a é a interceptação (valor de y quando $x = 0$), e b é o coeficiente de inclinação da reta. Os tipos de crescimento foram verificados a partir do valor de b , sendo classificado em: isométrico ($b = 3$), positivo alométrico ($b > 3$) ou negativo alométrico ($b < 3$). O fator de condição ($K = \text{Hw}/\text{Cw}^b$), de acordo com Le Cren (1951), foi estimado para todos os indivíduos amostrados nas duas áreas e nos dois períodos.

2.6. Pluviometria

Os dados de pluviosidade foram obtidos através da estação da EMAP (Empresa Maranhense de Administração portuária) cujos sensores (modelo 370 Met One) estão localizados na latitude $2^{\circ}34'34.35''\text{S}$ e longitude $44^{\circ}21'58.53''\text{O}$. Utilizaram-se apenas as médias mensais referentes as respectivas campanhas amostrais. Os dados foram expressos em mm/mês.

2.7. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas na plataforma R versão 3.2.5 (R CORE TEAM, 2016). Com base na análise da normalidade na distribuição dos dados (Shapiro-Wilk) e a homocedasticidade das variâncias (Levene) (Faraway, 2002), as médias da concentração de MT por área e período foi feita a partir do teste *t* de student ($p < 0,05$) e a diferença entre as médias de MT por mês de coleta, área e pluviosidade, bem como as diferenças entre as médias de metais por área e meses amostrais foram determinadas através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Para determinar a relação entre as MTs e os metais e o quanto uma variável afeta a outra, utilizou-se o teste de correlação de Pearson.

Para verificar diferenças no fator de condição entre as áreas AI e ANI, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, em seguida foi utilizado o teste *a posteriori* de Dunn ($p < 0,05$) (Callegari-Jacques, 2003). Para verificar se houveram diferenças entre a massa e largura e comprimento da carapaça e entre os períodos de coleta, foi aplicado o teste *t* ($p < 0,05$).

2.8. Análise de Metais

A exatidão do método foi testada a partir das análises dos materiais de referência certificado Tort -3 para Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn e Dorm-4 para Al, utilizando-se o mesmo procedimento analítico empregado para as amostras. A tabela 1 apresenta a porcentagem de recuperação dos metais analisados.

Tabela 1. Porcentagem de recuperação dos metais analisados nos materiais de referência certificados.

| Metal | Al | Cd | Cr | Cu | Fe | Mn | Ni | Se | V | Zn |
|------------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|
| Recup. (%) | 99,8 | 86,2 | 100,6 | 103,5 | 94,1 | 84,6 | 90,6 | 89,7 | 89,0 | 93,5 |

3. Resultados

Dentre os 14 metais analisados neste estudo, observou-se que os metais que mais se acumularam nos hepatopancreas dos caranguejos foram $Fe > Zn > Cu > Mn > Ni > Al > Ba$ (Figura 2), ao passo que $Se > V > Pb > Cd > Cr > Sn > Sc$ apresentaram-se em menores concentrações (Figura 3). A concentração total (somatório) de metais nos caranguejos da AI ($102,73 \pm 47,74 \mu\text{g/g}$) foi maior que na ANI ($40,95 \pm 21,89 \mu\text{g/g}$), ($p < 0,05$). Além disso, no geral, as concentrações dos metais variaram mais na AI quando comparadas com ANI. Na AI os coeficientes de variação foram me média de 75,4% (outubro), 32,7% (dezembro), 123,3% (março), 52,8% (maio), enquanto que na ANI os coeficientes de variação foram de 50,3% (outubro), 41,7% (dezembro), 47,4% (março) e 36,9% (maio). Com relação à

variação espaço-temporal dos níveis dos metais Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Sc e Zn, houvera diferença significativa entre os pontos de coleta e o meses amostrados ($p < 0,05$). Para os caranguejos do bosque de mangue da ANI, as maiores concentrações de metais foram observadas no meses de dezembro e março com destaque para Fe com valor máximo de $412 \mu\text{g/g}$ (março) e Zn com valor máximo de $221 \mu\text{g/g}$ (dezembro). Os caranguejos da AI apresentaram maiores concentrações de metais durante os meses de outubro e março, com destaque para Fe com valor máximo de $1.275 \mu\text{g/g}$ (março) e Zn com $600 \mu\text{g/g}$ (março). Para ambas as áreas as menores concentrações apresentaram-se no mês de maio (figuras 2 e 3).

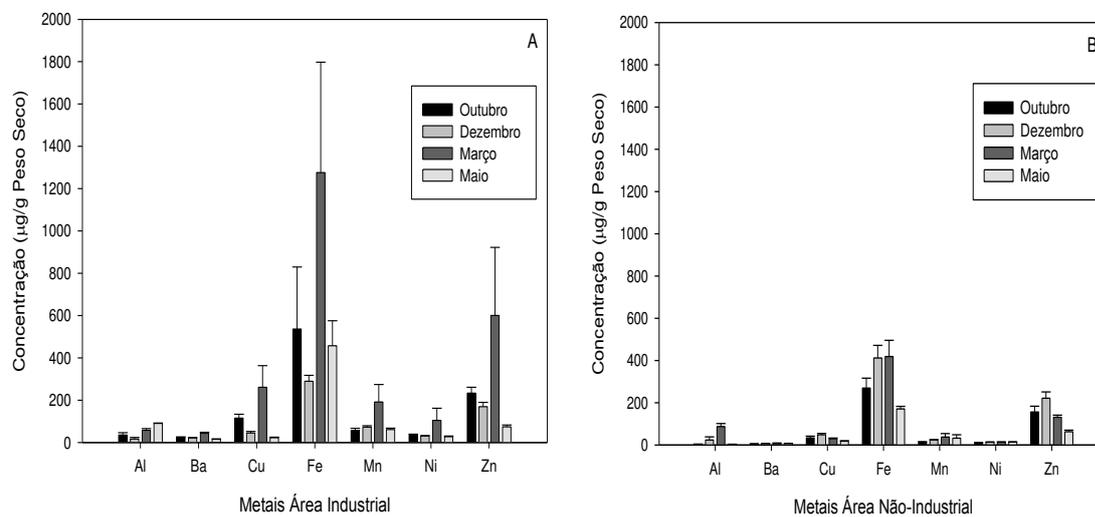


Figura 2: Metais encontrados em maiores concentrações no hepatopâncreas de *U. cordatus* na área industrializada (A) e não industrializada (B).

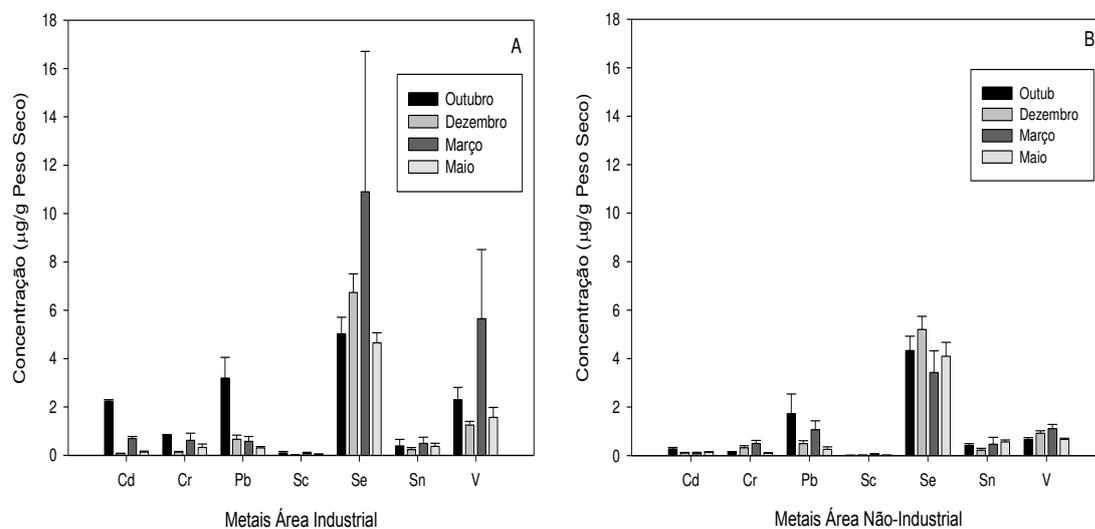


Figura 3: Metais encontrados em menores concentrações no hepatopâncreas de *U. cordatus* na área industrializada (A) e não industrializada (B).

Os níveis de MTs diferiram entre as áreas ($p < 0,05$), onde as maiores concentrações foram verificadas nos caranguejos da AI com média de $0,557 \mu\text{g/g}$ e menores para a ANI com média $0,228 \mu\text{g/g}$. Houve diferença significativa entre as estações climáticas ($p < 0,05$), sendo que a estação chuvosa apresentou maior concentração de MTs, com média de $0,5163 \mu\text{g/g}$, em comparação à média de MTs da estação seca, com valor de $0,2696 \mu\text{g/g}$. Da mesma forma, houve diferença significativa quanto aos meses da estação chuvosa ($p < 0,05$), sendo em março o maior valor destas proteínas com média de $0,9247 \mu\text{g/g}$ em comparação a maio quando os valores de MTs foram em média $0,1072 \mu\text{g/g}$.

Na estação seca não houve registro de chuvas na área e os níveis de MTs se mostraram baixos nos meses de outubro e dezembro. No entanto, a precipitação de 325 mm no mês de março (início da estação chuvosa) levou ao aumento da concentração do biomarcador, principalmente em AI, com posterior diminuição dos níveis de MTs quando o volume de chuvas baixou para 231,8 mm no mês de maio. A concentração dos metais na AI mostrou o mesmo padrão de resposta observado nas MTs durante as estações do ano e em função dos níveis pluviométricos (Figura 4) quando o início da estação chuvosa coincidiu com o aumento da concentração de metais (somatório) no tecido hepatopancreático dos caranguejos coletados. Vale ressaltar que os níveis de metais observados nos hepatopâncreas de *U. cordatus* na AI foram inferiores aos níveis máximos permitidos para crustáceos, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil, 2013).

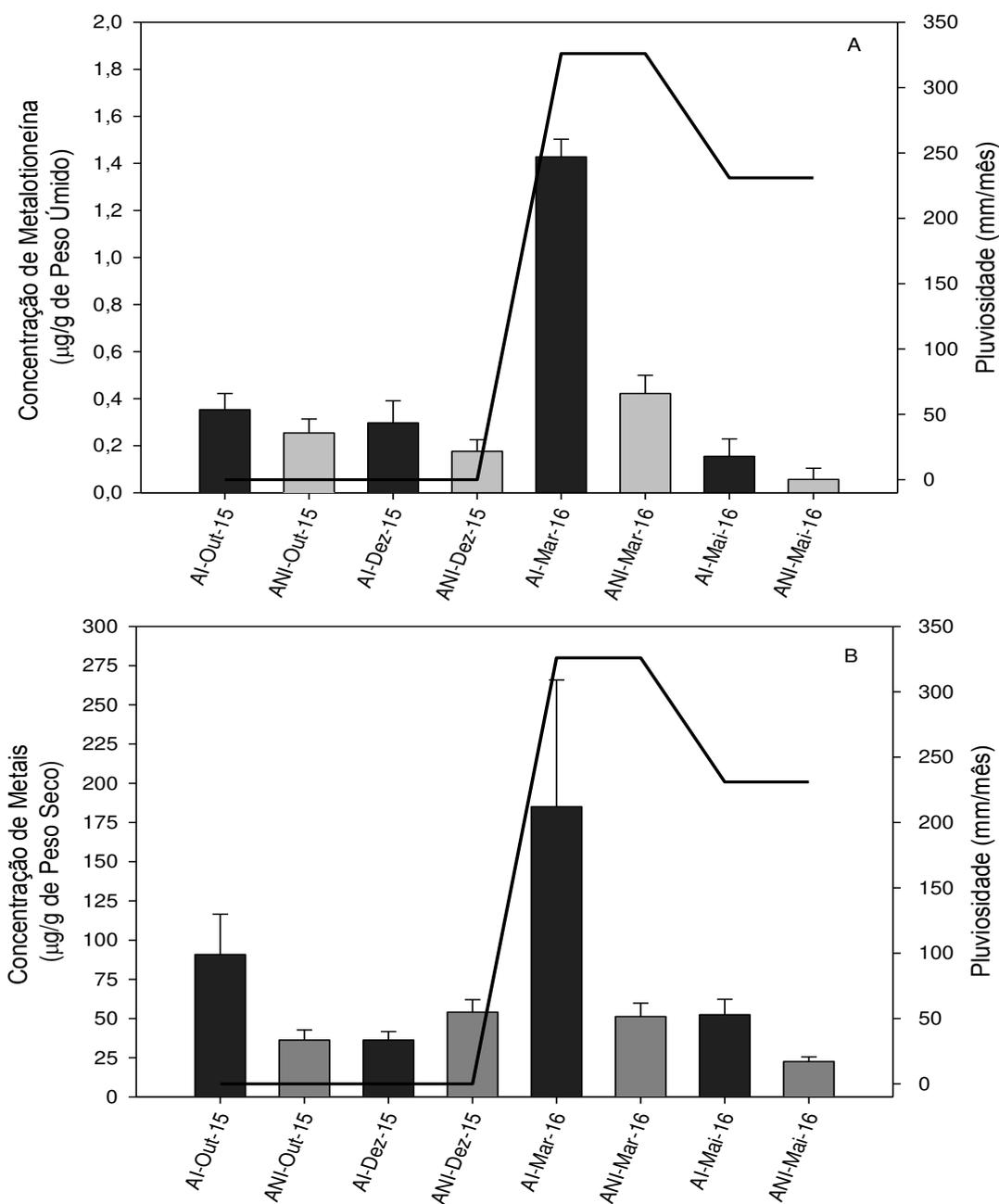


Figura 4: Média e erro padrão da concentração de metalotioneínas (A) e somatório dos metais (B) durante os meses de outubro (out) e dezembro (dez) (estação seca) e março (mar) e maio (mai) (estação chuvosa) na área industrializada (AI) e não industrializada (ANI).

Ao analisar as concentrações de MTs com os metais Fe, Zn, Cu e Mn, observou-se uma forte correlação (Tabela 2). Estes resultados sugerem que o aumento da concentração destes metais levou ao aumento da produção destas proteínas, comprovando sua função de reguladora destes elementos no hepatopâncreas.

Tabela 2. Coeficiente de correlação de Pearson (r), entre os metais e metalotioneínas em hepatopâncreas de *U. cordatus*.

| | Fe | Zn | Cu | Mn |
|----|------|------|------|------|
| MT | 0,89 | 0,95 | 0,94 | 0,93 |

Por outro lado, os indivíduos apresentaram diferenças significativas nesses três parâmetros entre as duas áreas, sendo que os caranguejos da ANI foram maiores ($p < 0,05$) que os indivíduos coletados na AI (Tabela 3). A única exceção foi o comprimento de carapaça em outubro cujos valores para as duas áreas foi semelhante ($p > 0,05$).

Tabela 3. Dados biométricos com os valores de média e erro padrão por período e local de coleta. Letras iguais indicam valores semelhantes ($p > 0,05$) do parâmetro biométrico. (Out = outubro; Dez = dezembro; Mar = março; Mai = maio; ANI = Área não industrializada; AI = Área industrializada).

| Mês/ano-Área | Massa úmida (g) | Largura (mm) | Comprimento (mm) |
|----------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Seco | | | |
| Out/15- ANI | 146,4 ± 10,1 ^a | 68,2 ± 1,8 ^a | 47,1 ± 1,8 ^a |
| Out/15- AI | 102,3 ± 5,4 ^b | 61,8 ± 1,6 ^b | 47,3 ± 1,1 ^a |
| Dez/15- ANI | 170,2 ± 8,2 ^a | 68,2 ± 1,1 ^a | 53,2 ± 0,8 ^a |
| Dez/15- AI | 81,8 ± 13,3 ^b | 60,2 ± 2,2 ^b | 45,3 ± 1,1 ^b |
| Chuvoso | | | |
| Mar/16- ANI | 149,6 ± 10,12 ^a | 69,6 ± 1,7 ^a | 51,6 ± 1,4 ^a |
| Mar/16- AI | 93,0 ± 10,4 ^b | 61,7 ± 1,8 ^b | 44,8 ± 1,8 ^b |
| Mai/16- ANI | 156,6 ± 10,6 ^a | 69,7 ± 1,5 ^a | 52,6 ± 1,3 ^a |
| Mai/16- AI | 112,7 ± 7,7 ^b | 64,2 ± 1,3 ^b | 47,5 ± 1,1 ^b |

Conforme apresentado na tabela 4, os caranguejos da ANI apresentaram crescimento alométrico negativo, ou seja, há incremento maior no peso em relação ao tamanho. Por outro lado, na AI foram observados dois tipos de crescimento, o alométrico negativo nos meses da estação seca e o alométrico positivo durante os meses de estação chuvosa, caracterizando, neste caso, maior incremento no tamanho desses animais em relação ao peso.

Tabela 4. Representação algébrica das retas e curvas de função potência da relação peso-comprimento para *U. cordatus*. R^2 = Coeficiente de determinação da regressão linear. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre áreas. Letras iguais com asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os meses de uma mesma área.

| Área | Meses | Reta | Curva | R^2 | Fator de condição |
|------|----------|----------------------------|------------------------|--------|---------------------------|
| ANI | Outubro | $\ln y = 4,6222 + 2,2736x$ | $y = 0,0098x^{2,2736}$ | 0,9233 | 0,009863667 ^a |
| AI | Outubro | $\ln y = 0,5416 + 1,2457x$ | $y = 0,5818x^{1,2457}$ | 0,3719 | 0,585927784 ^{b*} |
| ANI | Dezembro | $\ln y = 1,0788 + 0,9606x$ | $y = 2,9413x^{0,9606}$ | 0,4580 | 2,951210420 ^{a*} |
| AI | Dezembro | $\ln y = 4,5987 + 2,1660x$ | $y = 0,0101x^{2,1660}$ | 0,4931 | 0,010312516 ^b |
| ANI | Março | $\ln y = 1,6654 + 0,7848x$ | $y = 5,2879x^{0,7848}$ | 0,1732 | 5,348953473 ^{a*} |
| AI | Março | $\ln y = 8,1306 + 3,0574x$ | $y = 0,0003x^{3,0574}$ | 0,8918 | 0,000295731 ^b |
| ANI | Maio | $\ln y = 7,1452 + 2,8694x$ | $y = 0,0008x^{2,8694}$ | 0,8766 | 0,000790388 ^a |
| AI | Maio | $\ln y = 8,4630 + 3,1631x$ | $y = 0,0002x^{3,1631}$ | 0,9345 | 0,000211306 ^b |

Na ANI os caranguejos apresentaram maior fator de condição nos meses de dezembro e março, indicando melhor condição geral dos indivíduos, provavelmente em função dos parâmetros ambientais (bióticos e abióticos) ótimos nestes meses. Por outro lado, nos meses de outubro e maio apresentaram condições menos favoráveis aos caranguejos da ANI, uma vez que os valores para o fator de condição foram menores quando comparados aos demais meses.

Na AI o maior fator de condição observado foi no mês de outubro, sendo que no geral, os valores encontrados para os caranguejos desse bosque de mague sugerem condições ambientais desfavoráveis para a esta espécie durante todo o período amostral, quando comparados com os valores dos caranguejos de ANI.

De acordo com os coeficientes de determinação da regressão (R^2) (tabela 4), o incremento no peso foi diretamente relacionado ao crescimento em tamanho na ANI nos meses de outubro e maio, enquanto que na AI foi nos meses de março e maio.

4. Discussão

Um dos principais impactos causados no ecossistema manguezal está relacionado à poluição por efluentes domésticos e industriais, que influenciam diretamente a concentração de metais pesados no solo/sedimento (Sundaramanickam et al., 2016), bem como nas raízes e folhas de diferentes espécies de mangue (Qihang et al., 2014) sendo, esse material vegetal, parte integrante da dieta alimentar de *U. cordatus* (Nordhaus & Wolff, 2007). Quanto maior o aporte de contaminantes na área, maior o risco de assimilação pela biota. Neste sentido, espécies com baixa mobilidade acumulam maiores concentrações de metais (Chapman et al., 1998), onde o efeito de biomagnificação na cadeia trófica pode

levar ao acúmulo de xenobióticos nos organismos e interferir no crescimento destas espécies (Pinheiro et al., 2012).

Acredita-se que o maior acúmulo de metais no hepatopâncreas dos caranguejos na AI foi em decorrência dos elevados níveis de contaminação desse ambiente, como observado por Wu et al. (2014) ao estudar a presença de metais no solo e em plantas de manguezais devido ao descarte de resíduos industriais, e por Rumisha et al. (2016) que relacionaram a presença de metais em camarões com a urbanização e atividades industriais ao longo da costa, considerando que os sedimentos do mangue, os quais são ricos em argila e com altos teores de matéria orgânica, tem alta capacidade de reter metais, e portanto, tornando-os disponíveis aos animais detritívoros via alimentação. Os valores de Cd, Cu, Mn e Pb nesta área apresentaram valores expressivamente mais elevados quando comparados aos observados por Pinheiro et al. (2012) que também avaliaram a concentração de metais em hepatopâncreas e outros tecidos de *U. cordatus* em mangues de área industrializada na região sudeste do Brasil.

Considerando que a indução de MTs é dependente de metais (Sakulsak, 2012) e do estresse oxidativo promovido pela presença destes (HaQ et al., 2003), considerou-se que as MTs responderam ao acúmulo de metais no hepatopâncreas, indicando a assimilação desses metais do meio e consequente resposta fisiológica a fim de mediar os iminentes efeitos tóxicos destes elementos no organismo.

Khati (2012) também observaram em seus estudos sobre a resposta de MTs à contaminação por metais em mexilhão-marrom coletados em ambientes costeiros, uma relação entre a exposição aos metais e a indução de MTs corroborando a maior produção dessas proteínas nos indivíduos coletados próximo à área portuária/industrial. De fato, Szefer et al. (1999) observaram que mexilhões e ostras acumularam mais metais nos tecidos moles nas áreas mais contaminadas em comparação com áreas não industrializadas.

A concentração de metais, bem como a indução de MTs em *U. cordatus*, foram mais elevadas no início da estação chuvosa, sendo que, como observado por Giarratano et al. (2013), a área de coleta e os índices pluviométricos influenciaram fortemente a concentração de metais e MTs nos indivíduos. Lavraras et al. (2016) também encontraram valores de metais significativamente maiores em tecidos de mexilhões de áreas impactadas durante a estação chuvosa.

De acordo com Kargin (1996) e Britto et al. (2006) a estação do ano é um fator que influencia na acumulação de metais nos organismos vivos, e como descrito por Dunn

et al. (2007), o efeito da precipitação é maior em sistemas estuarinos impactados, corroborando com o observado no presente estudo.

Em contraposição ao que ocorre com organismos exclusivamente aquáticos, como observado por Marengoni et al. (2013) em seus estudos com mexilhões, em espécies semiterrestres, o início das chuvas aumenta o acúmulo de metais devido a remobilização dos metais presentes no solo e sedimentos. Isso ocorre porque a diminuição da salinidade com o aumento da pluviosidade, logo no início da estação chuvosa, provoca mudanças na força iônica do meio, aumentando a mobilidade dos metais (Acosta et al., 2011; Boulajfene et al., 2017), possibilitando que elementos retidos tornem-se disponíveis. Os padrões observados no presente estudo são semelhantes aos observados por Milazzo et al. (2014), ao analisar metais em moluscos bivalves estuarinos, quando observaram maiores valores durante a estação chuvosa, sugerindo que estariam relacionados à remobilização dos sedimentos. As maiores concentrações de Fe e Zn no hepatopâncreas de *U. cordatus*, bem como a influência sazonal nessas concentrações, também foram observadas por Araújo-Júnior et al. (2016), que relacionaram a dinâmica do Fe e disponibilidade de Zn com a distribuição biogeoquímica do solo, que por sua vez é influenciada pelas chuvas. Entretanto, o avanço da estação chuvosa levaria à maior diluição dos contaminantes na bacia de drenagem e no estuário pelo maior aporte hídrico fluvial, tornando esses elementos menos disponíveis para a biota, conforme demonstrado neste estudo.

Embora a ANI não contenha indústrias próximas e as moradias sejam relativamente distantes dos bosques onde ocorreram as coletas, a presença de metais nos caranguejos pode ser explicada pela geodiversidade do Maranhão. Segundo Feitosa (1996), nas formações superficiais das bacias de Barreirinhas e São Luís, existe uma predominância de sedimentos quaternários, sendo recorrentes os solos lateríticos (ricos em ferro e manganês). Estes sedimentos litoclásticos originados pelo intemperismo e erosão das rochas podem ser transportados para os ambientes litorâneos e marinhos concentrando-se no litoral. Na linha de costa, os minerais mais resistentes, conhecidos como "resistatos", são concentrados pelos agentes marinhos, que promovem a deposição na foz de rios, planícies costeiras, praias e plataforma continental interna (Silva et al., 2000), os quais podem servir de fonte de elementos metálicos na região estuarina. Além disso, as características oceanográficas da área, a saber, regime de macro marés, forte correnteza e padrões de recirculação, podem contribuir com a dispersão de contaminantes metálicos a partir das fontes pontuais e difusas da área industrial da Ilha do Maranhão (Miranda et al., 2002). De fato, Pacyna e Pacyna (2001) relatam que em locais remotos de todo o mundo,

muitas vezes as concentrações de metais são superiores às que se esperaria ocorrer naturalmente, devido ao transporte destes poluentes, podendo ocorrer tanto em escala local como global.

As análises biométricas mostram diferenças significativas entre o peso e o comprimento dos indivíduos nas duas áreas amostradas, sendo que os indivíduos da AI apresentaram tamanho e massa corporal significativamente menor quando comparados com indivíduos da ANI. Essas diferenças podem estar relacionadas ao estresse químico a que estes animais estão sujeitos considerando a proximidade das fontes de poluentes, conforme destacou Sousa (2009) quando relacionou a contaminação na baía de São Marcos com o complexo portuário e a toxicidade da água. Além disso, Souza et al., (2013) relataram que o expressivo número de moradias próximos à AI podem tornar o ambiente nocivo para a biota aquática e terrestre. Pesquisas realizadas em estuários de Pernambuco, mostraram que os caranguejos presentes em áreas mais impactadas eram menores em relação às áreas de baixo impacto (Castiglioni e Coelho, 2009). Resultados semelhantes foram encontrados por Araújo et al. (2012) ao observar que as taxas de crescimento de *U. cordatus* eram desiguais entre os manguezais que sofriam influência do desmatamento e da deposição de resíduos daqueles menos impactados.

De acordo com Moraes et al. (2015), essas diferenças nas taxas de crescimento podem ser resultado de mecanismos adaptativos das espécies para tolerar a baixa qualidade ambiental. Capparelli et al. (2016) alertam para a importância de estudos em invertebrados estuarinos expostos aos metais em seu habitat natural, considerando os ajustes bioquímicos e fisiológicos compensatórios frente às mudanças nos parâmetros ambientais. Acredita-se que, nessas situações de estresse ambiental, os caranguejos tendem a gastar mais energia para a manutenção da homeostase, conseqüentemente, a disponibilidade de energia para investir em outros processos fisiológicos é menor levando à maior assimetria corporal (Matheson e Gagnon, 2012; Lezcano et al., 2015).

Outro fator a ser considerado é o efeito da exploração comercial destes organismos, que pode interferir na densidade (Duarte et al., 2016) e no tamanho desses animais (Nascimento, 2017). Branco (1993) constatou valores mínimos de 53 mm e máximo de 96 mm de largura de carapaça em caranguejos no estado de Santa Catarina, sendo maiores que os da região nordeste. Segundo o autor, mesmo com condições climáticas favoráveis, a demanda pelo consumo é mais intensa na região nordeste e a exploração influencia o desenvolvimento dos indivíduos. O turismo também configura-se como um fator relevante na sobre-exploração desta espécie (Amaral et al., 2014). Desta

forma, os níveis de contaminação na baía de São Marcos atrelados à constante captura desta espécie, por se tratar de uma área de fácil acesso aos catadores, podem resultar nessas diferenças biométricas observadas, corroborando o menor valor do fator de condição dos caranguejos coletados na AI. Levando em consideração que o fator de condição fornece informações sobre o estado fisiológico dos animais e que indivíduos com maior massa para determinado comprimento estão em melhores condições (Duarte et al., 2016), este estudo indicou melhores condições para os caranguejos da área mais distante das fontes poluidoras.

Considerando o mês de coleta sobre o fator de condição dos indivíduos na AI, o maior valor foi observado em outubro e o menor em maio. No entanto, para a ANI, os maiores valores foram observados em março. Este período coincide com o final do período defeso destes animais, em que a coleta dos caranguejos é proibida devido ao período reprodutivo da espécie. Nos outros meses em que a exploração é permitida, o fator de condição foi menor nesta área, sugerindo a influência da captura nos parâmetros biométricos. Na AI, mesmo após o período do defeso, os caranguejos continuaram com menor valor do fator de condição, o que nos leva a acreditar que não é a exploração desta área o principal fator de pressão antrópica sobre o crescimento da espécie, mas sim a proximidade da fonte poluidora.

5. Conclusão

Caranguejos coletados nos bosques de manguezais próximos às áreas industrializadas da Ilha do Maranhão acumulam mais metais em comparação àqueles coletados em áreas distantes, refletindo o aporte de metais do ambiente oriundos de fontes poluidoras pontuais e difusas do entorno. No geral, estes caranguejos dos mangues de áreas mais impactadas apresentam menor tamanho e fator de condição devido ao estresse ao qual estão submetidos.

As variáveis ambientais relacionadas ao regime de chuvas da região influenciam tanto na disponibilidade como também no acúmulo de metais nos caranguejos. Fatores bióticos como o período reprodutivo também influenciam a biometria e no fator de condição de *U. cordatus*. Nas áreas de menor impacto, os indivíduos em melhores condições se apresentam logo após o período de defeso, enquanto que nas áreas mais impactadas isso não ocorre. O período em que os níveis de metais estão mais elevados coincide com o início do período chuvoso, principalmente nos caranguejos coletados nos bosques de mangue próximos às fontes poluidoras, entretanto, esses níveis observados nos

hepatopâncreas de *U. cordatus* estiveram abaixo dos limites máximos permitidos para crustáceos, segundo a legislação brasileira.

Agradecimentos. Os autores são gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudos, ao Laboratório Central Analítica e ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Peixes - CCBS e ao Laboratório de Automação Analítica - CCET da Universidade Federal do Maranhão pela infraestrutura cedida para o processamento das análises e ao Sr. Hudson Gomes Evangelista pelo apoio técnico. A Jamerson Aguiar e a Catarina Miranda pelo apoio nas análises dos dados. Todas as amostragens realizadas neste estudo foram realizadas de acordo com as leis estaduais e federais vigentes (ICMBio 14340-1).

6. Referências

- Acosta, J. A., Jansen, B., Kalbitz, K., Faz, A., Martínez-Martínez, S., 2011. Salinity increases mobility of heavy metals in soils. *Chemosphere*, 85:1318-1324.
- Alcântara, E. H., Santos, M. C. Mapeamento de áreas de sensibilidade ambiental ao derrame de óleo na região portuária do Itaqui, São Luís – MA – Brasil. Anais XII Simpósio Brasileiro de sensoriamento remoto, Goiânia, Brasil, 16-21 de abril de 2005, INPE, p. 3605-3617.
- Aly, W., Williams, I.D., Hudson, M.D., 2014. Limitations of metallothioneins in common cockles (*Cerastoderma edule*) and sponges (*Haliclona oculata*) as biomarkers of metal contamination in a semi-enclosed coastal area. *Science of the Total Environment*, 473 (474): 391–397.
- Amaral, K. D. S., Vieira, I. M., Osório, F. M., Rocha, J. D. M., Lima, J. F., 2014. Bioecology of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in mangroves influenced by the Amazon River, Brazil. *Acta Amazônica*, 44 (3): 213-222.
- Araújo Júnior, J.M., Ferreira, T.O., Suarez-Abelenda, M., Nóbrega, G.N., Albuquerque, A.G.B.B., Bezerra, A.C., Otero, X.L., 2016. The role of bioturbation by *Ucides cordatus* crab in the fractionation and bioavailability of trace metals in tropical semiarid mangroves. *Marine Pollution Bulletin*, 111: 194–202.
- Araújo, M.S.L.C., Castiglioni, D.S., Coelho, P.A., 2012. Width-weight relationship and condition factor of *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda, Ucididae) at tropical mangroves of Northeast Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, 102(3): 277-284.
- Barbieri, E., Passos, E.A., Garcia, C..A.B., Souza, K.A., Santos, D.B., 2010. Assessment of trace metal levels in catfish (*Cathorops spixii*) from Sal River Estuary, Aracaju, state of Sergipe, Northeastern Brazil. *Water Environment Research*, 82:2301-5.
- Beg, M.U., Al-Jandal, N., Al-Subiai, S., Karam, Q., Husain, S., Butt, S.A., Ali, A., Al-Hasan, E., Al-Dufaileej, S., Al-Husaini, M., 2015. Metallothionein, oxidative stress and trace metals in gills and liver of demersal and pelagic fish species from Kuwaits' marine area. *Marine Pollution Bulletin*, 100: 662–672.

- Birk, S., Bonne, W., Borja, A., Brucet, S., Courrat, A., Poikane, S., Solimini, A., Bund, W., V., Zampoukas, N., Hering, D., 2012. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators*, 18: 31–41.
- Boulajfene, W., Strogyloudi, E., Catsiki, V.A., El Mlayah, A., Tlig-Zouari, S., 2017. Bio-monitoring of metal impact on metallothioneins levels in the gastropod *Phorcus turbinatus* (Born, 1778) in the northeastern and the eastern coasts of Tunisia. *Marine Pollution Bulletin*, 120: 274–285.
- Branco, J.O., 1993. Aspectos bioecológicos do caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda) do manguezal do Itacorubi, Santa Catarina, BR. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 36 (1):133-148.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): RESOLUÇÃO - RDC N° 42, DE 29 DE AGOSTO DE 2013. <http://portal.anvisa.gov.br>
- Britto, F. P., Barletta, R., Mendonça, M., 2006. Regionalização sazonal e mensal da precipitação pluvial máxima no estado do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Climatologia*, 2:35–51.
- Buzzi, N.S., Marcovecchio, J.E., 2016. A baseline study of the metallothioneins induction and its reversibility in *Neohelice granulata* from the Bahía Blanca Estuary (Argentina). *Marine Pollution Bulletin*, 112: 452-458.
- Callegari-Jacques, S. 2003. Bioestatística, princípios e aplicações. Artmed: Porto Alegre. 254p.
- Capparelli, M.V., Abessa, D.M., Mcnamara, J.C., 2016. Effects of metal contamination in situ on osmoregulation and oxygen consumption in the mudflat fiddler crab *Uca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 185 (186):102–111.
- Carvalho, F.C., 2011. Gestão do território, lugar e conflitos socioambientais: o caso da usina termelétrica do Porto do Itaquí em São Luís- MA. (Dissertação).
- Castiglioni, D.S., Coelho, P. A., 2009. Determinação da maturidade sexual de *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura, Ucididae) em duas áreas de manguezal do litoral sul de Pernambuco, Brasil. *Iheringia, Série Zoolologia*, 101:1-2.
- Chagas, F.M., 2013. Dinâmica de ondas de areia na baía de São Marcos (Ponta da Madeira/MA): observações e modelagem numérica. (Dissertação).
- Christofoletti, R.A., 2005. Ecologia trófica do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Ocypodidae) e o fluxo de nutrientes em bosques de mangue, na região de Iguape (SP), (Tese).
- Cortês, L.H.O.; Zappes, C.A.; Di Benedito, A.P.M., 2014. Extração e cadeia produtiva do caranguejo-uçá no norte do Rio de Janeiro. *Boletim do Instituto de Pesca*, 40(4): 639 – 656.
- Duarte, L.F.A., Souza, C.A., Nobre, C.R., 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.
- Dunn, R. J. K., Teasdale, P. R., Warnken, J., Jordan, M. A., Arthur, J. M., 2007. Evaluation of the in situ, time integrated DGT technique by monitoring changes in heavy metal concentrations in estuarine waters. *Environmental Pollution*, 148: 213–220.

- Durkalec, M., Kolenda, E., Owczarek, T., Szkoda, J., Nawrocka, A., Grzegorzółka, J., Dzięgiel, P., Socha, P., Kołacz, R., Schierack, P., Żmudzki, J., Posyniak, A., 2017. Expression of metallothionein in the liver and kidneys of the red deer (*Cervus elaphus*L.) from an industrial metal smelting area of Poland. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137:121–129.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82:70-77.
- EMAP (Empresa Maranhense de Administração Portuária). Disponível em: <<http://www.portodoitaqui.ma.gov.br/usuarioexportador.asp>>. Acessado em 18/08/2017.
- Faraway, J. J. 2002. Practical regression and Anova using R, 212p. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/doc/contrib/Faraway-PRA.pdf>>.
- Feitosa, A.C., 1996. Dinâmica dos processos geomorfológicos da área costeira a nordeste da Ilha do Maranhão. Rio Claro. 249 p. (Tese)
- Fernandes, D., Bebianno, M.J., Porte, C., 2008. Hepatic levels of metal and metallothioneins in two commercial fish species of the Northern Iberian shelf. *Science of the Total Environment*, 391: 159–167.
- Gao, X.; Chen, C.T.,2012. Heavy metal pollution status in surface sediments of the coastal Bohai Bay. *Water Research*, 46(6):1901-11.
- Giarratano, E., Gil, M.N., Malanga, G., 2013. Assessment of antioxidant responses and trace metal accumulation by digestive gland of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* from Northern Patagonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92: 39 – 50.
- HaQ, F., Mahoney, M., Koropatinick, J., 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533: 211-226.
- Jerônimo, C.E., Balbino, C.P., 2012. Caracterização físico-química de efluentes da carcinicultura e seus impactos ao meio ambiente. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 8(8):1639-1650.
- Kagi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. In: Rierdan, J.F., Vallee, B.L. (Eds.), *Methods of Enzymology: Metallo biochemistry: Metallothionein and Related Molecules*. Academic Press, San Diego, pp. 613–626.
- Kargin, F., 1996. Seasonal changes in levels of heavy metals in tissues of *Mullus barbatus* and *Sparus aurata* collected from Iskenderun Gulf (Turkey). *Water, Air e Soil Pollution*, 90: 557-562.
- Khati, W., 2012. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use in biomonitoring. *Energy Procedia*, 18: 784– 794.
- Langston, W.J., Chesman, B.S., Burt, G.R., Hawkins, S.J., Readman, J., Worsfold, P., 2003. Site characterization of the South West European Marine sites—Poole harbour SPA. Plymouth marine science partnership on behalf of the environment agency and English nature.
- Lavraras, R.T., 2014. Metal, metallothionein and glutathione levels in blue crab (*Callinectes* sp.) specimens from southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107: 55–60.
- Lavraras, R.T., Rocha, R.C., Bordon, I.C., Saint’Pierre, T.D., Godoy, J.M., Hauser-Davis, R.A., 2016. Differential metallothionein, reduced glutathione and metal levels in *Perna*

perna mussels in two environmentally impacted tropical bays in southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 129: 75–84.

Le Cren, E.D., 1951. The length-Weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20 (2):201-219.

Lezcano, A. H., Quiroga, M. L. R., Liberoff, A. L., Molen, S. V. D., 2015. Marine pollution effects on the Southern surf crab *Ovalipes trimaculatus* (Crustacea: Brachyura: Polybiidae) in Patagonia Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, (91)2: 524-529.

Lima, G.V., Oshiro, L.M.Y., 2006. Crescimento somático do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) em laboratório. *Iheringia Série Zoologia*, 96(4):467-472.

Marengoni, N.G., Klosowski, E.S., Oliveira, K.P., Chambo, A.P.S., Gonçalves Junior, A.C., 2013. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu Binacional. *Química Nova*, 3:359-363.

Martins, C.M.G., Bianchini, A., 2009. Metallothionein-like proteins in the blue crab *Callinectes sapidus*: Effect of water salinity and ions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 152(3): 366–371.

Matheson, K., Gagnon, P., 2012. Effects of temperature, body size, and chela loss on competition for a limited food resource between indigenous rock crab (*Cancer irroratus* Say) and recently introduced green crab (*Carcinus maenas* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 428(1): 49-56.

Milazzo, A.D.D., Silva, A.C.M., Oliveira, D.A.F., Cruz, M.J.M., 2014. The influence of seasonality (dry and rainy) on the bioavailability and bioconcentration of metals in an estuarine zone. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 149:143-150.

Miranda, L.B.; Castro B.M., Kjerfve B., 2002. Princípios de oceanografia física de estuários. EDUSP, São Paulo, 414 pp.

Moraes, E.E.B., Nunes Maia, 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, Brazil. *Nauplius*, 23(1):59-71.

Nascimento, D.M., Alves.R.R.N, Barboza, R.R.D., Schmidt, A.J., Diele, K., Mourão, J.S., 2017. Commercial relationships between intermediaries and harvesters of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) in the Mamanguape River estuary, Brazil, and their socio-ecological implications. *Ecological Economics*, 131:44–51.

Nordhaus, I., Wolff, M., 2007. Feeding ecology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae): food choice, food quality and assimilation efficiency. *Marine Biology*, 151:1665-1681.

Pacyna, J.M., Pacyna, E.G., 2001. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews*, 9(4): 269–298.

Pinheiro, M.A.A., Fiscarelli, A.G., Hattori, G.Y., 2005. Growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). *Journal of Crustacean Biology*, 25: 293–301.

Pinheiro, M.A.A., Santos, L.C.M., Souza, C.A., João, M.C.A., Dias-Neto, J., Ivo, C.T.C., 2016. Avaliação do Caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Ucididae). Cap. 33: p. 441-458. In: Pinheiro, M. & Boos, H. (Org.). Livro Vermelho dos

Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014. Porto Alegre, RS, Sociedade Brasileira de Carcinologia - SBC, 466 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). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81: 114–121.

Qihang, W.U., Tam, N.F.Y., Leung, J.Y.S., Zhou, X., FU, J., Yao, B., Huang, X., Xia, L., 2014. Ecological risk and pollution history of heavy metals in Nansha mangrove, South China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104:143–151.

R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria URL <http://www.R-project.org/>.

Rodrigues, M.A., D’Incao, F., 2015. Abundância e relações biométricas de *Rhithropanopeus harrisi* no estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (Nova Série)*, 37(2):219-232.

Rumisha, C., Mdegela, R.H., Kochzius, M., Leermakers, M., Elskens, M., 2016. Trace metals in the giant tiger prawn *Penaeus monodon* and mangrove sediments of the Tanzania coast: Is there a risk to marine fauna and public health? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132: 77–86.

Sakulsak, N., 2012. Metallothionein: an overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *International Journal of Morphology*, 30: 1007–1012.

Santa Fé, U.M.G., Araújo, A.R.R., 2013. Seletividade e Eficiência das Artes de Pesca Utilizadas na Captura de *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763), Sergipe, Brasil. *Actapesca1*, 1(1): 29 - 44.

Silva, C G., Figueiredo Jr., A G., Brehme, I., 2000. Granulados litoclásticos. *Revista Brasileira de Geofísica* 18(3): 319-326.

Sousa, J. K. C. 2009. Avaliação de impactos ambientais causados por metais-traço em água, sedimento e material biológico na Baía de São Marcos, São Luís–Maranhão. João Pessoa-PB-Brasil (Tese).

Souza, I.C., Duarte, I.D., Pimentel, N.Q., Rocha, L.D., Morosesk, M., Bonomo, M.M., Azevedo, V.C., Pereira, C.D.S., Monferrán, M.V., Milanez, C.R.D., Matsumoto, S., Wunderlin, D.A., Fernandes, M.N., 2013. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environmental Pollution*, 180:136–144.

Sundaramanickam, A., Shanmugan, N., Cholan, S., Kumaresan, S., Madeswaran, P., Balasubramanian, T., 2016. Spatial variability of heavy metals in estuarine, mangrove and coastal ecosystems along Parangipettai, Southeast coast of India. *Environmental Pollution*, 218:186-195.

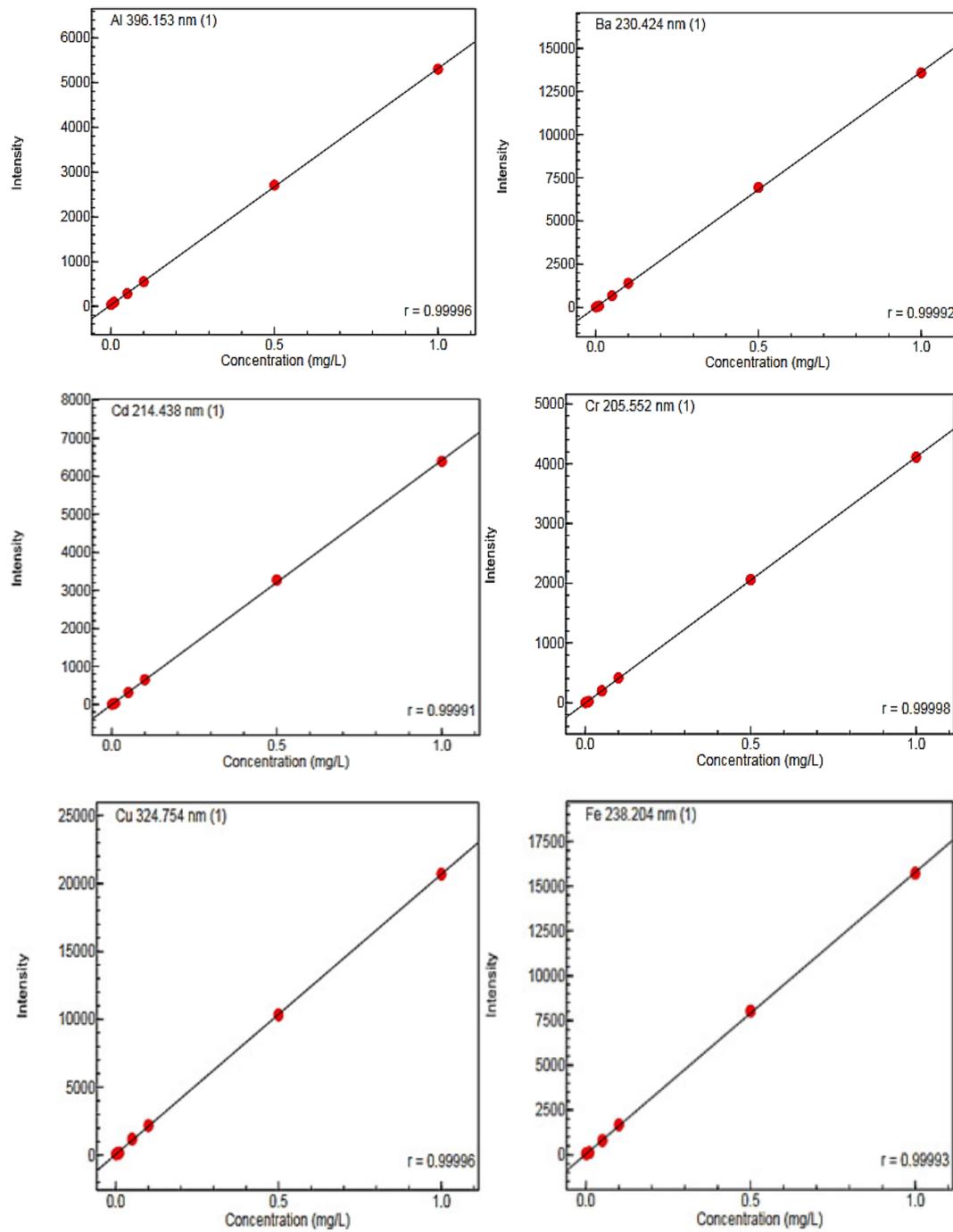
Szefer, P., Ikuta, K., Frelek, K., Zdrojewska, I., Nabrzyski, M., 1999. Mercury and other trace metals Ag, Cr, Co, and Ni in soft tissue and byssus of *Mytilus edulis* from the East Coast of Kyushu Island, Japan. *The Science of the Total Environment*, 229:227-234.

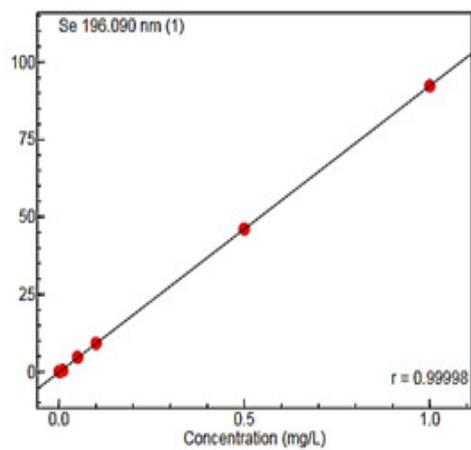
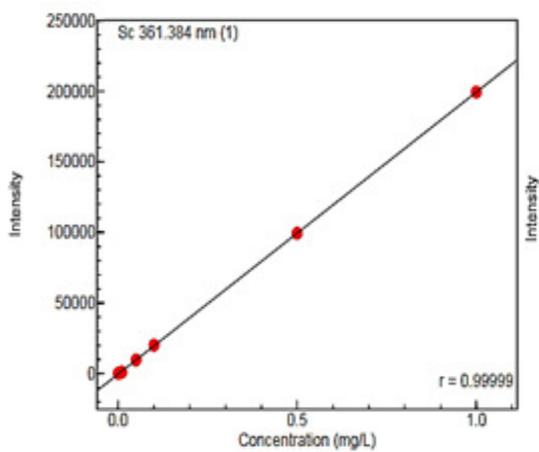
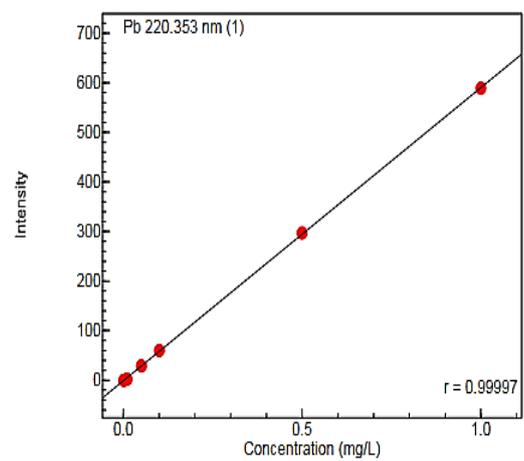
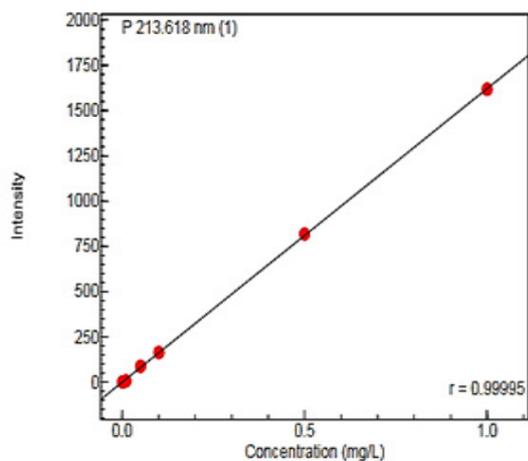
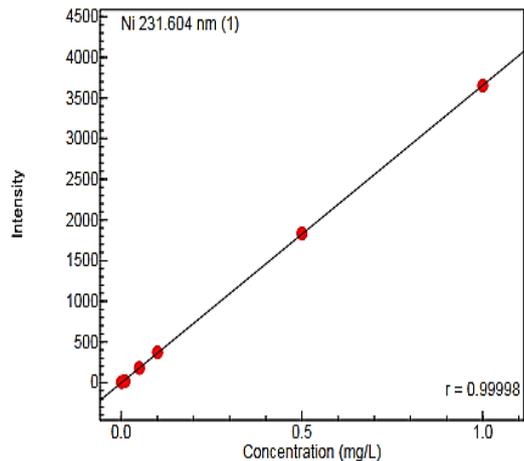
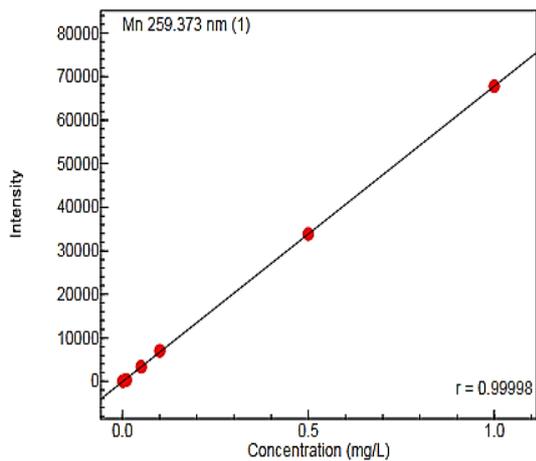
Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.

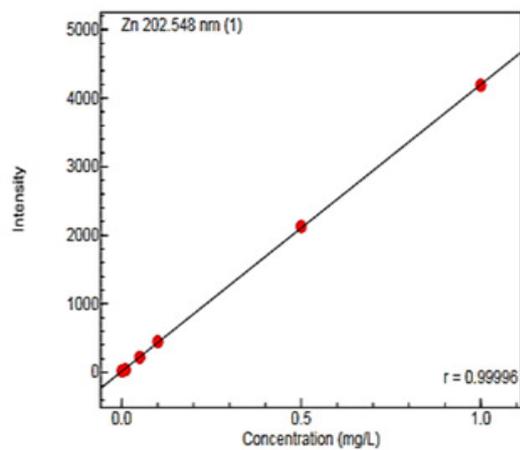
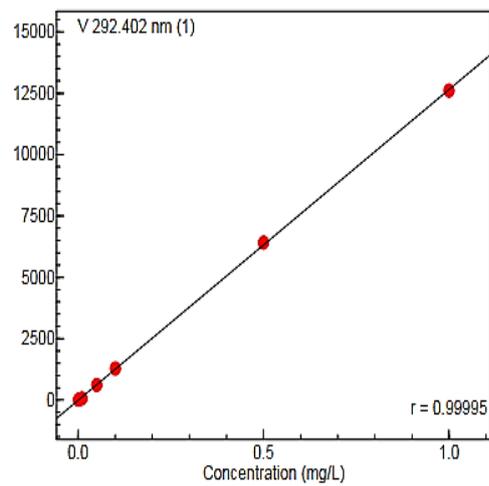
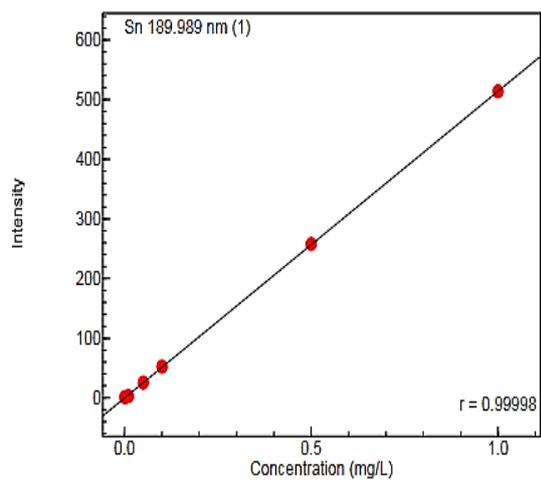
Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44(1): 69-84.

Wu, Q., Tam, N.F.Y., Leung, J.Y.S., Zhou, X., Fu, J., Yao, B., Huang, X., Xia, L., 2014. Ecological risk and pollution history of heavy metals in Nansha Mangrove, South China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104: 143–151.

ANEXO I. Curva de calibração dos metais analisados por ICP-OES.







ANEXO II. Análises dos materiais de referência certificado.

| | Dorm-4 | Branco | Dorm * | Dorm ** | Dorm *** | |
|----|--------|--------|--------|---------|----------|----------|
| | ug/L | ug/L | ug/L | ug/g | ug/g | Recuper. |
| Al | 4260 | 0,8 | 4259,2 | 1277,8 | 1280 | 99,8% |
| | Tort-3 | Branco | Tort * | Tort ** | Tort *** | |
| | ug/L | ug/L | ug/L | ug/g | ug/g | Recuper. |
| Cd | 158 | 0,5 | 157,5 | 36,4 | 42,3 | 86,2% |
| Cr | 8,5 | 1,2 | 7,3 | 1,96 | 1,95 | 100,5% |
| Cu | 2230 | 2,1 | 2227,9 | 514,62 | 497 | 103,5% |
| Fe | 730 | 12,9 | 717,1 | 168,462 | 179 | 94,1% |
| Mn | 57,2 | 1,2 | 56 | 13,2 | 15,6 | 84,6% |
| Ni | 20,8 | 1,9 | 18,9 | 4,8 | 5,3 | 90,6% |
| Se | 32,6 | | 32,6 | 9,78 | 10,9 | 89,7% |
| V | 35,1 | 1,4 | 33,7 | 8,1 | 9,1 | 89,0% |
| Zn | 550,0 | 17,2 | 532,8 | 126,92 | 136 | 93,3% |

* Concentração da amostra - concentração do branco

** Analisado

*** valor tabelado

ANEXO III. Concentração ($\mu\text{g/g}$) de metais analisados por indivíduos em cada uma das áreas amostradas.

OUTUBRO/AI

| Elemento | Amostra2 | Amostra5 | Amostra7 | Amostr10 | Amostr11 | Amostr12 | Amostr13 | Amostr14 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Al | 3324,8 | 8,64 | 32,76 | 72,96 | 16,8 | 72,96 | < LD | 7,5 |
| Ba | 22,575 | 17,58 | 34,02 | 17,91 | 26,34 | 15,84 | 36,2143 | 23,9455 |
| Cd | 0,55 | 14,58 | 0,54 | 0,66 | 0,54 | 0,6 | 0,17143 | 0,27273 |
| Co | < LD |
| Cr | 4,15 | 1,26 | 0,09 | 0,48 | 0,18 | 0,27 | 0,08571 | 0,19091 |
| Cu | 148,975 | 132,54 | 61,17 | 129,57 | 15,6 | 129,27 | 170,529 | 136,609 |
| Fe | 2771,78 | 820,26 | 291,93 | 464,13 | 231,66 | 782,13 | 319,329 | 844,664 |
| Mn | 72,725 | 48,96 | 68,37 | 52,77 | 89,34 | < LD | 47,1 | 79,0636 |
| Ni | 28,525 | 48,48 | 45,93 | 25,2 | 35,46 | 21,3 | 51,4714 | 27,5727 |
| P | 147,175 | 135,42 | 63,21 | 125,61 | 20,88 | 133,11 | 170,443 | 143,645 |
| Pb | 2,925 | 7,74 | 3,84 | 4,89 | 1,08 | 3,66 | 1,02857 | 0,40909 |
| Sb | < LD |
| Sc | 0,525 | 0,06 | 0,06 | 0,03 | 0,06 | 0,06 | < LD | 0,02727 |
| Se | 3,35 | 8,88 | 3,42 | 4,02 | 3,72 | 6,3 | 6,38571 | 4,03636 |
| Sn | | 2,16 | 0,36 | 0,33 | 0,06 | 0,18 | < LD | < LD |
| V | 5,7 | 1,38 | 2,19 | 2,04 | 1,62 | 2,28 | 1,15714 | 2,04545 |
| Zn | 270,75 | 228,6 | 184,5 | 230,4 | 115,2 | 381,9 | 268,714 | 190,091 |

OUTUBRO/ANI

| Elemento | Amost1R | Amost2R | Amost3R | Amost4R | Amost5R | Amost6R | Amost8R | Amost9R |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Al | < LD | < LD | 0,72 | 11,5 | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Ba | 3,84545 | 4,74545 | 4,53 | 3,1 | 6,70714 | 4,88182 | 9,9 | 3,92 |
| Cd | 0,24545 | 0,40909 | 0,24 | 0,63333 | 0,25714 | 0,16364 | 0,02727 | 0,2 |
| Co | < LD |
| Cr | 0,21818 | 0,13636 | < LD | < LD | 0,10714 | 0,3 | 0,24545 | < LD |
| Cu | 31,8818 | 35,4273 | 85,17 | 29,1333 | 35,3357 | 16,8273 | 17,3455 | 17,6 |
| Fe | 296,482 | 460,118 | 467,13 | 164,367 | 282,236 | 154,118 | 154,936 | 178,62 |
| Mn | 16,8818 | 15,9818 | 20,61 | 10,7333 | 13,5429 | 12,0545 | 13,2818 | 9,82 |
| Ni | 11,7818 | 11,6455 | 11,85 | 6,66667 | 15,6214 | 11,5636 | 9,87273 | 5,98 |
| P | 39,4636 | 44,6455 | 90,81 | 34,9 | 42,3643 | 26,1273 | 23,3455 | 26,74 |
| Pb | 0,38182 | 1,90909 | 0,27 | 7,06667 | 1,73571 | 1,82727 | 0,51818 | 0,14 |
| Sb | < LD |
| Sc | 0,02727 | 0,02727 | 0,03 | < LD | < LD | 0,02727 | < LD | 0,02 |
| Se | 4,88182 | 2,94545 | 7,38 | 2,63333 | 5,35714 | 5,31818 | 3 | 3,12 |
| Sn | 0,40909 | 0,70909 | 0,12 | 0,6 | 0,19286 | 0,38182 | 0,57273 | 0,36 |
| V | 0,98182 | 0,65455 | 0,99 | 0,4 | 0,72857 | 0,49091 | 0,62727 | 0,4 |
| Zn | 248,727 | 177,545 | 250,2 | 71 | 219,214 | 98,1818 | 105,818 | 77,2 |

DEZEMBRO/AI

| Elemento | Amostra4 | Amostra6 | Amostra7 | Amostra8 | Amostra9 | Amost10 | Amost11 | Amost13 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|
| Al | 10,35 | 4,9875 | < LD | 38,88 | < LD | 21,63 | 57,66 | < LD |
| Ba | 19,56 | 25,875 | 23,9727 | 22,14 | 24,68 | 19,56 | 25,14 | 13,5545 |
| Cd | < LD | 0,075 | 0,02727 | 0,06 | 0,08 | 0,12 | 0,18 | 0,02727 |
| Co | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Cr | 0,12 | 0,1125 | 0,19091 | 0,24 | 0,04 | 0,15 | 0,18 | 0,08182 |
| Cu | 42,87 | 93,3375 | 44,7 | 32,46 | 34,58 | 28,53 | 56,37 | 25,6364 |
| Fe | 282,93 | 415,163 | 269,209 | 373,86 | 199,42 | 278,43 | 311,13 | 185,755 |
| Mn | 80,07 | 83,2125 | 52,0636 | 45,3 | 91,78 | 86,37 | 53,97 | 90,7909 |
| Ni | 29,43 | 26,775 | 31,6636 | 26,1 | 33,02 | 29,73 | 44,43 | 26,7545 |
| P | 48,51 | 94,7625 | 51,7364 | 42,42 | 40,34 | 35,01 | 62,91 | 33,7364 |
| Pb | 1,11 | 0,975 | 1,33636 | 0,96 | 0,08 | 0,33 | 0,33 | 0,21818 |
| Sb | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Sc | 0,03 | 0,0375 | < LD | < LD | 0,02 | 0,03 | 0,03 | 0,02727 |
| Se | 5,25 | 8,0625 | 7,00909 | 11,4 | 4,82 | 6,24 | 6,27 | 4,82727 |
| Sn | 0,24 | < LD | 0,08182 | 0,6 | < LD | 0,09 | 0,51 | 0,38182 |
| V | 1,14 | 1,8375 | 0,76364 | 0,66 | 1,72 | 1,65 | 1,14 | 1,11818 |
| Zn | 141 | 180,75 | 241,909 | 252 | 119 | 148,5 | 183 | 87,2727 |

DEZEMBRO/ANI

| Elemento | Amost1R | Amost2R | Amost3R | Amost4R | Amost5R | Amost6R | Amost7R | Amost8R |
|----------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|
| Al | < LD | 36,6 | 119,76 | < LD | 11,375 | 19,6364 | < LD | 0,96 |
| Ba | 4,44 | 9,24545 | 6,27 | 8,030769 | 5,65 | 8,75455 | 5,44286 | 6,72 |
| Cd | < LD | 0,16364 | 0,21 | 0,023077 | 0,1 | 0,05455 | 0,12857 | 0,15 |
| Co | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Cr | 0,21 | 0,73636 | 0,66 | 0,207692 | 0,225 | 0,24545 | 0,17143 | 0,15 |
| Cu | 18,21 | 65,9727 | 53,97 | 57,43846 | 38,975 | 29,4273 | 50,9571 | 70,47 |
| Fe | 144,33 | 618,3 | 608,13 | 391,6385 | 366,775 | 541,936 | 371,614 | 254,13 |
| Mn | 31,77 | 21,7091 | 23,01 | 22,10769 | 20,475 | 20,0182 | 26,5286 | 25,65 |
| Ni | 10,74 | 15,2455 | 12,24 | 13,61538 | 11,65 | 15,1091 | 11,0571 | 16,26 |
| P | 25,65 | 69,7364 | 58,41 | 64,08462 | 45,175 | 36,1909 | 62,4429 | 72,21 |
| Pb | 0,45 | 0,21818 | 1,02 | #VALOR! | 0,55 | 0,43636 | 0,94286 | 0,3 |
| Sb | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Sc | < LD | 0,02727 | 0,03 | < LD | 0,025 | 0,02727 | 0,04286 | 0,03 |
| Se | 6,69 | 5,15455 | 4,77 | 7,038462 | 5,25 | 2,89091 | 3,3 | 6,54 |
| Sn | 0,27 | 0,6 | < LD | 0,023077 | < LD | 0,3 | 0,17143 | 0,42 |
| V | 0,45 | 1,03636 | 1,2 | 0,553846 | 1 | 0,9 | 1,32857 | 0,9 |
| Zn | 91,8 | 205,909 | 393,9 | 224,0769 | 202,75 | 192,273 | 250,714 | 210,9 |

MARÇO/AI

| Elemento | Amostra1 | Amostra2 | Amostra3 | Amostra4 | Amostra5 | Amostra6 | Amostra7 | Amostra8 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Al | 2,724 | 246,2 | < LD | < LD | 43,26 | 49,86 | 58,5 | 60,36 |
| Ba | 2,037 | 46,6 | 17,7 | 19,5 | 14,13 | 14,31 | 210,6 | 24,24 |
| Cd | 0,024 | 0,8 | 0,18 | 0,27 | 0,33 | 0,36 | 3,3 | 0,3 |
| Co | < LD |
| Cr | 0,036 | 1,3 | 0,27 | 0,3 | 0,12 | 0,21 | 2,4 | 0,36 |
| Cu | 11,247 | 347,9 | 200,07 | 132,27 | 146,97 | 242,07 | 929,7 | 77,97 |
| Fe | 53,313 | 3257,1 | 371,13 | 323,13 | 524,13 | 968,13 | 3951,3 | 758,13 |
| Mn | 8,667 | 448,9 | 76,77 | 86,67 | 77,37 | 63,27 | 659,7 | 110,97 |
| Ni | 3,333 | 160,1 | 35,13 | 50,73 | 42,63 | 29,19 | 486,3 | 29,04 |
| P | 11,151 | 353,7 | 194,91 | 132,81 | 146,31 | 234,21 | 938,1 | 80,31 |
| Pb | 0,03 | 1 | 0,18 | 0,03 | 0,33 | 1,17 | 1,5 | 0,39 |
| Sb | < LD |
| Sc | 0,006 | 0,2 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,3 | 0,06 |
| Se | 0,534 | 13,9 | 4,68 | 2,79 | 4,44 | 6,42 | 50,4 | 4,05 |
| Sn | < LD | < LD | 0,36 | 0,3 | 0,45 | 0,54 | 2,1 | 0,21 |
| V | 0,462 | 11,5 | 1,95 | 1,17 | 1,47 | 1,68 | 23,7 | 3,27 |
| Zn | 25,98 | 864 | 248,4 | 231,3 | 168,6 | 281,1 | 2772 | 210,9 |

MARÇO/ANI

| Elemento | Amost1R | Amost2R | Amost3R | Amost4R | Amost5R | Amost6R | Amost7R | Amost8R |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Al | 177,6 | < LD | 228,66 | 142,56 | < LD | < LD | 147,66 | < LD |
| Ba | 9,81818 | 7,74545 | 9,36 | 9,3 | 7,08 | 5,16 | 11,82 | 4,08 |
| Cd | 0,27273 | 0,16364 | 0,21 | 0,15 | < LD | 0,06 | < LD | < LD |
| Co | < LD |
| Cr | 1,09091 | 0,21818 | 0,54 | 0,78 | 0,12 | 0,33 | 0,75 | 0,18 |
| Cu | 26,9727 | 27,2455 | 31,17 | 46,17 | 35,67 | 29,97 | 25,35 | 14,4 |
| Fe | 492,845 | 204,573 | 494,13 | 737,13 | 196,83 | 305,13 | 689,13 | 231,33 |
| Mn | 26,6182 | 31,8818 | 21,51 | 26,16 | 29,97 | 20,01 | < LD | 145,47 |
| Ni | 18,6545 | 17,7545 | 16,11 | 15,09 | 19,32 | 12,63 | < LD | 6,24 |
| P | 43,0091 | 32,6455 | 39,81 | 60,51 | 50,61 | 43,11 | < LD | 21,51 |
| Pb | 0,08182 | 0,51818 | 0,84 | 0,12 | 0,96 | 2,43 | 0,69 | 2,88 |
| Sb | < LD | 0 | < LD |
| Sc | 0,08182 | 0,02727 | 0,09 | 0,06 | 0,03 | 0,03 | 0,12 | 0,06 |
| Se | 2,07273 | 3,54545 | 0,72 | 1,62 | 6,93 | 4,11 | 7,23 | 1,2 |
| Sn | 0,70909 | 0,08182 | 0,24 | 0,3 | < LD | 0,18 | < LD | 2,22 |
| V | 1,47273 | 0,98182 | 1,41 | 1,02 | 0,63 | 1,2 | 1,86 | 0,27 |
| Zn | 106,364 | 100,091 | 174,6 | 156,9 | 131,4 | 156,6 | 128,1 | 95,1 |

MAIO/AI

| Elemento | Amostra1 | Amostra2 | Amostra3 | Amostra4 | Amostra5 | Amostra6 | Amostra7 | Amostra8 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Al | < LD | < LD | 365,76 | < LD | < LD | < LD | 356,76 | < LD |
| Ba | 8,7 | 14,49 | 18,51 | 15,93 | 6,73636 | 19,26 | 21,36 | 19,1182 |
| Cd | 0,03 | 0,06 | 0,15 | 0,06 | 0,24545 | 0,12 | 0,27 | 0,19091 |
| Co | < LD |
| Cr | 0,03 | 0,21 | 0,96 | 0,15 | 0,13636 | 0,06 | 0,96 | 0,10909 |
| Cu | 17,07 | 27,09 | 27,3 | 26,01 | 33,2455 | 16,17 | 16,02 | 20,5909 |
| Fe | 186,33 | 377,13 | 662,13 | 494,13 | 257,755 | 210,33 | 1184,13 | 288,3 |
| Mn | 38,07 | 76,47 | 80,07 | 71,97 | 43,6091 | 39,87 | 83,37 | 55,8818 |
| Ni | 17,13 | 32,13 | 36,03 | 33,93 | 13,8273 | 22,89 | 38,13 | 25,8273 |
| P | 24,93 | 33,81 | 35,91 | 33,51 | 39,4636 | 24,9 | 23,07 | 31,8273 |
| Pb | 0,27 | < LD | 0,39 | 0,54 | 0,05455 | 0,36 | 0,27 | 0,3 |
| Sb | < LD |
| Sc | < LD | 0,03 | 0,12 | 0,03 | < LD | 0,03 | 0,12 | < LD |
| Se | 4,02 | 4,71 | 4,71 | 6,48 | 2,75455 | 5,55 | 5,37 | 3,65455 |
| Sn | 0,45 | 0,09 | 0,21 | 1,11 | 0,46364 | 0,66 | < LD | < LD |
| V | 0,36 | 2,34 | 2,01 | 2,25 | 0,27273 | 0,84 | 3,63 | 0,84545 |
| Zn | 36,3 | 71,4 | 117,6 | 93 | 42,5455 | 69,9 | 89,7 | 69,2727 |

MAIO/ANI

| Elemento | Amost1R | Amost2R | Amost3R | Amost4R | Amost5R | Amost6R | Amost7R | Amost8R |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Al | < LD | 14,04 |
| Ba | 6,09 | 5,73 | 6,99 | 8,97273 | 11,2091 | 8,56875 | 3,925 | 6,99 |
| Cd | 0,09 | 0,09 | 0,18 | 0,19091 | 0,10909 | 0,05625 | 0,225 | 0,15 |
| Co | < LD |
| Cr | 0,03 | 0,09 | 0,06 | 0,02727 | 0,13636 | 0,13125 | < LD | 0,27 |
| Cu | 23,88 | 27,42 | 13,89 | 13,9364 | 16,0364 | 19,4813 | 13,35 | 14,7 |
| Fe | 157,53 | 160,23 | 160,23 | 232,391 | 166,936 | 185,081 | 110,025 | 191,73 |
| Mn | 148,77 | 21,03 | 13,44 | 17,7273 | 12,9 | 10,2938 | 14,475 | 16,92 |
| Ni | 12,69 | 15,57 | 11,34 | 16,3636 | 14,5364 | 16,7625 | 8,25 | 13,62 |
| P | 32,61 | 35,91 | 22,26 | 23,8364 | 24,6 | 27,8813 | 22,525 | 22,47 |
| Pb | < LD | 0,48 | < LD | 0,21818 | 0,87273 | 0,24375 | 0,175 | 0,06 |
| Sb | < LD |
| Sc | 0,03 | 0,03 | < LD | 0,02727 | 0,02727 | 0,01875 | < LD | 0,03 |
| Se | 1,74 | 4,35 | 2,28 | 5,86364 | 6,24545 | 4,9875 | 4,225 | 3,06 |
| Sn | 0,51 | 0,93 | 0,69 | 0,46364 | 0,32727 | 0,31875 | 0,45 | 0,81 |
| V | 0,6 | 0,75 | 0,51 | 0,62727 | 0,84545 | 0,825 | 0,525 | 0,66 |
| Zn | 58,5 | 99,9 | 46,8 | 51,2727 | 86,4545 | 43,5 | 59,5 | 57,3 |