



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

**MODULAÇÃO NATURAL DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
DUAS ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS COM POTENCIAL PARA  
BIOMONITORAMENTO**

Carla Carolina Miranda dos Santos

BELÉM-PA  
2018

CARLA CAROLINA MIRANDA DOS SANTOS

**MODULAÇÃO NATURAL DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DUAS  
ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS COM POTENCIAL PARA BIOMONITORAMENTO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Lund Amado (UFPA)

Co-orientador: Prof. Dr. Cléverson Rannieri Meira dos Santos (MPEG)

BELÉM-PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M672m                      Miranda dos Santos, Carla Carolina  
Modulação natural de biomarcadores de estresse oxidativo em duas espécies de invertebrados com potencial para biomonitoramento / Carla Carolina Miranda dos Santos. — 2018  
vi, 71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca (PPGEAP), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Lílian Lund Amado  
Coorientação: Profa. Dra. Cléverson Rannieri Meira dos Santos.

1.                                      Sistema de defesa antioxidante. 2. lipoperoxidação. 3. estuário. 4. *Ucides cordatus*. 5. *Crassostrea* sp.. I. Lund Amado, Lílian, *orient.* II. Título

---

CDD 571.1

CARLA CAROLINA MIRANDA DOS SANTOS

**MODULAÇÃO NATURAL DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DUAS  
ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS COM POTENCIAL PARA BIOMONITORAMENTO**

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

Orientadora:

---

Profa. Dra. Lílian Lund Amado (UFPA/ PPGEAP)

Co-orientador:

---

Prof Dr. Cléverson Rannieri Meira dos Santos (MPEG)

Banca examinadora:

---

Jussara Moretto Martinelli Lemos  
(Universidade Federal do Pará/ PPGEAP)

---

Lygia Segal Nogueira  
(Universidade Federal do Pará/ ICS)

---

Rossineide Martins da Rocha  
(Universidade Federal do Pará/ PPGEAP)

*And if I claim to be a wise man  
Well, it surely means that I don't know  
[...] Carry on my wayward son  
For there'll be peace when you are done  
Lay your weary head to rest  
Don't you cry no more"*  
(Kansas- Carry on my wayward son)

*"E nossa história não estará pelo avesso  
assim, sem final feliz.  
Teremos coisas bonitas pra contar.  
E até lá, vamos viver!  
Temos muito ainda por fazer!  
Não olhe pra trás, apenas começamos."  
(Legião Urbana- Metal contra as nuvens)*

*"It's our choices that show us what we truly  
are, far more than our abilities"  
(J.K. Rowling, Harry Potter e a Pedra  
Filosofal)*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer:

À minha família (minha mãe Deuza, minha irmã Flávia, minha sobrinha Bibi, meu cunhado Felipe e por último, mas extremamente importante meu amor Felipe) por todo apoio, paciência e compreensão durante este trajeto.

Ao meu amor Felipe por toda ajuda dentro e fora do laboratório, por entender o meu estresse, minha choradeira, meu cansaço e por acima de tudo me amar, proteger e sair pra comprar uma barra de chocolate quando eu estava pra baixo (haha). Eu te amo amor!

À minha irmã Flávia cujo incentivo nas horas de desânimo foram essenciais e pela amizade e risadas que sempre damos juntas.

À minha orientadora Profa. Lílian pela paciência, pelos ensinamentos, compreensão e apoio que foram fundamentais para o cumprimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Cléverson pela ajuda, apoio e fornecimento de logística para esse trabalho além de me dar a oportunidade de participar das coletas que fizeram toda a diferença na minha vida profissional.

À Luciana Lameira (Lu) por toda a imensa ajuda prestada nas atividades laboratoriais e pela amizade que construímos nesse curto período que nos conhecemos.

A todo o povo do BioPAq: Sildi, Irina, Sari, John e Cainã pela ajuda direta ou indireta e pela boa convivência no lab.

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia aquática e Pesca pelo suporte dado ao desenvolvimento do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos vocês meu mais sincero

Obrigada!

## SUMÁRIO

TEXTO COMPLEMENTAR .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	3
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....	4
CAPÍTULO 1 .....	6
RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUÇÃO .....	8
2. METODOLOGIA .....	9
2.1. ÁREA DE ESTUDO .....	9
2.2. ATIVIDADES DE CAMPO .....	11
2.3. ATIVIDADES DE LABORATÓRIO .....	11
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	12
3. RESULTADOS .....	13
3.1. DADOS DE PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA .....	13
3.2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA .....	14
3.3. BIOMETRIA .....	16
3.4 .BIOMARCADORES .....	18
4. DISCUSSÃO .....	22
4.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA .....	22
4.2. BIOMETRIA .....	23
4.3. BIOMARCADORES .....	24
5. CONCLUSÃO .....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
LISTA DE FIGURAS .....	34
LISTA DE TABELAS .....	36
CAPÍTULO 2 .....	37
RESUMO .....	38
ABSTRACT .....	39
1. INTRODUÇÃO .....	40
2 .METODOLOGIA .....	41

2.1. ÁREA DE ESTUDO .....	41
2.2. ATIVIDADES DE CAMPO .....	43
2.3. ATIVIDADES DE LABORATÓRIO .....	43
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
3. RESULTADOS.....	45
3.1. DADOS DE PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA.....	45
3.2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA.....	45
3.3. BIOMETRIA.....	47
3.4. BIOMARCADORES .....	48
4. DISCUSSÃO .....	53
4.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA.....	53
4.2. BIOMETRIA.....	54
4.3. BIOMARCADORES .....	55
5. CONCLUSÃO .....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
LISTA DE FIGURAS .....	68
LISTA DE TABELAS .....	70
CONCLUSÃO GERAL .....	71

## TEXTO COMPLEMENTAR

Atualmente, os programas de biomonitoramento tem tido crescente importância no diagnóstico da qualidade ambiental por permitir a avaliação da eficácia de recuperação de ambientes aquáticos bem como medidas de conservação (Zhou et al., 2008). Para aplicação desses programas é necessária uma sólida base de conhecimentos biológicos e ecológicos acerca dos organismos utilizados como matrizes para esses estudos, destacando-se os invertebrados aquáticos (Bonada et al., 2006).

Os invertebrados bentônicos configuram-se bons biomonitores por apresentarem contato direto com o sedimento elucidando os processos antrópicos e naturais presentes no ecossistema (Baird, 2002). Nesse contexto, parâmetros do sistema de defesa antioxidante são frequentemente utilizados como biomarcadores de poluição (Huang et al., 2005). Biomarcadores são alterações bioquímicas, moleculares, celulares e fisiológicas em um organismo, advindos da exposição ou efeito de um xenobiótico (Lam & Gray, 2003) ou de fontes naturais de estresse como mudanças físico-químicas do ambiente (Amorim, 2003).

O estuário da Baía do Japerica no Estado do Pará manteve-se em condições prístinas por muitos anos, impondo aos organismos condições naturais únicas que implicam em adaptações fisiológicas específicas. No entanto, atualmente está ocorrendo o funcionamento de uma fábrica de cimento no Município de Primavera, uma das principais áreas banhadas por essa baía. Assim estudos de caracterização de parâmetros bioquímicos em organismos residentes, previamente aos potenciais impactos causados por essa atividade antrópica é fundamental para o pontuamento embasado e assertivo de possíveis efeitos deletérios na saúde ambiental.

O presente estudo tem como objetivo caracterizar o comportamento do sistema de defesa antioxidante de duas espécies macrobentônicas (caranguejo uçá *Ucides cordatus* e a ostra-do-mangue *Crassostrea* sp.) de grande relevância ecológica e comercial, provenientes do estuário amazônico da Baía de Japerica, frente à variação sazonal dos parâmetros físico-químicos da água, sobretudo a salinidade.

As coletas foram realizadas ao funcionamento da fábrica e em diferentes locais dentro do estuário de maneira que abrangesse o gradiente de salinidade e de futuras influências antrópicas (distância em relação ao Município de Primavera). Dessa maneira, foram selecionados três pontos de coleta para *U. cordatus* no estuário inferior, médio e superior e dois pontos de coleta para *Crassostrea* sp. no estuário inferior e superior. A técnica de coleta de ambas as espécies foi por catação manual livre e foi priorizado os indivíduos maiores e somente machos para *U. cordatus*. Após coletados, os animais foram crioanestesiados, mensurados (comprimento total, largura total, altura e peso) e posteriormente dissecados retirando-se porções de brânquias de ambas as espécies e

músculo adutor somente de *Crassostrea* sp. Os biomarcadores bioquímicos dosados foram a atividade da enzima Glutathione-S-transferase (GST), a Capacidade antioxidante total (ACAP) e Lipoperoxidação (LPO) para os tecidos das duas espécies e a atividade da enzima Glutamato cistéina ligase (GCL) e concentração de Glutathione Reduzida (GSH) somente para brânquias do caranguejo.

Observou-se de modo geral, que ambas as espécies apresentam modulação de seus parâmetros de estresse oxidativo conduzida pela sazonalidade, uma vez que apresentaram estabilidade dos biomarcadores durante estações de aumento da salinidade e instabilidade dos mesmos em estações de águas hiposalinas. Além disso, ambas apresentaram plasticidade fisiológica frente os desafios metabólicos impostos pelo ambiente o que as tornam viáveis para estudos de biomonitoramentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amorim, L.C., 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 6, 158–170.

Bonada, N.; Prat, N.; Resh, V.H.; Statzner, B. 2006. developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. *Annual Review of Entomology*. 51:495–523.

Baird, C., 2002. *Química Ambiental*, 2ª ed. Bookman. Porto Alegre, RS, Brasil.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6):1841–56.

Lam, P.K.S., Gray, J.S., 2003. The Use of Biomarkers in Environmental Monitoring Programmes. *Marine Pollution Bulletin*. 46: 182–186.

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: 135–150.

## ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação é composta de dois capítulos: Capítulo 1: “Influência da sazonalidade na modulação natural de biomarcadores de estresse oxidativo no caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Brachyura, Ucididae)” e Capítulo 2: “Modulação natural de biomarcadores de estresse oxidativo na ostra-do-mangue *Crassostrea* sp. (Bivalvia, Ostreidae): O papel da sazonalidade nestas respostas bioquímicas”. Os dois capítulos envolvem a temática de biomonitoramento e do uso biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo associados à variação físico-química do ambiente.

Ambos os manuscritos serão submetidos para a revista *Comparative Biochemistry and Physiology–Part A: Molecular and Integrative Physiology*, que publica artigos inéditos na área de sistemas fisiológicos, incluindo biologia comportamental, do desenvolvimento, da circulação, da excreção, da regulação iônica e térmica, da locomoção, da nutrição, da respiração e endocrinologia. Atualmente a revista tem qualis A2 para Biodiversidade.

## **CAPÍTULO 1**

### **INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NA MODULAÇÃO NATURAL DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CARANGUEJO-UÇÁ *UCIDES CORDATUS* (BRACHYURA, UCIDIDAE)**

## **Influência da sazonalidade na modulação natural de biomarcadores de estresse oxidativo no caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Brachyura, Ucididae)**

Carla Carolina Miranda dos Santos<sup>a,b</sup>, Lílian Lund Amado<sup>a,b</sup>, Cléverson Rannieri Meira dos Santos<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Ecotoxicologia (ICB) e Laboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho (LAPMAR), Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, 66075110, Belém, Pará, Brasil.

<sup>c</sup> Museu Paraense Emílio Goeldi, Av. Perimetral, 1901, Terra Firme, 66077830, Belém, PA, Brasil.

### **RESUMO**

Os estuários caracterizam-se pela formação de gradientes de salinidade, sendo frequentemente associados a atividades antrópicas. O estuário da Baía do Japerica no estado do Pará foi uma área prístina por muitos anos, o que possibilita a caracterização de variações biológicas naturais. Estudos que mostrem as condições dos organismos frente à variação natural do ambiente são fundamentais para futura avaliação de alterações ambientais decorrentes de impactos antrópicos. Uma ferramenta desses estudos são os biomarcadores, definidos como alterações biológicas em baixos níveis de organização induzidas por fontes estressoras e considerados respostas preditivas de efeitos mais severos. O objetivo deste trabalho é caracterizar a modulação de biomarcadores bioquímicos frente à variação natural do estuário amazônico no caranguejo-uçá *Ucides cordatus* proveniente desta baía. As coletas foram realizadas em um ano nos períodos de transição chuvoso-seco (Junho/2013), estiagem (Setembro/2013), transição seco-chuvoso (Novembro/2013) e chuvoso (Fevereiro/2014) no estuário inferior, médio e superior. Como biomarcadores de exposição avaliou-se as enzimas glutatona-S-transferase (GST) e glutamato cisteína ligase (GCL), a capacidade antioxidante total (ACAP) e a concentração de glutatona reduzida (GSH) e como biomarcador de efeito foi analisada a lipoperoxidação (LPO). Houve diminuição da atividade de ambas as enzimas, da ACAP e menor LPO no período de transição estiagem-chuvoso para os organismos de todos os locais apontando este período como estação de maior estabilidade metabólica. Os organismos, sobretudo os do estuário médio, apresentaram plasticidade fisiológica frente às variações do ambiente a que estão submetidos. A sazonalidade é a principal moduladora dos biomarcadores e a espécie apresenta alta viabilidade para estudos de biomonitoramento.

**Palavras-chave:** *sistema de defesa antioxidante, lipoperoxidação, estuário*

**Influence of seasonality on the natural modulation of oxidative stress biomarkers in  
Uçá crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ucididae)**

Carla Carolina Miranda dos Santos<sup>a,b</sup>, Lílian Lund Amado<sup>a,b</sup>, Cléverson Rannieri Meira dos Santos<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Ecotoxicologia (ICB) e Laboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho (LAPMAR), Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, 66075110, Belém, Pará, Brasil.

<sup>c</sup> Museu Paraense Emílio Goeldi, Av. Perimetral, 1901, Terra Firme, 66077830, Belém, PA, Brasil.

**ABSTRACT**

The estuaries are characterized by the formation of salinity gradients and are frequently associated with anthropic activities. The estuary of the Japerica Bay in the state of Pará has been a pristine area for many years, which enables the characterization of natural biological variations. Studies that show the condition of organisms against the natural environmental variations are fundamental for future evaluation of environmental change due to anthropic impacts. One tool of these studies are biomarkers, defined as biological changes in low levels of organization induced by stressors and considered as predictive responses of more severe effects. The aim of this work is to characterize the modulation of biochemical biomarkers against the natural variation of the estuary in the *Ucides cordatus* crab from this bay. The collections were carried out throughout one year at rainy-dry transitional period (June/2013), dry period (September/2013), dry-rainy transitional period (November / 2013) and rainy period (February / 2014) in the lower, middle and upper estuary. As exposure biomarkers were evaluated the enzymes glutathione-S-transferase (GST) and glutamate cysteine ligase(GCL), total antioxidant capacity (ACAP) and reduced glutathione(GSH) concentration and as biomarker of effect was analyzed the lipid peroxidation (LPO). There was a decrease in the activity of both enzymes, ACAP and lower LPO in the rainy-dry transitional period for the organisms of all sites, pointing to this period as a season of greater metabolic stability. The organisms, especially those of the middle estuary, presented physiological plasticity against the variations of the environment which they are submitted. Seasonality is the main modulator of biomarkers and the specie presents high viability for biomonitoring studies.

**Key-word:** *antioxidant defense system, lipid peroxidation, estuary*

## 1. INTRODUÇÃO

Estuários são ecossistemas de transição entre ambientes limnológicos e marinhos que fornecem importantes serviços sócio-econômicos e apresentam grande relevância ecológica e biológica (Barbier et al., 2011)

Estes ambientes costeiros destacam-se por apresentar formação de gradientes de seus parâmetros físico-químicos, principalmente de salinidade. Este parâmetro pode variar de 100% dulciaquícola a 100% água marinha como resultado dos ciclos de marés (Urbina & Glover, 2015) impondo condições ambientais severas à sobrevivência dos animais.

A variação da salinidade em estuários destaca-se como uma característica ambiental crítica uma vez que afeta a fisiologia dos organismos (Anger, 2001). Tal variação gera respostas que garantem a manutenção da homeostase celular, tais como a osmorregulação que é a capacidade de manter a concentração iônica extracelular estável em relação às mudanças osmóticas do meio (Montserrat et al., 2007). Possíveis desequilíbrios osmóticos podem prejudicar outros processos fisiológicos e, em situações extremas, potencialmente causar a morte (Urbina & Glover, 2015).

Uma grande quantidade de crustáceos decápodos adultos são osmoreguladores sendo os tecidos branquiais os principais responsáveis pelas trocas iônicas (Lignot et al., 2000). Sabe-se que a osmorregulação é um mecanismo celular que demanda gasto de energia (Boeuf & Payan, 2001) e, portanto, implica na degradação de ATP (adenosina trifosfato) através de sua hidrólise (Pham, et al., 2016). Este processo culmina na produção de compostos reativos endógenos advindos do metabolismo oxidativo, na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial através da redução parcial do oxigênio (Burdon, 1999) que são chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas, quando produzidas em excesso e sem um aporte antioxidante adequado, podem levar ao estresse oxidativo (Shami & Moreira, 2004) causando oxidação de macromoléculas importantes para a homeostase até morte celular (Halliwell & Whiteman, 2004).

Somada às severas condições do meio, os organismos estuarinos estão submetidos aos efeitos de atividades antrópicas que afetam diretamente a saúde ambiental (Smith et al., 2003). Nesse contexto, os biomarcadores configuram-se como preditores sensíveis aos estressores ambientais (Carajaville et al., 1995). São definidos como alterações em respostas biológicas de moléculas, componentes celulares, estruturas ou funções (Depledge et al., 1995) que ocorrem quando um organismo está fora de suas condições fisiológicas normais, seja pela exposição à poluentes ou modificações físico-químicas de seu habitat (Amorim, 2003).

Os biomarcadores são capazes de informar se houve exposição a uma fonte estressora e analisar o nível desta condição (biomarcadores de exposição), e de elucidar as consequências deletérias (biomarcadores de efeito) (Sogorb et al., 2014). Assim, programas de biomonitoramento que utilizam essas ferramentas fornecem uma visão holística da situação homeostática dos organismos sendo muito úteis em estudos em campo (Monserrat et al., 2007).

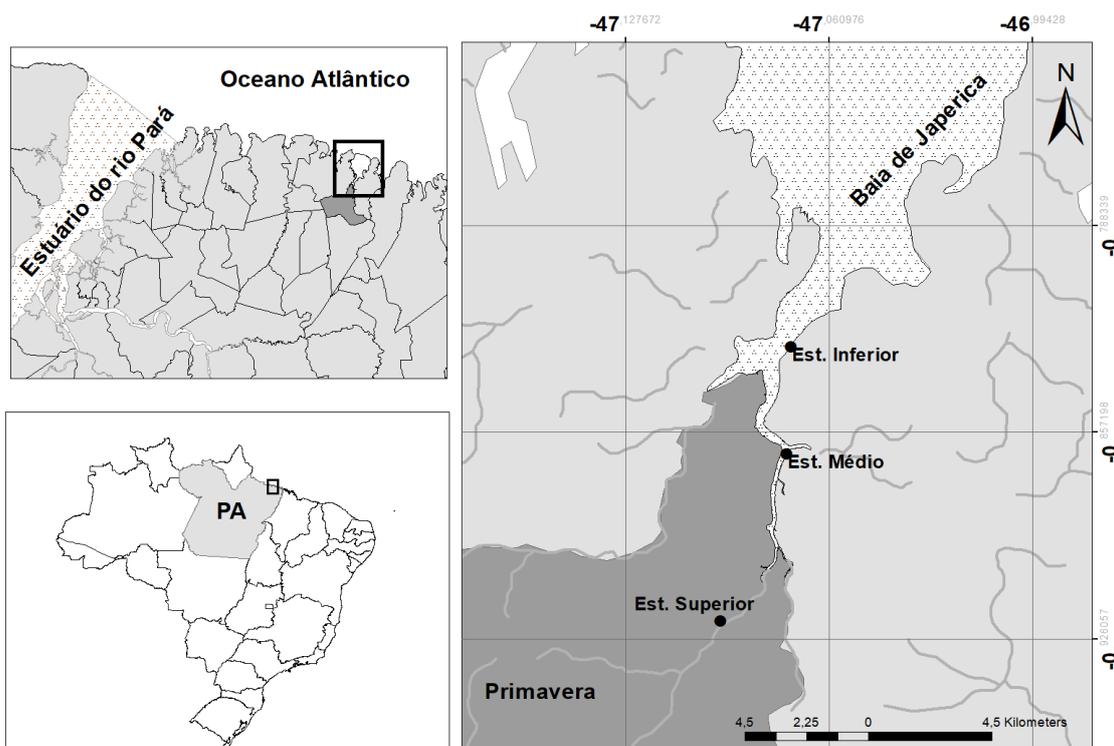
Dentre as espécies bentônicas que vivem nos manguezais, os crustáceos estão entre os mais abundantes. O caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) é um dos principais representantes da fauna de bentônicos nos manguezais da costa brasileira (Ivo e Vasconcelos, 2000). Possui alto valor sócio-econômico (Blankensteyn et al., 1997) e características ecológicas essenciais para a manutenção dos ecossistemas que habitam. Sua atividade no manguezal promove a drenagem e bioturbação do solo (Amouroux & Tavares, 2005) além de atuar na predação do propágulo dos vegetais do manguezal. Esta atividade de predação quebra a dormência das sementes através de sua mastigação e possibilita a constante renovação da biomassa vegetal (Nohrdaus et al., 2006), o que influencia diretamente a dinâmica dessas florestas (Lindquist et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a modulação sazonal natural de biomarcadores de estresse oxidativo no caranguejo *Ucides cordatus* ao longo de um ano, em um estuário amazônico, utilizando como ferramentas de análise biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo. Além disso, objetiva-se avaliar a viabilidade de utilização da espécie como biomonitor.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. ÁREA DE ESTUDO**

A Baía do Japerica, é um estuário localizado no litoral nordeste paraense, na zona costeira amazônica denominada de “litoral do Salgado” ou “Salgado paraense”, porção costeira do Pará com maior influência do Oceano Atlântico. O manguezal tem seu início próximo ao município de Primavera, se estendendo ao longo da baía nas duas margens, onde há o aporte de águas de diversos rios até a sua desembocadura no Oceano Atlântico.



**Figura 1.** Mapa com a localização geográfica da área da Baía do Japerica (ao norte do município de Primavera), indicando os três locais de coleta de amostragem na Baía de Japerica: A) Estuário inferior-  $0^{\circ} 49' 54.9''$  S,  $47^{\circ} 04' 29.7''$  W; B) Estuário médio -  $00^{\circ} 51' 52.1''$  S;  $47^{\circ} 04' 29.4''$  W e C) Estuário superior –  $00^{\circ} 55' 12.7''$  S;  $47^{\circ} 05' 47.2''$  W.

Para atingir os objetivos propostos, foram escolhidos três locais de acordo com o gradiente de salinidade. Assim, os pontos de coleta consistem nos manguezais denominados: A) Estuário inferior: área sob condições de maior salinidade e maior distância em relação ao município de Primavera; B) Estuário médio: área intermediária caracterizada por intensa mistura de águas; C) Estuário superior: área sob condições de menor salinidade e próxima ao município de Primavera (Figura 1). Salienta-se ainda que durante o período de coletas para este estudo, próximo a montante do estuário da Baía do Japerica estava em fase de implantação uma fábrica de cimento, inoperante na época, mas inaugurada em abril de 2016. Logo, a seleção dos pontos também obedece um gradiente de influência em relação ao epicentro de futuras atividades antrópicas, o município de Primavera.

As coletas em todos os pontos de amostragem foram planejadas com o objetivo de se abarcar a variação sazonal ao longo de um ano de estudo, abrangendo deste modo: Período de transição I (transição chuvoso-estiagem, Junho/2013), Período de estiagem (Setembro/2013), Período de transição II (transição estiagem-chuvoso, Novembro/2013) e Período chuvoso (Fevereiro/2014). Os meses de coleta foram selecionados baseados em dados de precipitação pluviométrica retirados da estação do Instituto Nacional de

Meteorologia (INMET) localizada na cidade de Salinópolis, que dista cerca de 56 Km de Primavera.

## 2.2. ATIVIDADES DE CAMPO

A técnica de coleta dos organismos (20–36 indivíduos machos por ponto) foi por catação manual durante a baixa-mar e imediata crioanestesia em gelo (0°C) de maneira que se minimize o estresse nos animais e se preserve as características metabólicas dos mesmos. Em seguida, houve análise morfológica para identificação taxonômica dos espécimes coletados para imediata identificação e etiquetagem adequada. Foi priorizado dentro do esforço de coleta os animais maiores.

No início e ao final de cada coleta foram registrados os seguintes parâmetros físico-químicos da água em todos os pontos de amostragem: salinidade, pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura da água.

## 2.3. ATIVIDADES DE LABORATÓRIO

Em laboratório, no mesmo dia da coleta, os animais foram mensurados com um paquímetro (0,01 mm), sendo as dimensões analisadas: a maior largura do cefalotórax em vista dorsal, comprimento e altura. Os animais foram também pesados em balança semianalítica (0,01g) para que em seguida as brânquias fossem retiradas e acondicionados em tubos tipo eppendorf para armazenamento em ultra-freezer (-80°C) até o momento das análises bioquímicas.

### 2.3.1. Preparo dos homogeneizados para dosagens bioquímicas

As amostras de brânquias foram homogeneizadas (1:4, p/v) em tampão com pH ajustado para 7,6 segundo a metodologia de Bainy et al. (1996). Os homogeneizados foram centrifugados a 20.000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado, aliqotado e acondicionado a -80°C até o momento das dosagens.

### 2.3.2. Determinação de Proteínas Totais

A análise de proteínas totais foi realizada com kit comercial (Dolex Ltda, Brazil) baseado no teste Biureto (citratotrisódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M e sulfato de cobre 0,01M) para proteínas, as leituras foram realizadas em leitor de microplacas multimodal (Victor X3, Perkin Elmer) a 550 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de proteínas/mL.

### **2.3.3. Determinação da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil**

A capacidade antioxidante total contra radicais peroxil foi analisada o seguindo o método de Amado et al. (2009). As leituras foram realizadas em leitor de microplaca de fluorescência (485 e 530 para excitação e emissão respectivamente) durante uma hora (Victor 2, Perkin Elmer). Os resultados foram expressos como inverso da área relativa.

### **2.3.4. Determinação da atividade da glutatona-S-transferase (GST)**

A dosagem de GST foi baseada nos trabalhos de Habig et al. (1974) e Habig & Jakoby (1981). As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer) com leitora de microplacas. Os resultados foram expressos em UGST/ mg de proteína que representa a quantidade necessária da enzima para conjugar 1  $\mu\text{Mol}$  de CDNB/ min/mg de proteína, a 25°C e pH 7,0.

### **2.3.5. Atividade da glutamato cisteíniligase (GCL) e concentração de glutatona (GSH) total**

O protocolo utilizado segue o trabalho de White et al. (2003). As leituras foram realizadas em um espectrofluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer) com leitor de placas (472 para excitação e 528 para emissão). Os resultados foram expressos em nmol de GSH e atividade da GCL (nmol/min/mg de proteína).

### **2.3.6. Lipoperoxidação (LPO) - Ensaio FOX modificado**

A lipoperoxidação foi determinada de acordo com Hermes-Lima et al. (1995) adaptada para microplacas segundo Monserrat et al. (2003). As amostras foram homogeneizadas (1:6 m/v) em metanol 100% à frio (4°C). Os homogeneizados foram centrifugados a 1000x g, durante 10 min à 4°C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de 550 nm. O conteúdo de peróxidos lipídicos foi expresso como equivalentes de nM CHP/g de tecido úmido.

## **2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

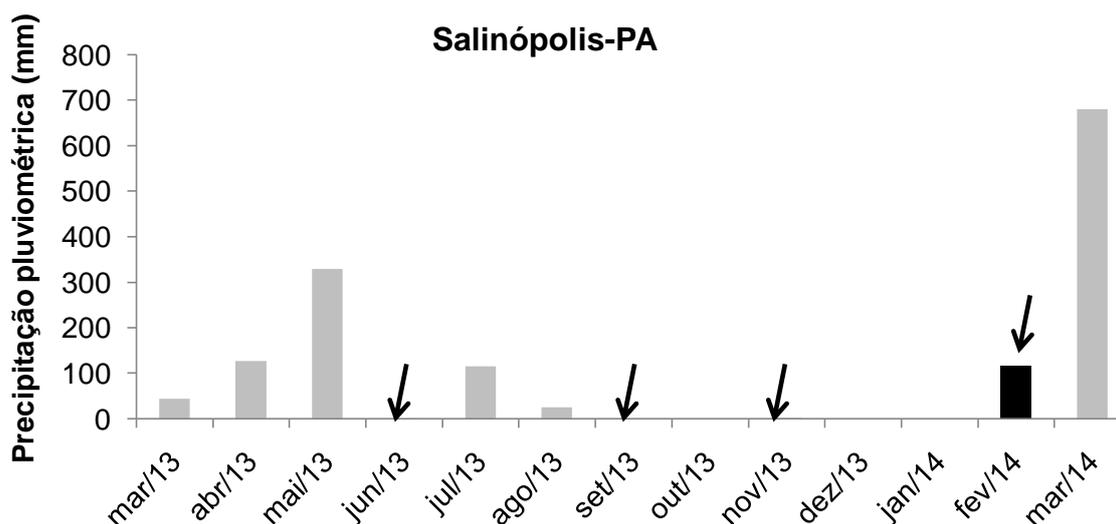
Foram testados os pressupostos de normalidade (Teste de Shapiro-Wilks) e homocedasticidade (Teste de Levene) nos dados de biomarcadores para posterior aplicação de análise de variância (ANOVA). Uma vez não alcançados os pressupostos foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal- Wallis para comparação dos biomarcadores entre locais de coleta e entre períodos climáticos com teste à posteriori de múltipla comparação de ranques de médias.

Para comparação entre locais e períodos climáticos dos dados de biometria também foram testados os pressupostos de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Levene). Em seguida foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de duas vias com teste de Tukey à posteriori. O nível de significância adotado foi de 5% (Zar, 1984).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. DADOS DE PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA

Observa-se na Figura 2 o padrão de variação de precipitação para a região de Salinópolis ao longo dos anos 2013-2014. Com base nesses padrões foram selecionados os meses de coleta. Dentre os meses em que as coletas ocorreram o maior valor de precipitação foi no mês de Fevereiro/14 com 117 mm, enquanto Setembro/13 apresentou o menor valor de 0 mm. Junho/13 e Novembro/2013 apresentaram valores de 1 mm e 2mm respectivamente. Destaca-se ainda que as coletas realizadas nos períodos de transição foram realizadas após o período chuvoso (Jun/13, transição I chuvoso-estiagem) e após o período de estiagem (Nov/13, transição II estiagem-chuvoso). Observa-se que em ordem cronológica dos meses houve um aumento da precipitação pluviométrica.



**Figura 2:** Precipitação registrada para Salinópolis, PA do período de Março/13 a Março/2014 (dados obtidos do site do INMET <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>). As setas indicam os meses de coleta dos organismos. A barra destacada em preto corresponde ao mês de coleta de maior precipitação.

### 3.2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Não houve diferenças de temperatura da água nem entre pontos e nem entre estações, mantendo-se em torno de 25–30°C e o pH manteve-se próximo a neutralidade (6–7) em todos os pontos ao longo de todos os períodos (tabela 1).

O oxigênio dissolvido manteve-se em torno de 5–8 mg/L para todos os pontos e o estuário superior apresentou os maiores valores durante os períodos de estiagem e transição I. A condutividade variou muito entre os pontos e períodos, onde todos os locais apresentaram pico durante o período de transição II (59,5–59,4, 60,7–58,9 e 49,3–59,8  $\mu\text{S}/\text{cm}$  respectivamente) e os menores valores durante a transição I (33–37,8; 27,8–27,4 e 1,78–1,90  $\mu\text{S}/\text{cm}$  respectivamente) com alta semelhança de valores (Tabela 1).

A salinidade também variou muito entre pontos para todos os períodos amostrados, onde o estuário inferior apresentou os maiores valores, o estuário médio apresentou valores intermediários durante os períodos de transição I, estiagem e chuvoso e o estuário superior apresentou os menores valores em todos os períodos (tabela 1). O pico de salinidade ocorreu durante o período de transição II para todos os pontos (34–32; 36–34 e 21–34 respectivamente) quando foi registrado a menor precipitação (figura 3). Os menores valores de salinidade foram registrados no período chuvoso para o estuário inferior e médio, concomitantemente foi registrado nesse período a maior precipitação pluviométrica (figura 3).

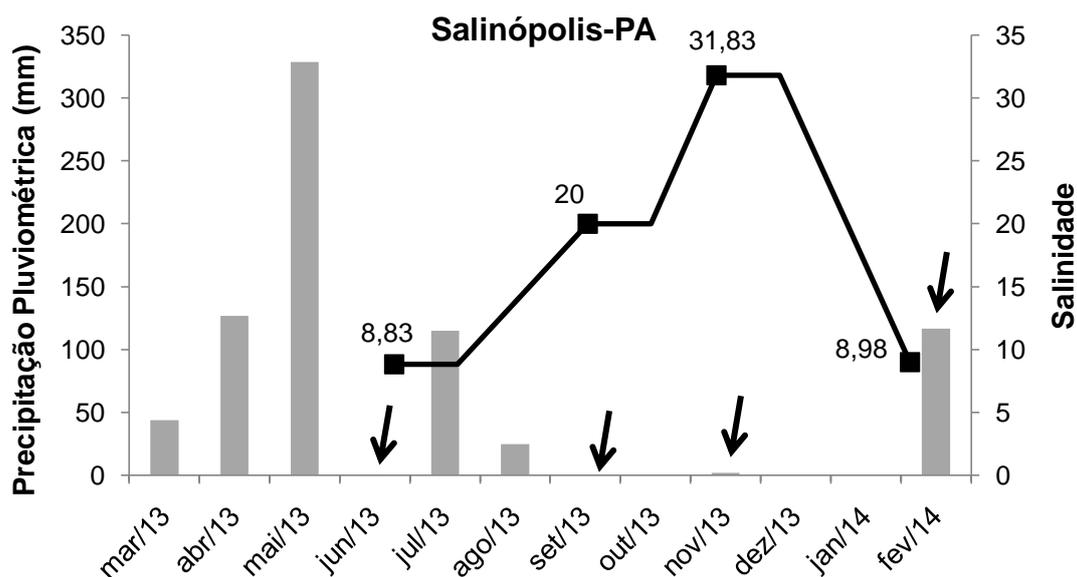
Observou-se assim uma relação inversamente proporcional entre os valores de salinidade e precipitação pluviométrica (figura 3), nos quais os períodos de maior precipitação apresentaram valores médios de salinidade menores enquanto os períodos de baixa pluviosidade apresentaram aumento dos valores de salinidade.

O período de transição I (chuvoso-estiagem) apresentou valor médio de salinidade de todos os pontos de coleta de 8,83 e o período chuvoso apresentou média de 8,98 (figura 3) mostrando que a injeção de água doce no estuário promove a diluição das águas. O período de transição I muito embora tenha apresentado baixo valor de precipitação, demonstra ser influenciado pelo histórico de condições físico-químicas de meses pretéritos. Sendo portanto, de fato uma estação de transição entre a alta entrada de água doce no estuário dos meses chuvosos anteriores e início da diminuição da pluviosidade.

O período de estiagem apresentou valor médio de salinidade de 20 e o período de transição II (estiagem-chuvoso) apresentou média de 31,83 (figura 3) mostrando o processo de salinização do ambiente com a diminuição da pluviosidade.

**Tabela 1:** Parâmetros físico-químicos da água dos locais amostrados ao longo de quatro períodos sazonais na Baía de Japerica, PA. Os dados são apresentados como os valores registrados na maré baixa e maré alta. (Temp. = Temperatura; OD= Oxigênio dissolvido; Conduct.= Condutividade; Sal.= Salinidade; Est. Inf.= Estuário Inferior; Est. Med.= Estuário Médio; Est. Sup.= Estuário Superior).

PERÍODO	LOCAL	TEMP. (°C)	pH	OD (mg/L)	CONDUT. (µS/cm)	SAL.
TRANSIÇÃO I	EST. INF.	29,2–28,4	7,18–6,82	5,34–0,68	33–37,8	15–16
	EST. MED.	27,4–30,1	7,51–7,54	5,79–6,01	27,8–27,4	12–10
	EST. SUP.	26,9–28,7	7,62–7,55	6,59–6,48	1775–1902	0–0
ESTIAGEM	EST. INF.	28,4–30,5	7,6–7,58	5,52–5,58	49,7–49,5	33–32
	EST. MED.	29,3–28,7	7,46–7,6	5,28–6,58	44,4–38,2	24–22
	EST. SUP.	32,1–33,4	7,72–7,56	8,68–8,83	8,67–21,42	0–9
TRANSIÇÃO II	EST. INF.	26,9–29,1	7,71–7,84	6,55–7,55	59,5–59,4	34–32
	EST. MED.	29,4–29,3	7,66–7,72	6,56–6,69	60,7–58,9	36–34
	EST. SUP.	28,9–29,8	7,59–7,54	8,11–5,77	49,3–59,8	21–34
CHUVOSO	EST. INF.	28,7–27,6	7,31–7,33	5,66–6,28	30,9–27,95	16 - 12
	EST. MED.	27,7–29,2	7,26–7,38	4,87–6,51	22,1–26,2	11 - 12
	EST. SUP.	25–25,7	6,5–7,19	5,5–5,0	33,2–33,7	1,1–1,8



**Figura 3:** Precipitação registrada para Salinópolis, PA do período de Março/13 a Fevereiro/2014 (dados obtidos do site do INMET <<http://www.inmet.gov.br/porta/>>) representada pelas barras. As setas indicam os meses de coleta dos organismos. A linha representa os valores médios de salinidade de todos os pontos de coleta para cada período climático escolhido.

### 3.3. BIOMETRIA

Houve diferenças entre os pontos somente para altura durante o período de estiagem onde os animais do estuário inferior apresentaram valores inferiores à organismos do estuário superior ( $3,43 \pm 0,06$  e  $6,46 \pm 2,7$  cm respectivamente). Os animais do estuário médio apresentaram diferenças entre os períodos transição I e chuvoso para largura onde o último apresentou valores menores ( $6,85 \pm 0,13$  e  $6,17 \pm 0,15$  cm respectivamente) e entre os animais do transição I e estiagem para o peso ( $145,86 \pm 6,67$  e  $106,51 \pm 5,81$  g respectivamente).

Os animais coletados nos períodos de transição I e chuvoso ( $3,88 \pm 0,06$  e  $3,76 \pm 0,07$  cm respectivamente) diferenciaram-se dos coletados na estiagem para altura no estuário inferior onde na última foram registrados os menores valores ( $3,43 \pm 0,06$  cm).

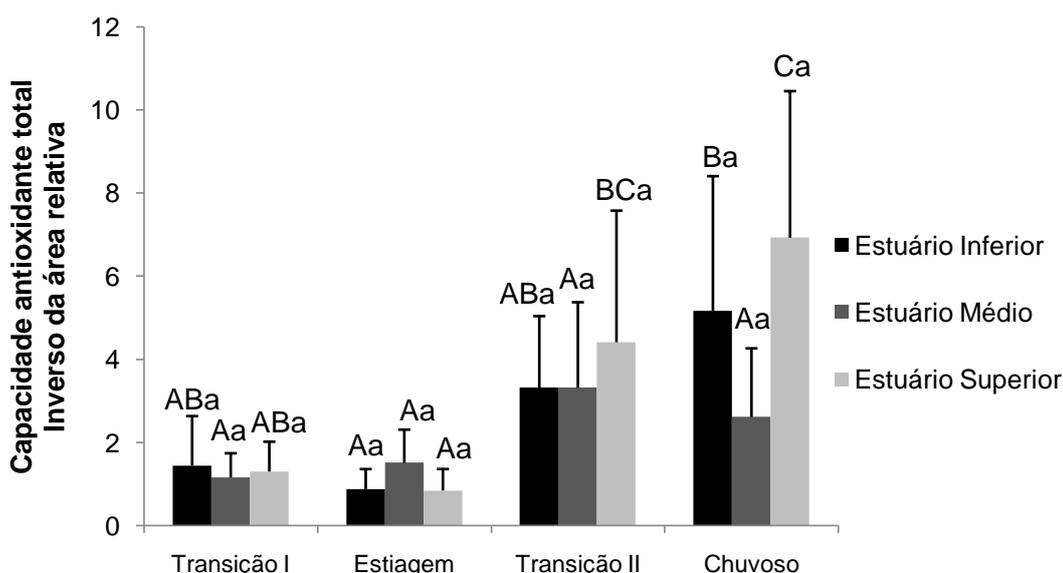
**Tabela 2:** Biometria de *Ucides cordatus* para todos os locais amostrados ao longo de quatro períodos sazonais (n=30-35 indivíduos). Os dados estão expressos em média±erro padrão. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre períodos para um mesmo local e as letras minúsculas diferentes representam diferenças entre locais em um mesmo período.

PERÍODO	LOCAL	COMPRIMENTO TOTAL (cm)	LARGURA (cm)	ALTURA (cm)	PESO (g)
TRANSIÇÃO I	EST. INF.	4,88±0,09 Aa	6,57±0,13 Aa	3,88±0,06 Aa	130,1±8,07 Aa
	EST. MED.	5,24±0,09 Aa	6,85±0,13 Aa	3,8±0,06 Aa	145,86±7,67 Aa
	EST. SUP.	4,94±0,07 Aa	6,58±0,11 Aa	3,64±0,07 Aa	114,1±5,77 Aa
ESTIAGEM	EST. INF.	4,69±0,1 Aa	6,12±0,13 Aa	3,43±0,06 Ba	99,68±6,52 Aa
	EST. MED.	4,81±0,09 Aa	6,28±0,12 ABab	3,52±0,06 Aab	106,51±5,81 Ba
	EST. SUP.	5,12±0,09 Aa	6,77±0,12 Ab	6,46±2,7 Ab	120,3±7,71 Aa
TRANSIÇÃO II	EST. INF.	4,88±0,08 Aa	6,28±0,11 Aa	3,56±0,05 ABa	113,58±5,99 Aa
	EST. MED.	4,83±0,08 Aa	6,3±0,12 ABa	3,53±0,06 Aa	108,51±5,67 ABa
	EST. SUP.	5,13±0,07 Aa	6,7±0,11 Aa	3,72±0,04 Aa	136,68±6,82 Aa
CHUVOSO	EST. INF.	4,91±0,18 Aa	6,4±0,14 Aa	3,76±0,07 Aa	131,9±8,38 Aa
	EST. MED.	4,82±0,11 Aa	6,17±0,15 Ba	3,6±0,08 Aa	120,56±7,94 ABa
	EST. SUP.	5±0,08 Aa	6,54±0,11 Aa	3,69±0,06 Aa	131,58±6,93 Aa

### 3.4 .BIOMARCADORES

#### 3.4.1. Capacidade antioxidante total

Houve diferenças significativas ( $p=0,004$ ) entre a capacidade antioxidante dos organismos do estuário inferior no período de estiagem ( $0,88\pm 0,48$ ) e chuvoso ( $5,16\pm 3,24$ ) ocorrendo uma indução no último. O mesmo padrão foi visualizado para os organismos do estuário superior, onde o período chuvoso ( $6,93\pm 3,52$ ) apresentou indução em relação ao período de estiagem ( $0,84\pm 0,51$ ) ( $p<0,0001$ ). Não houve diferenças entre locais para nenhum período amostrado e nem entre períodos para animais do estuário médio.

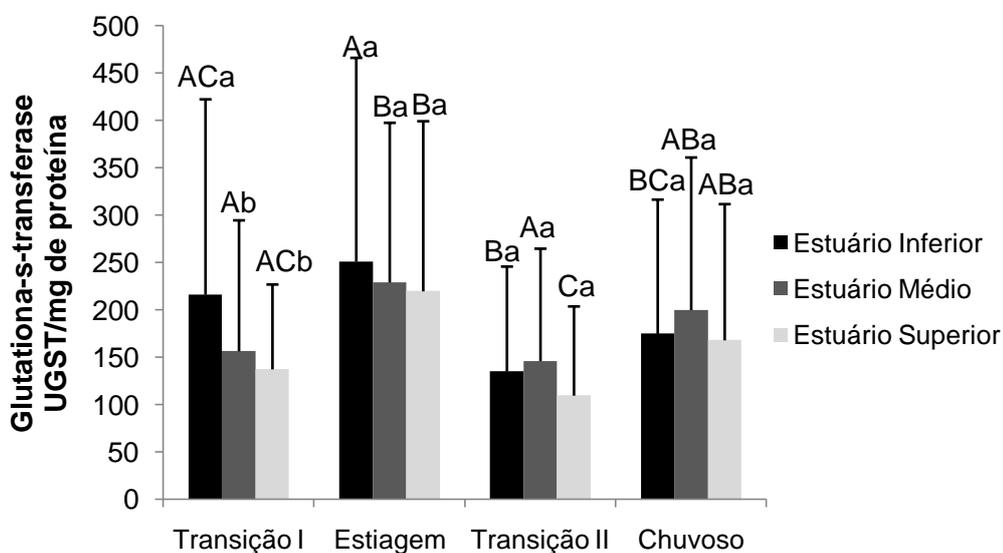


**Figura 4:** Capacidade antioxidante total em brânquias de *Ucides cordatus* ( $n=14-34$  indivíduos). Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p<0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p<0,05$ ) entre os locais no mesmo período.

#### 3.4.2. Glutathiona-S-transferase

Os períodos de transição I ( $216,50\pm 206,26$  UGST/mg de proteína;  $p<0,0001$ ) e estiagem ( $251,25\pm 215,33$  UGST/mg de proteína;  $p<0,0001$ ) diferenciaram-se do período de transição II ( $135,35\pm 110,87$  UGST/mg de proteína) onde houve uma diminuição da atividade da enzima para organismos do estuário inferior). Para organismos do estuário médio houve diferenciação entre os períodos de transição I ( $156,77\pm 138,26$  UGST/mg de proteína;  $p=0,009$ ) e II ( $146,30\pm 118,80$  UGST/mg de proteína;  $p<0,0001$ ) que apresentaram baixa atividade em relação ao período de estiagem ( $229,29\pm 168,71$  UGST/mg de proteína). O mesmo padrão foi observado para animais do estuário superior onde os períodos de transição I e II ( $137,68\pm 89,62$  e  $109,94\pm 94,19$  UGST/mg de proteína;  $p<0,0001$  para ambos)

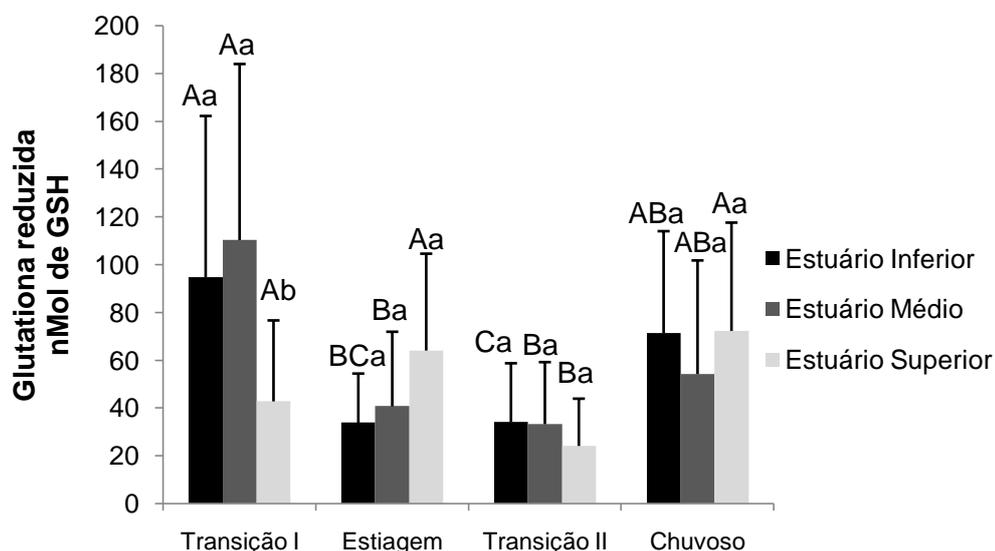
apresentaram atividades inferiores em relação ao período de estiagem ( $220 \pm 179,63$  UGST/mg de proteína). Observou-se diferença entre locais de coleta somente durante o período de transição I onde caranguejos do estuário inferior apresentaram maior atividade da GST em relação aos caranguejos dos demais pontos ( $p=0,029$  para o estuário médio e  $p<0,0001$  para o estuário superior).



**Figura 5:** Atividade da Glutathione-s-transferase em brânquias de *Ucides cordatus* ( $n=18-36$  indivíduos). Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p<0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p<0,05$ ) entre os locais no mesmo período.

### 3.4.3. Glutathione reduzida

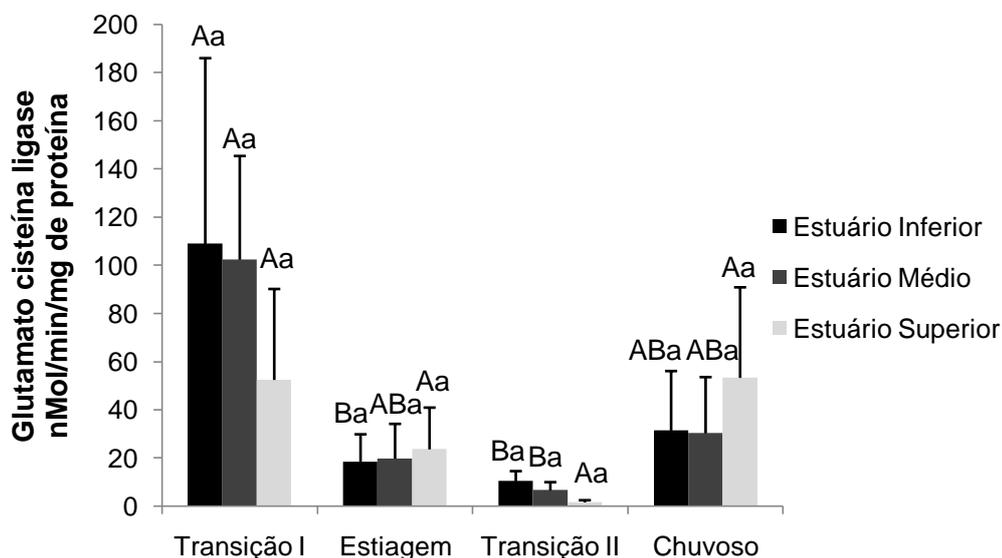
Houve diferença, para caranguejos do estuário inferior, entre o período de transição I ( $94,70 \pm 67,57$  nMol de GSH) em relação aos períodos de estiagem ( $33,89 \pm 20,56$  nMol de GSH;  $p<0,0001$ ) e transição II ( $34,08 \pm 24,69$  nMol de GSH;  $p<0,0001$ ) onde os últimos apresentaram menores concentrações. A mesma resposta foi observada para animais do estuário médio, logo o período de transição I teve concentração superior ( $110,33 \pm 73,69$  nMol de GSH) em relação aos períodos de estiagem e transição II ( $40,72 \pm 31,24$  e  $33,29 \pm 25,95$  nMol de GSH;  $p=0,015$  e  $p<0,0001$  respectivamente). Os organismos do estuário superior apresentaram a menor concentração de GSH ( $24,17 \pm 19,77$  nMol de GSH) durante o período de transição II em relação aos demais períodos de coleta ( $p=0,040$  para transição I;  $p<0,0001$  para estiagem e  $p=0,018$  para período chuvoso). Assim como para GST, houve diferença entre locais de coleta somente durante o período de transição I onde os organismos dos estuários inferior e médio apresentaram maiores concentrações ( $94,70 \pm 67,57$  e  $110,33 \pm 73,60$  nMol de GSH;  $p=0,043$  e  $p=0,043$  respectivamente) em relação aos organismos do estuário superior ( $42,81 \pm 33,90$  nMol de GSH).



**Figura 6:** Concentração de Glutaciona reduzida em brânquias de *Ucides cordatus* (n=7–36 indivíduos). Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período

#### 3.4.4. Glutamato cisteína ligase

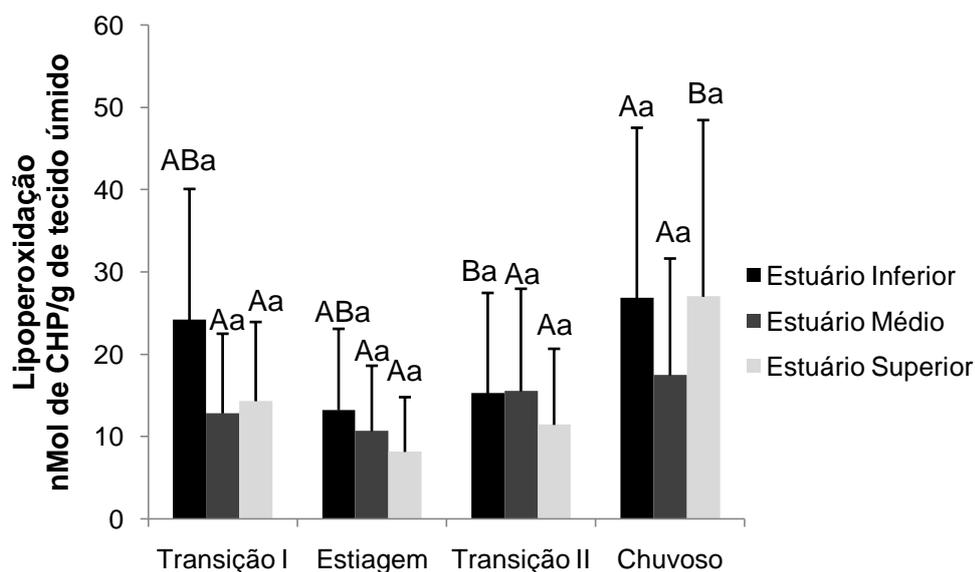
Os animais do estuário inferior apresentaram menores atividades durante os períodos de estiagem e transição II ( $18,40 \pm 11,47$  e  $10,35 \pm 4,24$  nMol/min/mg de proteína;  $p = 0,023$  e  $p < 0,0001$  respectivamente) em relação ao período de transição I ( $108,87 \pm 77,21$  nMol/min/mg de proteína). Enquanto os caranguejos do estuário médio apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) entre os períodos de transição I ( $102,35 \pm 43,11$  nMol/min/mg de proteína) com alta atividade e transição II ( $6,53 \pm 3,47$  nMol/min/mg de proteína) com baixa atividade da GCL. Não houve diferença entre períodos para organismos do estuário superior e nem entre locais para nenhum dos períodos de coleta.



**Figura 7:** Atividade da Glutamato cisteína ligase em brânquias de *Ucides cordatus* (n=4–28 indivíduos). Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período

### 3.4.5. Lipoperoxidação

Os caranguejos do estuário inferior apresentaram baixos conteúdos de LPO durante o período de transição II ( $15,22 \pm 12,23$  nMol de CHP/ g de tecido úmido) em relação ao período chuvoso ( $26,82 \pm 20,70$  nMol de CHP/ g de tecido úmido) ( $p = 0,011$ ). Já os animais do estuário superior apresentaram maior quantidade de lipídeos oxidados durante o período chuvoso ( $26,99 \pm 21,46$  nMol de CHP/ g de tecido úmido) em relação aos demais períodos climáticos ( $p = 0,006$  para transição I;  $p < 0,0001$  para transição II e para estiagem). Não houve diferença entre períodos para os organismos do estuário médio e nem entre locais para nenhum período amostrado.



**Figura 8:** Lipoperoxidação em brânquias de *Ucides cordatus* (n=14–36 indivíduos). Valores expressos em mediana±quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

A temperatura estável em torno de 27°C ao longo de todos os períodos climáticos é típica de regiões tropicais, influenciada diretamente pela baixa variação na insolação na Amazônia (Monteiro et al., 2015). O pH neutro é característico de estuários amazônicos de águas brancas ricas em nutrientes (Bleich et al., 2014).

Os maiores níveis de oxigênio dissolvido registrados no estuário superior durante o período de transição I e estiagem são esperados uma vez que a taxa de dissolução de oxigênio na água é maior em salinidades baixas (Boyd, 1989) mostrando que mesmo em condições de decréscimo de pluviosidade ou instabilidade das águas a região de alto estuário é mais fracamente influenciada pela entrada de água do mar do que outras porções do estuário.

A condutividade maior em pontos de grande e média influência estuarina juntamente com maiores níveis de salinidade, sobretudo durante o transição II onde houve pico de ambos os parâmetros, demonstram que há a formação de uma gradiente ao longo do estuário de acordo com a distância em relação à desembocadura. Tal gradiente fica evidente nas medidas de salinidade dos três pontos durante os períodos de transição I, estiagem e chuvoso onde visualiza-se claramente que o ponto localizado no baixo estuário apresenta os maiores valores, o ponto localizado no médio estuário apresenta valores intermediários e o ponto localizado no alto estuário apresenta valores muito baixos em torno

de 0. Assim, o estuário de estudo se adequa ao modelo de estratificação horizontal proposto no clássico trabalho de Dionne (1963).

O pico de salinidade observado durante o estiagem e transição II e as baixas durante o chuvoso estão relacionadas às oscilações de pluviosidade que ocorreram durante o ano, uma vez que os parâmetros físico-químicos são altamente dependentes da pluviosidade (Esteves, 1998). Assim, as chuvas influenciam diretamente a composição iônica da água mudando esse panorama sazonalmente e ratificando a divisão em quatro períodos climáticos distintos como ocorreu no presente estudo.

#### 4.2. BIOMETRIA

Observou-se que os padrões biométricos dos animais parecem não ser influenciados pela demanda fisiológica imposta pelo meio, uma vez que os animais do estuário inferior apresentaram menor altura durante a estiagem e altos valores durante períodos de baixa salinidade como chuvoso e transição I. Tais resultados reforçam a característica eurihalina já conhecida dessa espécie que possui potente capacidade osmoregulatória podendo tanto hipo quanto hiperosmorregular (Martinez et al., 1999) adaptando-se com êxito em uma ampla faixa de salinidade (Santos & Salomão, 1985).

Os animais do estuário médio apresentaram por sua vez valores de peso e largura superiores durante o período de transição I em relação aos períodos de estiagem e chuvoso respectivamente. Os períodos de transição caracterizam-se por inconstâncias das condições da água. Por estarem localizados no médio estuário esses organismos sofrem grande influência tanto das águas marinhas que entram no estuário como das águas advindas das chuvas, configurando-se como uma zona de instabilidade e mistura das massas d'água. Essa zona se caracteriza pelo estabelecimento de gradientes químico, físico e biológico fortes (Day et al., 1989) podendo ainda ser subdividida de acordo com a proximidade à região tidal ou desembocadura (Dionne, 1963). A sobrevivência em ambientes instáveis como manguezais favoreceu o aparecimento de mecanismos fisiológicos que minimizam os efeitos das oscilações abióticas (Bamber & Depledge, 1997), portanto, estão fisiologicamente adaptados à mudanças expressivas e constantes dos parâmetros físico-químicos da água. Assim, não há comprometimento do gasto energético do crescimento e mudas durante as estações de transição como observado em organismos provenientes de ambientes mais restritos à baixas ou altas salinidades.

É válido ressaltar ainda que de modo geral não foram observadas grandes mudanças entre períodos climáticos para animais de nenhum local de coleta. Sugerindo-se assim que a plasticidade fisiológica da espécie já anteriormente mencionada previne o comprometimento da alocação energética para o crescimento e outras funções vitais.

Normant et al. (2012) em estudo sobre os efeitos da salinidade na bioenergética do caranguejo *Eriocheir sinensis* afirmam que a eurihalidade implica em custos energéticos que afetam outras atividades como a taxa de oxigênio, consumo e assimilação de comida e excreção. No entanto, concluíram que a espécie em questão, que é eurihalina, não teve sua alimentação e assimilação de comida afetada pela salinidade ao contrário do que é largamente descrito na literatura para espécies marinhas como siris *Callinectes*, podendo o mesmo estar ocorrendo com o *Ucides cordatus* no presente trabalho.

#### 4.3. BIOMARCADORES

Sabe-se que o caranguejo *Ucides cordatus* é um hipo-hiper-osmorregulador forte, ou seja, consegue aumentar ou diminuir as concentrações osmóticas de seus fluidos extracelulares em uma ampla faixa de salinidade, geralmente de 2–33 (Martinez et al., 1999). É muito bem adaptado aos ambientes estuarinos, mas sabe-se que atinge seu ponto isosmótico em salinidades em torno de 20 (Leite & Zanotto, 2013).

No presente estudo observou-se que os organismos do estuário inferior apresentaram diminuição da ACAP, GSH, GCL e do LPO durante os períodos de estiagem e transição II (pico de salinidade). Como neste local os organismos estão expostos continuamente a salinidades próximas ao nível do mar, estão melhor adaptados a meios hipertônicos em relação ao seu meio interno havendo, portanto, menor demanda osmorregulatória e metabólica. Logo, é válido dizer que salinidades maiores propiciam situações energeticamente menos dispendiosas para os animais deste local.

Adicionalmente observou-se comportamento contrário dos biomarcadores durante períodos de diluição das águas, sobretudo no período chuvoso, em relação aos períodos de aumento de salinidade para os animais do estuário inferior. Houve indução das defesas antioxidantes e do dano oxidativo sugerindo que salinidades baixas geram aumento na demanda metabólica. Nos crustáceos decápodos os ajustes da concentração osmótica requerem muita energia gerando alterações do metabolismo (Chen et al., 1997; Luvizotto-Santos et al., 2003) e aumento do gasto energético que é diretamente relacionado com a geração de espécies reativas de oxigênio (Silveira, 2008). Para Paital & Chainy (2010) alterações de salinidade podem ainda potencializar o estresse oxidativo e desequilibrar as defesas antioxidantes em caranguejos como *Scylla serrata*.

Durante o período de transição I os animais do estuário inferior apresentaram atividade de GST superiores ao estuário superior sugerindo indução das defesas antioxidantes frente à instabilidade hidrodinâmica do período de transição. Como a porção inferior localiza-se próximo à desembocadura no oceano os animais sofreriam menos variações com os ciclos de maré que ocorrem diariamente, enquanto os animais da porção

superior estariam mais susceptíveis às mudanças diárias impostas pelos ciclos por suas águas residentes serem hiposalinas.

Freire et al. (2011a) em estudo experimental com os siris *Callinectes* submetidos à estresse salino concluíram que *C. ornatus* por ser mais restrita ao ambiente marinho ativa suas defesas antioxidantes mais proeminentemente à medida que as condições ambientais mudam, do que quando comparada à *C. danae*, que é mais largamente distribuída em diferentes faixas de salinidade. Tal situação pode estar ocorrendo com os animais do estuário inferior no presente estudo, sujeitos a menores variações de salinidade.

Já no estuário superior houve o mesmo padrão de resposta: diminuição tanto dos biomarcadores de exposição quanto do de efeito durante períodos mais salgados e aumento durante períodos de água mais diluídas. Muito embora os organismos deste local estejam mais expostos à salinidades baixas, a espécie em questão como a maior parte dos crustáceos originou-se na água marinha com posterior invasão da água doce (Schubart et al., 1998) carregando em si ainda fatores genéticos que conduzem seu metabolismo para adaptações a águas salinas.

Além disso, os ciclos de marés, que promovem a mistura contínua das massas d'águas, podem ter um papel chave no direcionamento dos biomarcadores fazendo com que diferenças espaciais dentro do estuário não sejam tão visíveis do ponto de vista fisiológico. As variações da maré juntamente com as correntes de enchente e vazante são as principais responsáveis pelas características do estuário (Vaz & Dias, 2008) afetando todos os parâmetros físico-químicos da água, sobretudo a salinidade (Phlips et al., 2002).

No entanto, é válido ressaltar que sua ocorrência em baixas salinidades na Amazônia aponta então para uma adaptação fisiológica local. Isso pode estar ligado à sua capacidade osmorregulatória em uma ampla faixa de salinidade de 2-33 (Martinez et al., 1999) conferindo-lhe caráter eurihalino e potencial fisiológico para o estabelecimento em diversos ambientes. Para Lucu et al. (2000) muitos crustáceos invadiram com êxito os ambientes de água doce e salobra através de um conjunto de mecanismos fisiológicos que se desenvolveram ao longo de sua história evolutiva.

Observa-se ainda que para GST e GSH houve aumento da atividade e concentração, respectivamente, durante o período de estiagem. Este resultado pode estar associado ao efeito combinado das condições hiposmóticas do meio em que os animais estão inseridos, que naturalmente aumenta a demanda osmorregulatória, concomitantemente com os eventos de muda que ocorrem geralmente nessa estação.

Segundo Andrade et al. (2011) durante o ciclo de muda ocorre aumento do acúmulo de água nos tecidos. O transporte de água pela membrana intensifica a regulação do volume celular (Chen et al., 2012) e as células de decápodos de água doce apresentam

maquinário metabólico elevado para lidar com os estresses hiposmóticos, sejam provenientes do meio externo ou pela diluição da hemolinfa (Foguesatto et al., 2017).

Salienta-se ainda que o aumento da atividade da GST durante o período de estiagem ocorreu para organismos de todos os locais apontando para um papel importante desta enzima na mitigação de danos advindos dos custos energéticos da muda. A GST além de atuar como enzima de biotransformação, pode desempenhar funções de um antioxidante (conjugando produtos de processos pró-oxidantes) fornecendo proteção às células (Prohaska, 1980).

Alguns estudos já apontaram para variação enzimática durante diferentes estágios da muda em braquiúros (Zou & Fingerman, 1999). Porém, Hotard & Zou (2008) em estudo acerca da variação da GST em hepatopâncreas do caranguejo *Uca pugilator* durante o ciclo de muda não verificaram alterações de atividade e concluíram que esta enzima pode ser usada como biomarcador em qualquer fase da muda. Essa ambigüidade de resposta pode estar relacionada ao fato da modulação do sistema de defesa antioxidante variar de acordo com a espécie quanto com o tecido analisado (Crawford et al., 2000).

Assim, esse aumento de atividade da GST verificado durante o período da estiagem e chuvoso para animais deste local parece estar relacionado à grande efetividade de seu aparato metabólico frente às mudanças de condições contínuas impostas pela sazonalidade enquanto mudanças acentuadas, porém descontínuas- como as que ocorrem nos períodos de transições- parecem ser mais facilmente assimiladas pelo sistema de defesa antioxidante.

Leite & Zanotto (2013) concluíram que animais de ambientes de água doce apresentam taxa de transporte mais efetiva do íon cálcio (afinidade e velocidade máxima da reação superiores) em relação a animais estuarinos, apresentando assim maquinário osmorregulatório mais eficaz.

Os organismos do estuário médio apresentaram resposta com padrão semelhante aos demais pontos. No entanto, a não diferenciação entre estações para o dano em lipídeos aponta para a plasticidade fisiológica e eurihalidade dos animais deste local uma vez que se encontram em uma região do estuário caracterizada por alta mistura de águas marinhas e doces. Logo, são capazes de manter o equilíbrio energético entre as funções basais e o sistema redox, e sabe-se que espécies mais eurihalinas possuem naturalmente altos padrões basais de atividade de enzimas antioxidantes (Freire et al., 2011a).

Desta maneira, o presente estudo de forma geral aponta a sazonalidade como fator fundamental no comportamento dos biomarcadores analisados, uma vez que são afetados pelo ciclo fisiológico natural dos organismos (Vidal-Liñán et al., 2010).

## 5. CONCLUSÃO

A modulação dos biomarcadores é sazonal, porém os históricos de condições físico-químicas parecem direcionar a sensibilidade dos organismos às mudanças sazonais. Além disso, no período sazonal de Transição seco-chuvoso houve baixa de todos os biomarcadores principalmente para organismos do estuário inferior e médio demonstrando conforto metabólico para os organismos. É prudente ressaltar que a baixa nas defesas antioxidantes pode ter duas interpretações em condições de exposição à futuras fontes antrópicas: pode representar aumento da vulnerabilidade a compostos tóxicos, que ficam mais biodisponíveis em salinidades baixas, ou pode permitir investimento energético em detoxificação, uma vez que o meio não está exigindo altos níveis de compensação fisiológica.

Assim, os organismos apresentaram plasticidade fisiológica e eurihalinidade que são características de viabilidade de uso da espécie em programas de biomonitoramento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amado, L.L.; Longaray Garcia, M.; Ramos, P.B.; Freitas, R.F.; Zafalon, B.; Ribas Ferreira, J.L.; Yunes, J.S.; Monserrat, J.M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407: 2115–2123.

Amorim, L.C., 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 6, 158–170.

Amouroux, J.M.; Tavares, M. 2005. Natural recovery of Amazonian mangrove forest as revealed by brachyuran crab fauna: preliminary description. *Vie Milieu*. 55(2): 71–79.

Andrade, S.F.; Matos, T.B.; Carvalho, C.E.V. 2011. Seasonal variation of heavy metals in muscles of the crab *Callinectes ornatus* (Ordway, 1863) from a tropical coastal lagoon, Brazil. *Revista Virtual de Química*. 3(2):129–137.

Anger, K., 2001. *The biology of decapod crustacean larvae*, fourteenth ed., AA Balkema Publishers, Lisse.

Bainy, A.C.D.; Saito, E.; Carvalho, P.S.M.; Junqueira, V.B.C. 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*. 34: 151–162.

Bamber, S.D.; Depledge, M.H. 1997. Responses of shore crabs to physiological challenges following exposure to selected environmental contaminants. *Aquatic Toxicology*. 40:79–92.

Barbier, E.B., S.D.Hacker, C.Kennedy, E.W.Koch, A.C.Stier, and B.R.Silliman. 2011. "The Value of Estuarine and Coastal Ecosystem Services. *Ecological Monographs*. 81(2): 169–193.

Blankensteyn, A.; Cunha-Filho, D.; Freire, A.S. 1997. Distribuição dos estoques pesqueiros e conteúdo protéico do caranguejo do mangue *Ucides cordatus* (L. 1763) (Brachyura, Ocypodidae) nos manguezais da Baía das Laranjeiras e Adjacências, Paraná, Brasil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. 40(2): 331–349.

Boeuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 130: 411–423.

Boyd, C.E. Water quality management aeration and shrimp farming. 1989. Fisheries and Allied, Aquaculture, Auburn University Agricultural Experimental Station, Departmental Series, Alabama, USA, 21–83pp.

Bleich, M.E.; Piedade, M. T. F.; Knopki, P. B.; Castro, N. G. D. de; Jati, S. R.; Sousa, R. N. de. 2014. Influência das condições do habitat sobre a estrutura de herbáceas aquáticas na região do Lago Catalão, Manaus, AM. *Acta Amazonica*. 44(4):481–490.

Burdon, R.H. *Genes in the Environment*. 1999, Taylor & Francis Inc., Philadelphia, PA.

Carajaville, M. P.; Robledo, Y.; Etxeberria, M.; Marigomez, I. 1995. Cellular markers as useful tol in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. In *cell biology in environmental toxicology*. M. Carajaville Edit, Univ. Pais Vasco, Bilbao, 29–55 pp.

Chen, J.C.; Chia P.G. 1997. Osmotic and ionic concentrations of *Scylla serrata* (Forska) subjected to different salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 227: 239–244.

Crawford, D.R.; Suzuki, T.; Davies, K.J.A. 2000. Redox regulation of gene expression, in: Sen, C.K., Sies, H., Baeuerle P.A. (Eds), *Antioxidant and redox regulation of gene*. Academic Press, San Diego, 21–45 pp.

Day, J.; Hall, C.; Kemp, M.; Yanez-Arancibia, A. 1989. *Estuarine Ecology*. Wiley-Interscience Publications. John Wiley and Sons, New York.

Depledge, M.H.; Aagaard, A.; Györkös, R. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*. 31:19–27.

Dionne, J. C. 1963. Towards a more adequate definition of the St. Lawrence Estuary. *Geomorphology*.

Esteves, F.A., 1998. *Fundamentos de limnologia*. Interciência, Rio de Janeiro, Brasil.

Foguesatto, K.; Boyle, R.T.; Rovani, M.T.; Freire, C.A.; Souza, M.M. 2017. Aquaporin in different moult stages of a freshwater decapod crustacean: Expression and participation in muscle hydration control. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 208:61–69.

Freire, C.A., Togni, V.G., Hermes-Lima, M., 2011a. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 160: 291–300.

Freire, C. A.; Welker, A.; Storey, J. M. & Hermes-Lima, M. 2011b. Oxidative stress in estuarine and intertidal species. In: Abele, D.; Zenteno-Savin, T. & Vásquez-Medina, J. P. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, New York, Wiley-Blackwell. 41-57 pp.

Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assay for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods in Enzymology*. 77: 398–405.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biological Chemistry*. 249: 7130–7139.

Halliwell, B.; Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142(2): 231–255.

Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K. B., 1995. Quantification of the lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylene orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 19, 271–280.

Hotard, S.; Zou, E. 2008. Activity of Glutathione-S-transferase in the Hepatopancreas is not influenced by the molting cycle in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 81:242–244.

Ivo, C.T.C.; Vasconcelos, S.E.M. de. 2000. Potencial reprodutivo do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), capturado na região estuarina do rio Curimataú (Canguaretama, Rio Grande do Norte, Brasil). *Boletim Técnico Científico do CEPENE*. 8 (1): 45–53.

Leite, V.P.; Zanotto, F.P. 2013. Calcium transport in gill cells of *Ucides cordatus*, a mangrove crab living in variable salinity environments. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 166:370–374.

Lignot, J.H.; Spanings-Pierrot, C.; Charmantier, G. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. 2000. *Aquaculture*, 191:209–245.

Lindquist, E.S.; Krauss, K.W.; Green, P.T.; O'dowd, D.J.; Sherman P.M.; Smith III, T.J. 2009. Land crabs as key drivers in tropical coastal forest recruitment. *Biological Reviews*, 84:203–223.

Lucu, C.; Devescov, M.; Skaramuca, B.; Kozul, B. 2000. Gill (Na, K)-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 246: 163–178.

Luvizotto-Santos, R.; Lee, J.T.; Branco, Z.P.; Bianchini, A.; Nery, L.E.M. 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *Journal of experimental Zoology, Part A*. 295: 200–205.

Martinez, C. B. R.; Alvares, E. P.; Haris, R. R.; Santos, M. C. F. 1999. A morphological study on posterior gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. *Tissue Cell*. 31(3):380–389.

Monserat, J. M.; Geracitano, L. A.; Pinho, G. L. L.; Vinagre, T. M.; Faleiros, M.; Alciati, J. C. & Bianchini, A. 2003. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylene orange complex formation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45:177-183.

Monserat, J.M.; Martínez, P.E.; Geracitano, L.A.; Amado, L.L.; Martins, C.M.; Pinho, G.T.L.; Chaves, I.S.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-Lima, J.; Bianchini, A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*. 146(1–2):221–34.

Monteiro, S.M.; El-Robrini, M.; Alves, I.C.C. 2015. Seasonal dynamics of nutrients in an Amazon estuary. *Mercator*. 14(1):151–162.

Nordhaus, I.; Wolff, M.; Diele, K.. 2006. Litter processing and population food intake of the mangrove crab *Ucides cordatus* in a high intertidal forest in northern Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 67: 239–250.

Normant, M.; Król, M.; Jakubowska, M. 2012. Effect of salinity on the physiology and bioenergetics of adult chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 416 – 417: 215 –220.

Paital, B., Chainy, G.B.N., 2010. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*. 151: 142–151.

Pham, D.; Charmantier, G.; Boulo, V.; Wabete, N.; Ansquer, D.; Dauga, C.; Grousset, E.; Labreuche, Y.; Charmantier-Daures, M. 2016. Ontogeny of osmoregulation in the Pacific blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (Decapoda, Penaeidae): Deciphering the role of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, in press.

Phlips, E.J.; Badylak, S.; Grosskopf, T. 2002. Factors affecting the abundance of phytoplankton in a restricted subtropical lagoon, the Indian river lagoon, Florida, USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 55: 385-402.

Prohaska, J.R., 1980. The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferase. *Biochimica and Biophysica Acta*. 611: 87 – 98.

Santos, M.F.C; Salomão, L.C. 1985. Haemolymph osmotic and ionic composition in the gecarcinid crab *Ucides cordatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 81:581–583.

Schubart, C.D.; Diesel, R.; Hedges, S.B. 1998. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature*. 393:363–365.

Shami, N. J. I. E.; Moreira, E. A. M. 2004. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, 17(2):227–236.

Silveira, L.R.; Hirabara, S.M.; Lambertucci, R.H.; Leandro, C.V.; Fiamoncini, J.; Pinheiro, C.H.J.; Anielle, C.; D'Angelo, A.; Bassit, R.A.; Pithon-Curi, T.C.; Curi, R. 2008. Regulação

metabólica e produção de espécies reativas de oxigênio durante a contração muscular: efeito do glicogênio na manutenção do estado redox intracelular. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 14(1).

Smith, S.V.; Swaney, D.P.; Talaue-McManus, L.; Bartley, J.D.; Sandhei, P.T.; McLaughlin, C.J.; Dupra, V.C.; Crossland, C.J.; Buddemeier, R.W.; Maxwell, B.A.; Wulff, F. 2003. Humans, hydrology, and the distribution of inorganic nutrient loading to the ocean. *Bioscience*. 53:235.

Sogorb, M.A.; Estévez, J.; Vilanova, E., 2014, in: Gupta, R.C. (ed.), *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press, 965–973 pp.

Urbina, M.A, Glover, C.N., 2015. Effect of salinity on osmoregulation, metabolism and nitrogen excretion in the amphidromousfish, inanga (*Galaxias maculatus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 473: 7–15.

Vaz, N.; Dias, J. M. 2008. Hydrographic characterization of an estuarine tidal channel. *Journal of Marine System*. 70:168–181.

Vidal-Linán, L., Bellas, J., Campillo, J.A., Beiras, R. 2010. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovinciales*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW, Spain). *Chemosphere*. 78(3): 265–272.

White, C.C.; Viernes, H.; Krejsa, C.M.; Botta, D.; Kavanagh, T.J.2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Analytical Biochemistry*. 318:175–180.

Zar, J. H., 1984. *Biostatistical analysis*, 2<sup>o</sup> ed. Prentice Hall, New Jersey.

Zou, E.; Fingerman, M. 1999. Chitobiase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator* during the molting cycle. *Marine Biology*. 133:97–101.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Mapa com a localização geográfica da área da Baía do Japerica (ao norte do Município de Primavera), indicando os três locais de coleta na Baía de Japerica. (Fonte: Johnata Azevedo).....10
- Figura 2:** Precipitação em Salinópolis, PA de março/13 a março/2014. As setas indicam os meses de coleta dos organismos. A barra destacada em preto corresponde à maior precipitação. (Fonte: INMET).....13
- Figura 3:** Precipitação em Salinópolis, PA de Março/13 a fevereiro/2014 representada pelas barras. As setas indicam os meses de coleta dos organismos. A linha representa os valores médios de salinidade de todos os pontos de coleta para cada período climático escolhido (Fonte:INMET).....15
- Figura 4:** Capacidade antioxidante total em brânquias de *Ucides cordatus* (n=14–34 indivíduos). Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....18
- Figura 5:** Atividade da Glutathione-S-transferase em brânquias de *Ucides cordatus* (n=18–36 indivíduos). Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....19
- Figura 6:** Concentração de Glutathione reduzida em brânquias de *Ucides cordatus* (n=7–36 indivíduos). Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....20
- Figura 7:** Atividade da Glutamate Cysteine Ligase em brânquias de *Ucides cordatus* (n=4–28 indivíduos). Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas

diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....21

**Figura 8:** Lipoperoxidação em brânquias de *Ucides cordatus* (n=14–36 indivíduos). Valores expressos em mediana±quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....22

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1:** Parâmetros físico-químicos da água ao longo de quatro períodos sazonais na Baía de Japerica, PA. Os dados são apresentados como os valores registrados na maré baixa e maré alta. (Temp. = Temperatura; OD= Oxigênio dissolvido; Conduct.= Condutividade; Sal.= Salinidade; Est. Inf.= Estuário Inferior; Est. Med.= Estuário Médio; Est. Sup.= Estuário Superior).....15

**Tabela 2:** Biometria de *Ucides cordatus* para todos os locais ao longo de quatro períodos sazonais. Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre períodos para um mesmo local e as letras minúsculas diferentes representam diferenças entre locais em um mesmo período.....17

## **CAPÍTULO 2**

### **MODULAÇÃO NATURAL DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA OSTRA-DO-MANGUE *CRASSOSTREA SP.* (BIVALVIA, OSTREIDAE): O PAPEL DA SAZONALIDADE NESTAS RESPOSTAS BIOQUÍMICAS**

**Modulação natural de biomarcadores de estresse oxidativo na ostra-do-mangue *Crassostrea sp.* (Bivalvia, Ostreidae): O papel da sazonalidade nestas respostas bioquímicas**

Carla Carolina Miranda dos Santos<sup>a,b</sup>, Jorge Felipe Medeiros da Costa<sup>b</sup>, Lílian Lund Amado<sup>a,b</sup>, Cléverson Rannieri Meira dos Santos<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Ecotoxicologia (ICB) e Laboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho (LAPMAR), Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, 66075110, Belém, Pará, Brasil.

<sup>c</sup> Museu Paraense Emílio Goeldi, Av. Perimetral, 1901, Terra Firme, 66077830, Belém, PA, Brasil.

## **RESUMO**

O estuário da Baía do Japerica no estado do Pará manteve-se em condições prístinas por muitos anos. Nesse contexto, estudos de biomonitoramento que caracterizem as condições dos organismos frente a variação natural do ambiente são imprescindíveis para futuras análises de impacto decorrentes de ações antrópicas. O presente estudo objetiva caracterizar a modulação natural de biomarcadores bioquímicos em ostras *Crassostrea sp.* provenientes desta baía. As coletas foram realizadas ao longo de um ano nos períodos de transição chuvoso-seco (Junho/2013), estiagem (Setembro/2013), transição seco-chuvoso (Novembro/2013) e chuvoso (Fevereiro/2014) no estuário inferior e superior. Como biomarcadores de exposição foram avaliadas a atividade da glutathione-S-transferase (GST) e a capacidade antioxidante total (ACAP), como biomarcador de efeito foi analisada a peroxidação lipídica (LPO). Nas brânquias observou-se diminuição da GST durante o período chuvoso para ambos os locais e indução durante o pico de salinidade (transição seco-chuvoso) para os organismos do estuário superior, os menores níveis de LPO ocorreram durante o período de estiagem para animais de ambos os pontos. Houve indução da ACAP no músculo durante o período de transição chuvoso-estiagem em relação ao período de estiagem e transição estiagem-chuvoso para organismos do estuário inferior e não houve diferenças para GST sugerindo baixa sensibilidade do tecido. Houve aumento da LPO durante o período chuvoso em relação ao transição chuvoso-seco para animais do estuário inferior. Os biomarcadores em brânquias sugerem desafio metabólico durante o período chuvoso e estabilidade durante a estiagem. A espécie apresenta grande viabilidade de uso em biomonitoramentos.

**Palavras-chave:** sistema de defesa antioxidante, lipoperoxidação, estuário

## Natural modulation of oxidative stress biomarkers in mangrove oyster *Crassostrea* sp. (Bivalvia, Ostreidae): The role of seasonality in these biochemical responses

Carla Carolina Miranda dos Santos<sup>a,b</sup>, Jorge Felipe Medeiros da Costa<sup>b</sup>, Lílian Lund Amado<sup>a,b</sup>, Cléverson Rannieri Meira dos Santos<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Ecotoxicologia (ICB) e Laboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho (LAPMAR), Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, 66075110, Belém, Pará, Brasil.

<sup>c</sup> Museu Paraense Emílio Goeldi, Av. Perimetral, 1901, Terra Firme, 66077830, Belém, PA, Brasil.

### ABSTRACT

The estuary of the Japerica Bay in the state of Pará has remained in pristine condition for many years. In this context, biomonitoring studies that characterize the conditions of the organisms against the natural variation of the environment are essential for future impact analyzes due to anthropic activity. The present study aims to characterize the natural modulation of biochemical biomarkers in oysters *Crassostrea* sp. from this bay. The collections were carried out throughout one year at rainy-dry transitional period (June / 2013), dry period (September/2013), dry-rainy transitional period (November / 2013) and rainy period (February / 2014) in the lower and upper estuary. The activity of glutathione-S-transferase (GST) and total antioxidant capacity (ACAP) were evaluated as biomarkers of exposure and lipid peroxidation (LPO) as an effect biomarker. In gills, GST decreased during the rainy season for both sites and raised during the salinity peak (dry-rainy transitional period) for upper estuary's organisms, the lowest levels of LPO occurred during the dry season for both points. There was induction of ACAP in muscle during the rainy-dry transitional period in relation to the dry and dry-rainy transitional periods for lower estuary's organisms and there were no differences for GST suggesting low tissue sensitivity. There was an increase in LPO during the rainy season in relation to the rainy-dry transitional period for lower estuary's animals. Biomarkers in gills suggest metabolic challenge during the rainy season and stability during dry season. The specie shows high viability of use in biomonitoring programs.

**Key-word:** *antioxidant defense system, lipid peroxidation, estuary*

## 1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas costeiros apresentam características físico-químicas marcantes destacando-se a salinidade ambiental, pois afeta a biodisponibilidade de elementos tóxicos presente no meio e também a fisiologia dos organismos aquáticos (Urbina & Glover, 2015).

Uma das principais adaptações dos organismos estuarinos às amplas variações de salinidade são estratégias de regulação osmótica como a osmoconformação que visa o ajuste dos níveis osmóticos internos do organismo em relação ao meio (Schmidt-Nielsen, 1997). Assim, alterações osmóticas no meio afetam diretamente a taxa de funcionamento metabólico incluindo os custos associados com a regulação osmótica que é energeticamente dispendiosa (Urbina & Glover, 2015).

Processos que demandam um aumento na produção de ATP contribuem para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) advindas do metabolismo oxidativo (Burdon, 1999). Sendo assim, o desbalanço entre moléculas pró-oxidantes e moléculas antioxidantes de defesa do organismo é denominado estresse oxidativo (Perrone et al., 2010).

Somado aos custos energéticos naturais, vários estudos na literatura reportam eventos de doenças e morte de organismos em ambientes costeiros (Kannan et al., 2005) devido ao crescente impacto por atividades antrópicas (Santos et al., 2009) aumentando assim a necessidade de aplicação de programas de monitoramento que visem acessar as condições do meio e de seus organismos.

Nesse contexto, biomonitoramento são análises da saúde ambiental utilizando amostras dos tecidos e fluídos de um organismo uma vez que que fontes estressoras, sejam naturais ou sintéticas, deixam marcadores que refletem a exposição dos organismos (Zhou et al., 2008). Para tal, utilizam-se como ferramentas nessa avaliação os biomarcadores que são definidos como alterações moleculares, celulares, histopatológicas, fisiológicas e comportamentais frente à exposição ou efeito de um xenobiótico (Lam & Gray, 2003) ou alteração de condições do meio (Monserat et al., 2007).

Os resultados dessas medidas fornecem informações sobre as respostas biológicas frente às substâncias químicas naturais ou sintéticas que são absorvidas pelos organismos e os correspondentes efeitos induzidos (Zhou et al., 2008). Desta forma, podem indicar a exposição e avalia-la (biomarcadores de exposição), além de elucidar os efeitos deletérios da exposição (biomarcadores de efeito) (Sogorb et al., 2014).

Dentre os moluscos de áreas costeiras, as ostras-do-mangue pertencentes ao gênero *Crassostrea* são muito abundantes e economicamente relevantes servindo de fonte de alimentação e renda para muitas populações (Costa, 1985). Diversas características as tornam bons biomonitores como sua ampla distribuição geográfica e fácil acesso no

ambiente natural ou através da aquicultura (Fernández et al., 2012); apresentam hábito bentônico e são filtradores de baixa mobilidade, o que permite contato direto com o sedimento refletindo assim a realidade local do ambiente (Monserrat et al., 2003b).

Nas regiões Norte e Nordeste existem duas espécies nativas largamente distribuídas, são elas *Crassostrea gasar* (= *C. brasiliiana*) e *C. rhizophorae* ambas muito cultivadas na aquicultura (Melo et al., 2010) ocorrendo simpatricamente na natureza (Ignácio et al., 2000). Segundo Lam & Morton (2003) a identificação morfológica das espécies *Crassostrea* através da utilização das valvas é muito difícil devido à grande variabilidade e influência do meio nas dimensões e desenvolvimento das mesmas, potencializando o uso de ambas as espécies em estudos.

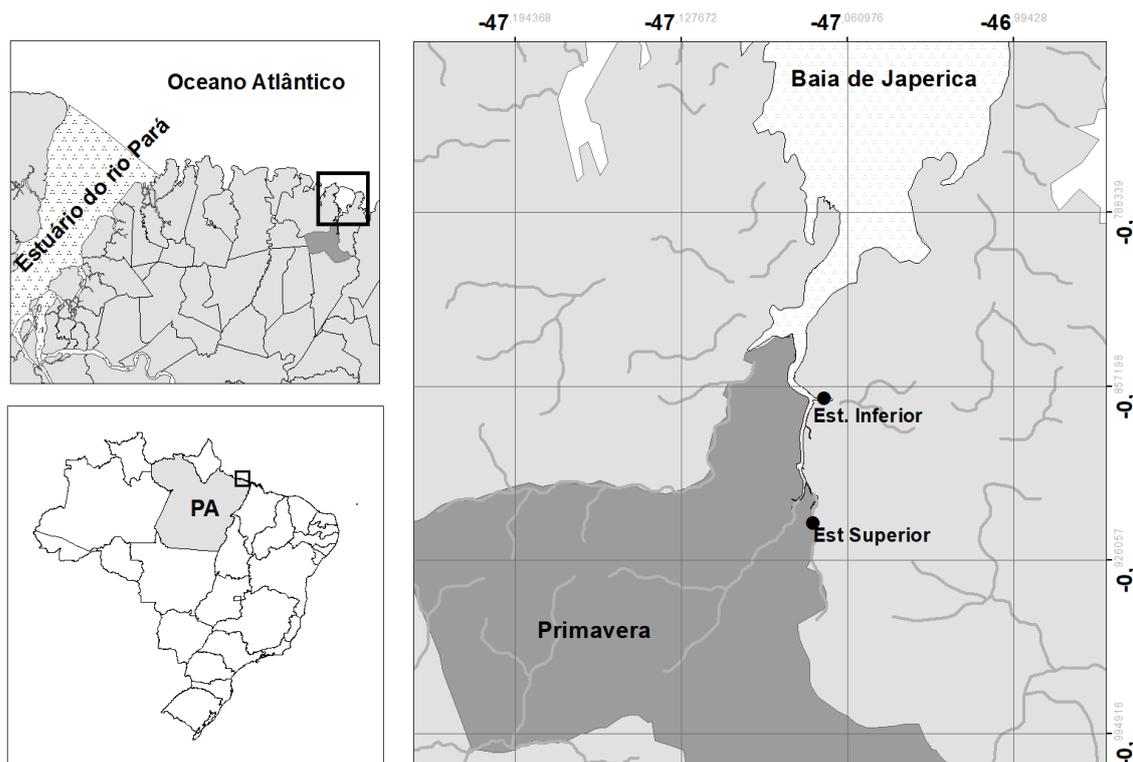
Uma grande controvérsia em biomonitoramentos de ambientes estuarinos é a ambiguidade de resultados advindas das variações físico-químicas naturais. Segundo Witters (1998) somada à presença de poluentes, há o aumento da demanda metabólica nos animais que ali vivem uma vez que flutuações físico-químicas influenciam a biodisponibilidade de muitos compostos tóxicos sendo, portanto, de suma importância conhecimentos acerca da modulação natural de marcadores biológicos prévios aos impactos antrópicos.

Logo, o presente estudo tem como objetivo caracterizar a modulação sazonal de biomarcadores de estresse oxidativo em ostras *Crassostrea* sp. ao longo de um ano, no estuário amazônico da Baía de Japerica.

## **2 .METODOLOGIA**

### **2.1. ÁREA DE ESTUDO**

A Baía do Japerica é um estuário localizado no nordeste do Pará, dentro da microrregião do “Salgado paraense” da zona costeira amazônica, caracterizada por estuários de baixa descarga fluvial devido à grande influência do Oceano Atlântico. Um dos principais municípios banhados por essa baía é o município de Primavera que possui diversos manguezais, havendo entrada de águas de diversos rios até a sua desembocadura no Oceano Atlântico.



**Figura 1.** Mapa com a localização geográfica da área da Baía do Japerica (ao norte do município de Primavera), indicando os dois locais de coleta de amostragem na Baía de Japerica: A) Estuário inferior- 00° 51' 43.7" S, 47° 04' 12.4" W; B) Estuário superior -00° 54' 41.7" S; 47° 04' 28.6" W.

Para atingir os objetivos propostos, foram escolhidos dois locais de acordo com o gradiente de salinidade. Assim, os pontos de coleta consistem nos manguezais denominados: A) Estuário inferior, área sob condições de maior salinidade e maior distância em relação ao município de Primavera; B) Estuário superior e próximo ao município de Primavera (Figura 1). Ressalta-se ainda que próximo a montante do estuário da Baía do Japerica, na época das coletas deste estudo, estava em construção uma fábrica de cimento que foi inaugurada em abril de 2016. Logo, a seleção dos pontos também segue um gradiente de influência em relação ao centro de futuras atividades antrópicas, o município de Primavera.

As coletas ocorreram trimestralmente ao longo de um ano sendo: Período de transição I (Transição chuvoso-estiagem, Junho/2013), período de estiagem (Setembro/2013), período de transição II (Transição estiagem-chuvoso, Novembro/2013) e período chuvoso (Fevereiro/2014). Os meses de coleta foram selecionados baseados em dados de precipitação pluviométrica retirados da estação do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) localizada na cidade de Salinópolis, que dista cerca de 56 Km de Primavera.

## 2.2. ATIVIDADES DE CAMPO

A técnica de coleta dos organismos (20–30 indivíduos) foi por catação manual livre durante a maré de baixa-mar. Logo após a captura, os indivíduos foram crioanestesiados em gelo (0°C) de maneira que se minimize o estresse nos animais e se preserve as características metabólicas dos mesmos. Destaca-se que apesar do presente estudo não ter identificado os indivíduos à nível de espécie, foram coletados animais dentre as duas possíveis dentro do gênero *Crassostrea* (*Crassostrea gasar* e *C. rhizophorae*), uma vez que a área de coleta dentro de cada ponto escolhido foi padronizada. Também foi priorizado no esforço de coleta os animais maiores.

No momento de cada coleta (maré baixa) foram registrados os parâmetros físico-químicos da água em todos os pontos de amostragem como salinidade, pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura da água.

## 2.3. ATIVIDADES DE LABORATÓRIO

Em laboratório, no mesmo dia da coleta, os animais foram mensurados com um paquímetro (0,01 mm), sendo as dimensões analisadas: a maior largura das valvas em vista frontal, comprimento e altura das valvas. Os animais foram também pesados em balança semi-analítica (0,01g) onde inicialmente mediu-se o peso total dos organismos e em seguida somente o peso das valvas (após a retirada dos tecidos dos animais) afim de se obter o peso mole. Foram retiradas as brânquias e porções de músculo adutor e imediatamente acondicionados em tubos tipo eppendorf para armazenamento em ultra-freezer (-80°C) até o momento das análises bioquímicas.

### 2.3.1. Preparo dos homogeneizados para dosagens bioquímicas

As amostras de brânquias foram homogeneizadas (1:4, p/v) em tampão com pH ajustado para 7,6 segundo a metodologia de Bainy et al. (1996). Os homogeneizados foram centrifugados a 20.000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado, aliqotado e acondicionado a -80°C até o momento das dosagens.

### 2.3.2. Determinação de Proteínas Totais

A análise de proteínas totais foi realizada com kit comercial (Doles Ltda, Brazil) baseado no teste Biureto (citrato-trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M e sulfato de cobre 0,01M) para proteínas, as leituras foram realizadas em leitor de microplacas

multimodal (Victor X3, Perkin Elmer) a 550 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de proteínas/mL.

### **2.3.3. Determinação da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil**

A capacidade antioxidante total contra radicais peroxil foi analisada o seguindo o método de Amado et al. (2009). As leituras foram realizadas em leitor de microplaca de fluorescência (485 e 530 para excitação e emissão respectivamente) durante uma hora (Victor 2, Perkin Elmer). Os resultados foram expressos como inverso da área relativa.

### **2.3.4. Determinação da atividade da glutathione-S-transferase (GST)**

A dosagem de GST foi baseada nos trabalhos de Habig et al. (1974) e Habig & Jakoby (1981). As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer) com leitora de microplacas. Os resultados foram expressos em UGST/ mg de proteína que representa a quantidade necessária da enzima para conjugar 1  $\mu$ Mol de CDNB/ min/mg de proteína, a 25°C e pH 7,0.

### **2.3.6. Lipoperoxidação (LPO) - Ensaio FOX modificado**

A lipoperoxidação foi determinada de acordo com Hermes-Lima et al. (1995) adaptada para microplacas segundo Monserrat et al. (2003a). As amostras foram homogeneizadas (1:6 m/v para músculo adutor e 1:10 para brânquias) em metanol 100% à frio (4°C). Os homogeneizados foram centrifugados a 1000x g, durante 10 min à 4°C. As leituras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de 550 nm. O conteúdo de peróxidos lipídicos foi expresso como equivalentes de nM CHP/g

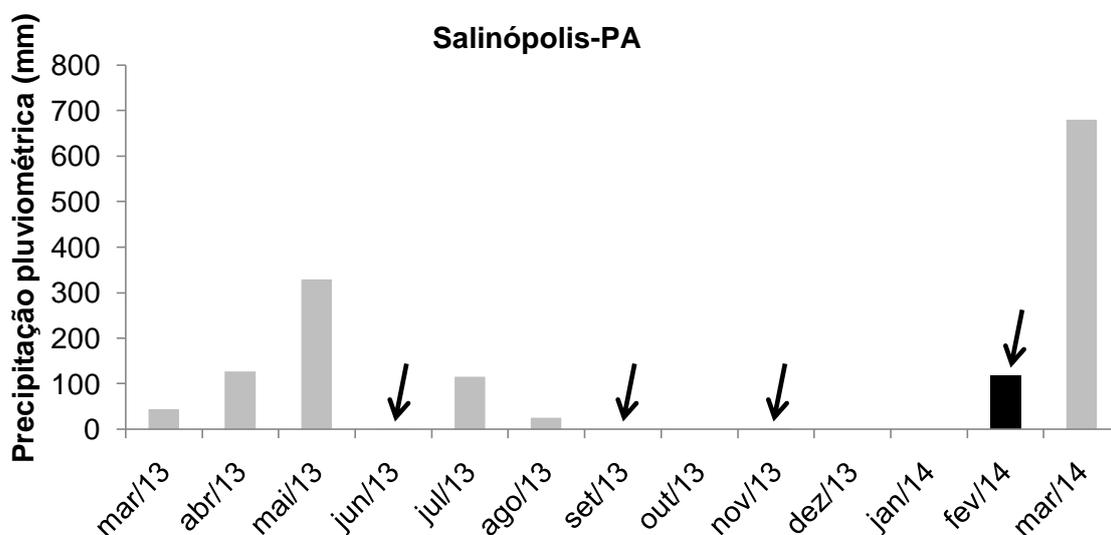
## **2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a análise paramétrica testou-se os pressupostos de normalidade (teste de Shapiro Wilks) e homocedasticidade (teste de Levene). Em seguida, foram aplicados testes de Análise de Variância (ANOVA) e testes post-hoc (teste de Tukey) para verificar as diferenças significativas entre locais de coleta e os períodos climáticos. Para análises não paramétricas utilizou-se o teste de Kruskal- Wallis. O nível de significância adotado será de 5% (Zar,1984).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. DADOS DE PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA

Observa-se na Figura 2 o padrão de variação de precipitação para a região de Salinópolis ao longo dos anos 2013-2014. Com base nesses padrões foram selecionados os meses de coleta. Dentre os meses em que as coletas ocorreram o maior valor de precipitação foi no mês de Fevereiro/14 com 117 mm, enquanto Setembro/13 apresentou o menor valor de 0 mm. Junho/13 e Novembro/2013 apresentaram valores de 1 mm e 2 mm respectivamente. Destaca-se ainda que as coletas realizadas nos períodos de transição foram realizadas após o período chuvoso (Jun/13, transição I chuvoso-estiagem) e após o período de estiagem (Nov/13, transição II estiagem-chuvoso). Observa-se que em ordem cronológica dos meses houve um aumento da precipitação pluviométrica.



**Figura 2:** Precipitação registrada para Salinópolis, PA do período de Março/13 a Março/2014 (dados obtidos do site do INMET <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>). As setas indicam os meses de coleta dos organismos. A barra destacada em preto corresponde ao mês de coleta de maior precipitação.

#### 3.2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Observa-se que a temperatura da água não variou entre pontos e também entre períodos climáticos mantendo-se em média de 30°C e o pH manteve-se em torno de neutro (7–7,5) para todos os pontos amostrados ao longo de todos os períodos (tabela 1).

O oxigênio dissolvido e a condutividade foram maiores no estuário inferior em todos os períodos com valores de 5–7 mg/L e 24–60  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , respectivamente. Nos períodos de transição I e II não houveram diferenças expressivas entre os pontos nos valores de salinidade, enquanto nos períodos de estiagem e chuvoso o ponto estuário inferior

apresentou maiores valores. Ambos os pontos tiveram pico de salinidade durante o período de transição II, quando ocorreu baixa precipitação (figura 3) e os menores valores durante o período de transição I (tabela 1).

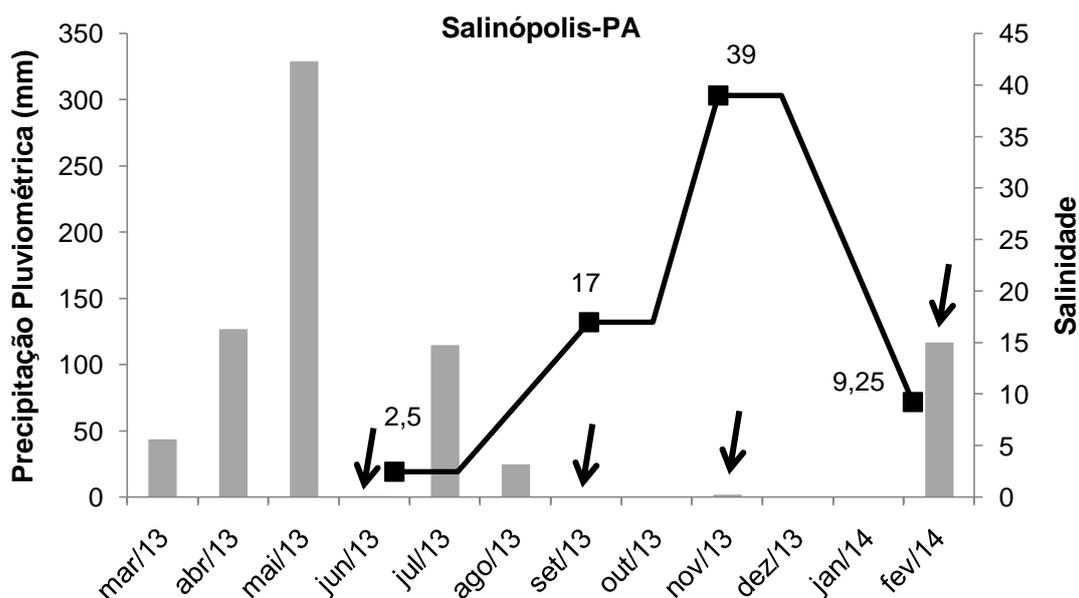
Observou-se assim uma relação inversamente proporcional entre os valores de salinidade e precipitação pluviométrica (figura 3) onde os períodos de maior precipitação apresentaram valores médios de salinidade menores enquanto os períodos de baixa pluviosidade apresentaram aumento dos valores de salinidade.

O período de transição I (chuvoso-estiagem) apresentou valor médio de salinidade de todos os pontos de coleta de 2,5 e o período chuvoso apresentou média de 9,25 (figura 3) mostrando que a injeção de água doce no estuário promove a diluição das águas. O período de transição I muito embora tenha apresentado baixo valor de precipitação, demonstra ser influenciado pelo histórico de condições físico-químicas de meses pretéritos. Sendo, portanto, de fato uma estação de transição entre a alta entrada de água doce no estuário dos meses chuvosos anteriores e início da diminuição da pluviosidade.

O período de estiagem apresentou valor médio de salinidade de 17 e o período de transição II (estiagem-chuvoso) apresentou média de 39 (figura 3) mostrando o processo de salinização do ambiente com a diminuição da pluviosidade.

**Tabela 1:** Parâmetros físico-químicos dos locais amostrados ao longo de quatro períodos sazonais no estuário da Baía do Japerica, PA. Os dados são apresentados como os valores registrados na maré baixa. (Temp. = Temperatura; OD= Oxigênio dissolvido; Conduct.=Condutividade; Sal.=Salinidade; Est. Inf.= Estuário Inferior; Est. Sup.= Estuário Superior).

PERÍODO	LOCAL	TEMP. DA ÁGUA (°C)	pH	OD (mg/L)	CONDUT. (µS/cm)	SAL.
TRANSIÇÃO I	EST. INF.	29	7,52	7,96	27,6	2
	EST. SUP.	29,8	7,41	5,33	14,64	3
ESTIAGEM	EST. INF.	30	7,54	6,58	44,5	20
	EST. SUP.	28,7	7,35	3,07	31,8	14
TRANSIÇÃO II	EST. INF.	28	7,43	6,58	61,2	40
	EST. SUP.	28,4	7,32	3,07	59,8	38
CHUVOSO	EST. INF.	28,45	7,32	5,69	24,15	11,5
	EST. SUP.	27,6	7,32	3,66	15,33	7



**Figura 3:** Precipitação registrada para Salinópolis, PA de Março/13 a Fevereiro/2014 (dados obtidos do site do INMET <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>) representada pelas barras. As setas indicam os meses de coleta dos organismos. A linha representa os valores médios de salinidade de todos os pontos de coleta para cada período climático escolhido.

### 3.3. BIOMETRIA

Durante o período de estiagem houve diferença entre os pontos para as medidas de comprimento total, altura e peso, onde os organismos do estuário inferior apresentaram os maiores valores ( $7,28 \pm 6,81$  cm,  $9,6 \pm 8,89$  cm e  $37,5 \pm 30$  g respectivamente) (tabela 2).

Os animais do estuário inferior durante o período de transição I diferenciaram-se em todas as medidas dos animais amostrados no período de estiagem onde houve aumento das dimensões corporais (tabela 2). Ainda no mesmo local, os animais do período chuvoso ( $5,84 \pm 5,2$  cm e  $8,64 \pm 7,27$  cm respectivamente) também se diferenciaram dos organismos do período de estiagem ( $7,28 \pm 6,81$  e  $9,6 \pm 8,89$  cm respectivamente) para comprimento total e altura apresentando valores menores. Houve também diferenças para o peso entre as ostras do período de transição I e as do período chuvoso onde o último tem maior valor ( $31 \pm 19,75$  g).

Não houve diferenças entre períodos climáticos para os animais do estuário superior para comprimento total e largura. Os animais coletados durante os períodos de transição I e estiagem ( $6,73 \pm 6,13$  cm e  $7,09 \pm 6,21$  cm respectivamente) diferenciaram-se dos coletados no período transição II e chuvoso ( $9,52 \pm 8,94$  cm e  $9,19 \pm 7,85$  cm respectivamente) para altura e somente do chuvoso para peso (tabela 2).

**Tabela 2:** Biometria de *Crassostrea* sp. para todos os locais amostrados ao longo de quatro períodos sazonais no estuário da Baía do Japerica, PA (n=25-35). Os dados estão expressos em mediana±quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre períodos para um mesmo local e as letras minúsculas diferentes representam diferenças entre locais em um mesmo período.

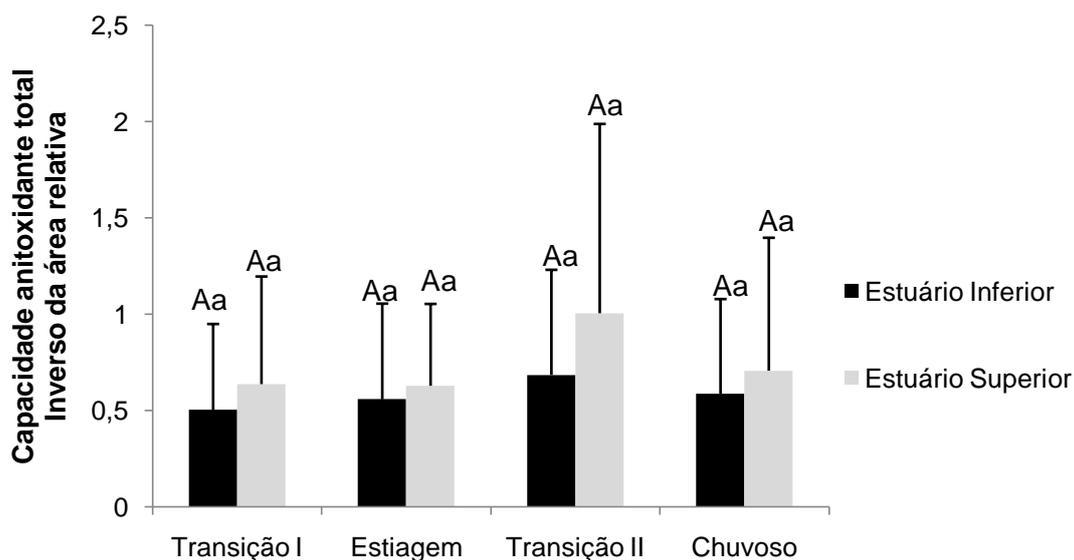
PERÍODO	LOCAL	COMP. TOTAL (cm)	ALTURA (cm)	LARGURA (cm)	PESO MOLE (g)
TRANSIÇÃO I	EST. INF.	5,3±4,83 Aa	7,2±6,69 Aa	2,9±2,7 Aa	20,5±17,5 Aa
	EST. SUP.	5,4±4,87 Aa	6,73±6,13 Aa	2,92±2,48 Aa	16,5±12,25 Aa
ESTIAGEM	EST. INF.	7,28±6,81 Ba	9,6±8,89 Ba	3,78±3,57 BCa	37,5±30 Ba
	EST. SUP.	5,19±4,73 Ab	7,09±6,21 Ab	3,25±2,55 Aa	18±12 Ab
TRANSIÇÃO II	EST. INF.	6,49±5,52 BCa	7,9±7,02 ACa	4,69±3,25 Ba	25±18 ABa
	EST. SUP.	5,86±5,29 Aa	9,52±8,94 Ba	2,71±2,31 Aa	27,5±19,25 ABa
CHUVOSO	EST. INF.	5,84±5,2 ACa	8,64±7,27 Ca	3,25±2,38 ACa	31±19,75 Ba
	EST. SUP.	6,15±5,36 Aa	9,19±7,85 Ba	3,21±2,56 Aa	26±19 Ba

### 3.4. BIOMARCADORES

#### 3.4.1. Brânquias

##### 3.4.1.1. Capacidade Antioxidante Total

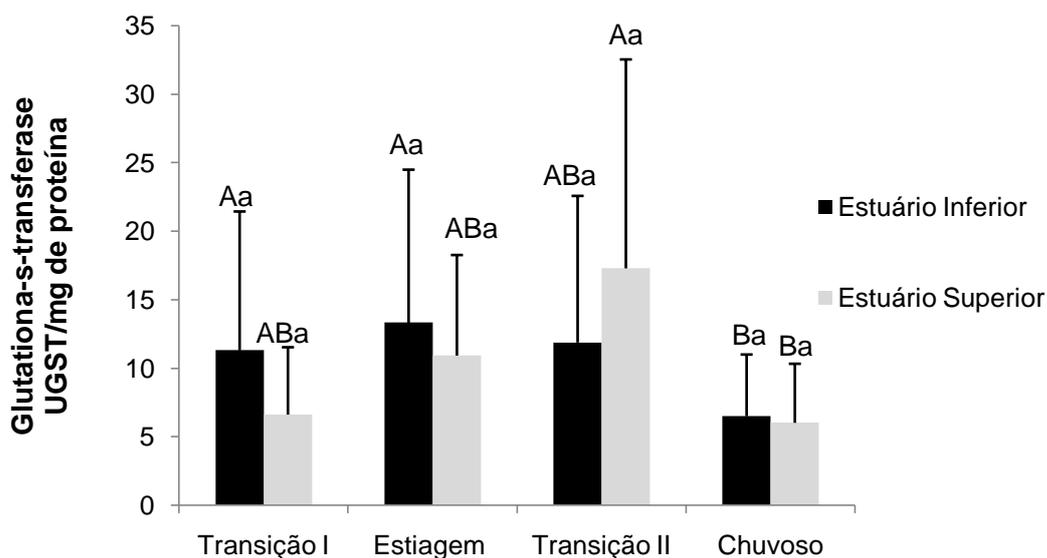
Não houve diferenças entre os organismos dos diferentes locais de coleta e nem entre períodos climáticos (figura 4).



**Figura 4:** Capacidade antioxidante total em brânquias de *Crassostrea* sp. (n=5–10 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.

#### 3.4.1.2. Glutathione-S-transferase

Não houve diferenças entre os pontos para nenhum dos períodos amostrados. Para os animais do estuário inferior os períodos de transição I e estiagem ( $11,3 \pm 10,14$  e  $13,32 \pm 11,17$  UGST/mg de proteína;  $p=0,016$  e  $p=0,041$  respectivamente) diferenciaram-se do período chuvoso onde as ostras apresentaram menor atividade da enzima ( $6,49 \pm 4,50$  UGST/mg de proteína). Para os animais do estuário superior, os organismos coletados no período de transição II ( $17,29 \pm 15,25$  UGST/mg de proteína) diferenciaram-se ( $p=0,008$ ) dos coletados no período chuvoso com maior atividade ( $17,29 \pm 15,25$  UGST/mg de proteína) desta enzima.

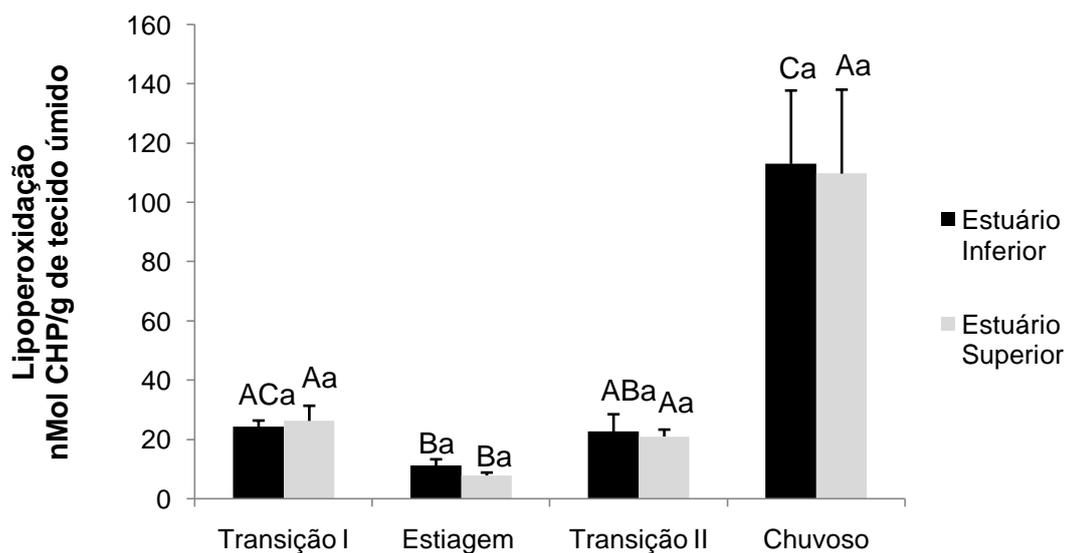


**Figura 5:** Atividade da Glutathione-S-transferase em brânquias de *Crassostrea* sp. (n=5–17 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.

#### 3.4.1.3. Lipoperoxidação

Não houve diferença entre os pontos de coleta para nenhum período climático (figura 6). Para os animais do estuário inferior houve diferença entre o período de estiagem - que apresentou menor conteúdo de lipoperoxidação ( $11,34 \pm 2,07$  nMol de CHP/g de tecido úmido) - e os períodos transição I e chuvoso ( $24,45 \pm 2,04$  e  $38,39 \pm 8,86$  nMol de CHP/g de tecido úmido;  $p = 0,014$  e  $p < 0,0001$  respectivamente).

Para as ostras do estuário superior o período de estiagem diferenciou-se dos demais ( $p = 0,001$  para transição I,  $p = 0,002$  para transição II e  $p < 0,0001$  para o período chuvoso) com os menores conteúdos de lipídeos peroxidados ( $7,93 \pm 1,01$  nMol de CHP/g de tecido úmido).

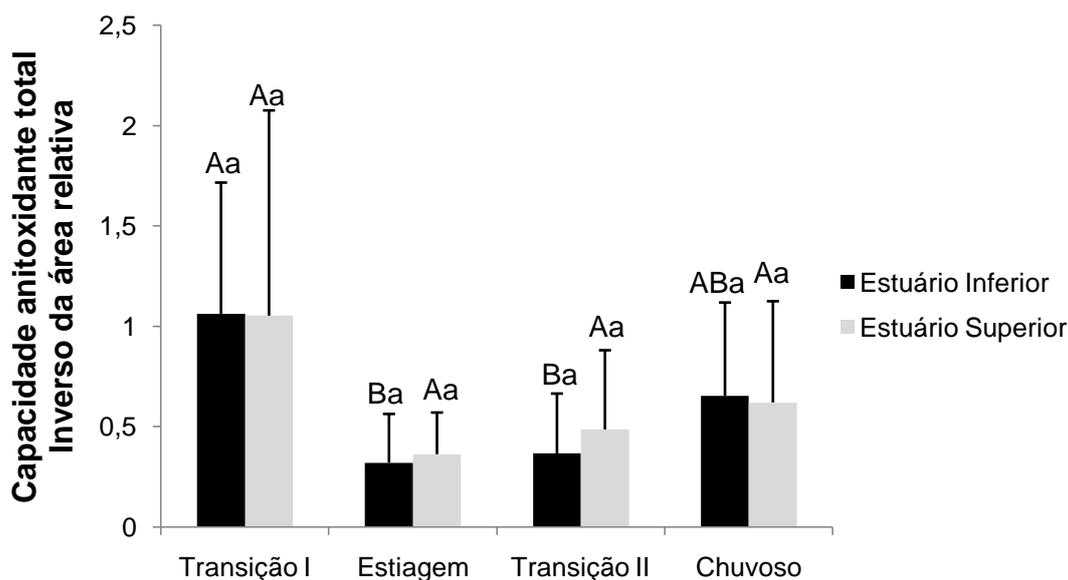


**Figura 6:** Lipoperoxidação em brânquias de *Crassostrea* sp. (n=6–19 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em média±erro padrão. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.

### 3.4.2. Músculo

#### 3.4.2.1. Capacidade antioxidante total

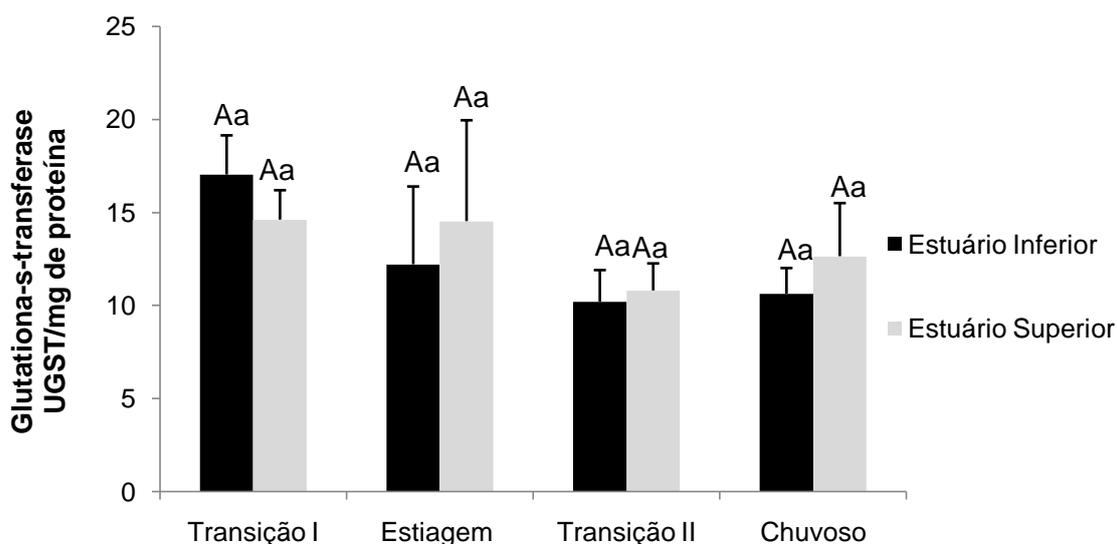
Não houve diferença entre pontos em nenhum dos períodos climáticos. Observou-se diminuição da capacidade antioxidante dos organismos do estuário inferior durante os períodos de estiagem e transição II ( $0,321 \pm 0,24$  e  $0,367 \pm 0,29$   $p=0,023$  e  $p=0,005$  respectivamente) em relação ao período de transição I ( $1,062 \pm 0,65$ ) enquanto para os animais do estuário superior não houve diferenças entre os períodos amostrados.



**Figura 7:** Capacidade antioxidante total em músculo adutor de *Crassostrea* sp. (n=5–10 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em mediana ± primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.

#### 3.4.2.2. Glutaciona-S-transferase

Não houve diferenças na atividade da GST nem entre locais e nem entre períodos climáticos para os animais de ambos os pontos amostrados (figura 8).

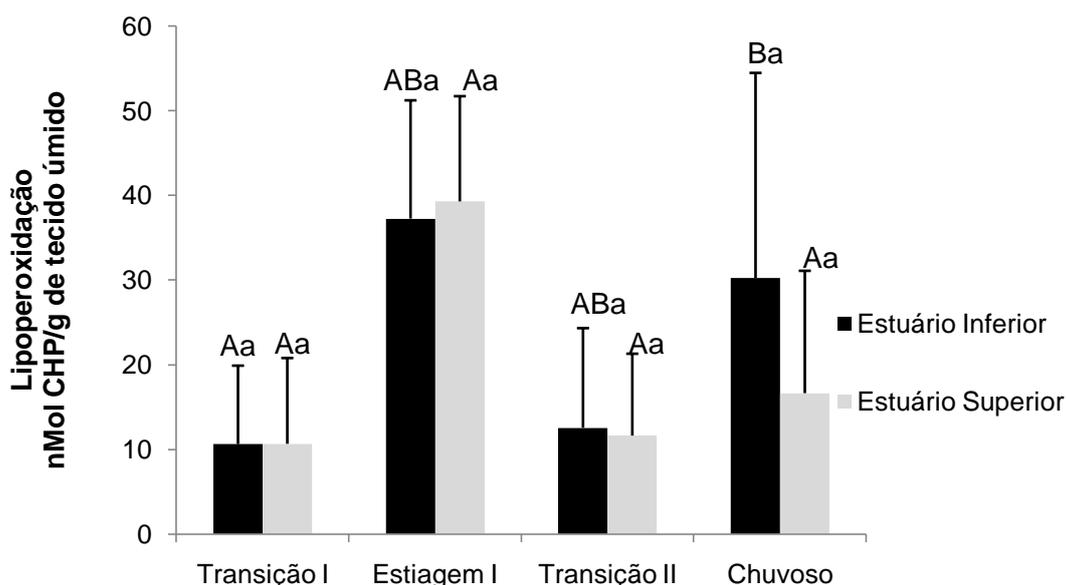


**Figura 8:** Atividade da Glutaciona-S-transferase em músculo adutor de *Crassostrea* sp. (n=7–17 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em média ± erro padrão. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.

### 3.4.2.3. Lipoperoxidação

Observa-se que não houve diferenças entre pontos para nenhum dos períodos amostrados (figura 9). Os animais do estuário inferior diferenciaram-se ( $p < 0,0001$ ) entre os períodos de transição I e o período chuvoso onde no último apresentaram conteúdo de lipoperoxidação superior ( $10,62 \pm 9,26$  e  $30,23 \pm 24,23$  nMol de CHP/g de tecido úmido respectivamente).

Os animais do estuário superior não se diferenciaram entre os períodos climáticos quanto à lipoperoxidação (figura 9).



**Figura 9:** Lipoperoxidação em músculo adutor de *Crassostrea* sp. ( $n=7-16$  indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em mediana  $\pm$  quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Todos os pontos amostrados apresentaram temperatura em torno de  $30^{\circ}\text{C}$ . Esse comportamento é esperado em estuários tropicais onde há baixas variações na insolação e pluviosidade alta o ano todo com temperatura média de  $27^{\circ}\text{C}$  (Monteiro et al., 2015). O pH neutro é típico de águas brancas da Amazônia (Gaillardert et al., 1997) devido às concentrações elevadas de sais carbonatos, bicarbonatos, metais alcalinos e sais minerais apresentando média de  $6,2-7,2$  (Oliveira et al., 2011).

O local de maior influência estuarina apresentou os maiores valores de oxigênio dissolvido e condutividade. Isso pode estar associado à influência da hidrodinâmica

provenientes da entrada de águas oceânicas que promovem maior turbulência e aumento da difusão de oxigênio atmosférico na água (Moriarty, 1986). Além disso, injetam uma grande quantidade de sais alterando a composição iônica da água ao longo dos ciclos de maré (Millero, 1984) afetando assim, a condutividade. Segundo Boyd (1989) a solubilidade do oxigênio dissolvido é inversamente proporcional à salinidade e temperatura sendo, portanto mais solúvel em ambientes dulciaquícolas e frios.

A salinidade não variou entre os pontos durante os períodos de transições, uma vez que esses períodos se caracterizam por alta instabilidade hidrodinâmica e físico-química da água no estuário. Enquanto no período de estiagem, onde há maior concentração de sais, registrou-se maiores valores para o estuário inferior que está localizado no baixo estuário onde a influência de águas marinhas é maior (Fairbridge, 1980) contribuindo ainda mais para o processo de salinização. Ambos os pontos apresentaram picos de salinidade e condutividade durante o período de transição II podendo isso ser explicado pelo efeito cumulativo da diminuição de pluviosidade iniciada na estiagem que promove o aumento da concentração de sais dissolvidos na água através das correntes de marés que podem penetrar até 60km dentro de estuários paraenses (Berrêdo et al., 2008). Já no período de transição I foram registrados os menores valores, possivelmente advindos da pluviosidade intensa nos quatro meses anteriores uma vez que esses parâmetros são dependentes não apenas da concentração iônica mas também do volume de chuvas (Esteves, 1998). Essa relação inversa entre salinidade e pluviosidade verificada no presente estudo ratifica a divisão em quatro períodos climáticos distintos.

## 4.2. BIOMETRIA

Os maiores valores biométricos registrados para os animais do estuário inferior no período de estiagem tanto em relação à outra localidade quanto em relação aos períodos de transição I e chuvoso refletem maior estabilidade energética e metabólica dos organismos frente o aumento de salinidade. Destaca-se ainda que as ostras do estuário superior apresentaram os maiores valores de altura durante o período de transição II, quando foi registrado o pico de salinidade para ambos os locais. Funo et al.(2015) em estudo experimental acerca da influência da salinidade no crescimento e sobrevivência de ostras *C. gasar* verificaram que os maiores valores biométricos registrados foram: em salinidade 25 para altura, em salinidade 20 para comprimento, nas salinidades 20 e 25 para largura e em salinidades de 20–30 para peso. Verificaram ainda maior taxa de sobrevivência dos indivíduos na faixa de 20–25, estando o valor registrado no período de estiagem para o estuário inferior dentro de todas as faixas citadas.

Os menores valores para todas as dimensões ainda no trabalho de Funo et al. (2015) foram registradas em condições de salinidade baixa (em torno de 5). Corroborando assim, os dados do presente estudo em que os valores registrados para os períodos de transição I e chuvoso foram próximos de 5 (sobretudo para o estuário inferior durante o transição I) marcados pela queda nos valores biométricos.

Sabe-se que as ostras, assim como a maior parte dos moluscos aquáticos, são osmoconformadoras (Gainey & Greenberg, 1977; Willmer et al., 2004) e por serem típicas de ambientes estuarinos apresentam alta capacidade de controle de seu volume celular (Wilmer et al., 2004). Porém, uma vez submetidas a situações de estresse osmótico podem reduzir a energia direcionada ao crescimento devido ao custo da demanda de sobrevivência, (Funo et al., 2015) fazendo isto através de uma série de medidas como diminuição da taxa de filtração que afeta o crescimento (Guimarães et al., 2008).

O aumento dos pesos nas ostras de ambos os locais de coleta durante o período chuvoso pode estar relacionado ao acúmulo de compostos energéticos para o momento da desova. Este evento já foi reportado durante períodos de alta pluviosidade e baixa na salinidade em algumas espécies do gênero tais como *C. virginica* (Joshep & Madhyastha, 1984; Martínez et al., 1995; Zamora et al., 2003) e durante a estiagem para espécies nativas como *C. gasar*. Pode ainda, estar ligado ao aumento da taxa de filtração e da disponibilidade de nutrientes que também influenciam os eventos reprodutivos e a maturação gonadal (Giese & Pearse, 1979; Zamora et al., 2003).

### 4.3. BIOMARCADORES

#### 4.3.1. Brânquias

Os resultados obtidos mostram que os animais de ambos os pontos tiveram diminuição da atividade da GST durante o período chuvoso. Isso sugere maior gasto energético na manutenção da homeostase (sobretudo relacionadas ao balanço osmótico) em períodos de maior incidência pluviométrica e hidrodinâmica com oscilações diárias mais expressivas dos parâmetros físico-químicos.

As ostras-do-mangue assim como grande parte dos moluscos são osmoconformistas, ou seja, suas concentrações iônicas internas acompanham as flutuações do meio circundante através do ajuste de seu volume celular (Hosoi et al., 2003). Uma vez que flutuações ambientais afetam a fisiologia dos animais (Oliva et al., 2012) e promovem o aumento da taxa metabólica ligada à geração de pró-oxidantes (Silveira et al., 2008), pode ocorrer a supressão do sistema de defesa antioxidante gerada pela grande demanda osmótica deste período promovida pela diluição das águas. Isso é reforçado pelo alto

conteúdo de lipídeos peroxidados registrados, sobretudo para os animais do estuário inferior.

Sabe-se que alterações da salinidade podem induzir a variadas respostas fisiológicas nos moluscos bivalves alterando outras funções básicas como a taxa de filtração (Bernard, 1983). Isso ocorre porque ajustes metabólicos relacionados à regulação osmótica podem acarretar em gasto energético para manutenção das concentrações de sais e água (Cheng et al., 2002).

A supressão do sistema de defesa antioxidante pode ocorrer frente ao excesso de espécies reativas conduzindo ao estresse oxidativo (Gurer-Orhan et al., 2004). Vários estudos experimentais com ostras *Crassostrea* apontam para alta mortalidade e baixo desenvolvimento dos animais em salinidades baixas (Chanley, 1958; Heilmayer et al., 2008; Funo et al., 2015) ou durante a estação chuvosa (Ajana, 1980). Animais desse gênero apresentam melhor desenvolvimento e sobrevivência em salinidades nas faixas de 15–25 em condições experimentais e tolerância de 10–40 em estuários paraenses (Funo et al., 2015).

É válido ressaltar ainda que durante o período chuvoso o fator nutricional apresenta alta contribuição para os níveis de estresse oxidativo uma vez que a taxa de filtração é correlacionada positivamente com a salinidade (Ehrich & Harris, 2015) diminuindo portanto, durante o período chuvoso a ingestão de antioxidantes. González-Fernández et al. (2017) em estudo com o molusco *Mytilus galloprovincialis* observou forte influência do estado nutricional na expressão de muitos genes relacionados à detoxificação como os do citocromo P450, GST- $\alpha$  e metalotioneínas. Concluiu também que a baixa nutrição leva à uma diminuição significativa desta expressão, aumentando assim, as chances de aparecimento de dano oxidativo. Esses resultados corroboram com os dados visualizados no presente estudo, ocorrendo peroxidação lipídica principalmente para os animais do estuário inferior durante as baixas de salinidade (período chuvoso e transição I),

Houve uma tendência de aumento (embora não significativa estatisticamente) da atividade da GST no período de transição II, sendo válido ressaltar que o pico de salinidade ocorreu durante este período. Assim, somado a todos os fatores ambientais, as estratégias ecológicas dos animais também afetam o comportamento dos biomarcadores. O aumento da salinidade pode servir de gatilho reprodutivo para algumas espécies de ostras do mangue, como *Crassostrea gasar*, ativando a liberação de gametas (Paixão et al., 2013). Funções vitais básicas que requerem aumento da atividade metabólica, como a reprodução, podem atuar como fontes de estresse oxidativo através do decréscimo das defesas antioxidantes com ou sem o aumento da geração de EROs fragilizando assim o sistema redox do organismo (Alonso-Alvarez et al., 2004).

Observou-se aumento das dimensões corporais durante o período de transição II sobretudo para animais do estuário inferior juntamente com uma alta eficiência das defesas antioxidantes dos organismos de ambos os locais, evidenciada por baixos conteúdos de lipídeos peroxidados. Sugere-se assim que as ostras *Crassostrea* apresentam-se melhor adaptadas às salinidades mais altas na Amazônia podendo investir em reprodução e crescimento sem efeitos deletérios em suas defesas antioxidantes. Logo, pode-se esperar que os biomarcadores sejam afetados pela sazonalidade sobretudo no período chuvoso, enquanto nos demais períodos será mais fácil o pontuamento dos potenciais efeitos de atividades antrópicas futuras.

A não diferenciação entre pontos para ambos os biomarcadores mostra que a sazonalidade é um fator fundamental na modulação do sistema de defesa antioxidantes dos animais. Segundo Sheehan & Power (1999) a sazonalidade é um fator importante na fisiologia de moluscos pois afeta parâmetros importantes para o desenvolvimento desses animais tais como disponibilidade alimentar, fase reprodutiva, taxa de crescimento entre outros, provocando assim flutuações no estresse oxidativo ao longo do ano.

As brânquias demonstraram-se sensíveis às modificações sazonais do meio uma vez que são o principal órgão de contato do animal com a água coordenando a filtração, respiração e trocas iônicas e também servindo de principal interface dos animais com contaminantes (Viarengo, 1989). Este conhecimento é importante em programas de biomonitoramento, uma vez que a escolha de órgãos responsivos é fundamental na avaliação dos resultados pois a capacidade modulatória do sistema antioxidante não é padronizada sendo tecido e espécie-específica (Crawford et al., 2000).

#### **4.3.2. Músculo**

Os resultados obtidos sugerem que músculo adutor é um tecido pouco sensível às mudanças físico-químicas da água, evidenciado pela não diferenciação entre pontos ou estações para a atividade da GST em ambos os locais. A principal função do músculo adutor em bivalves é manter as valvas conectadas e estabilizadas (Storer et al., 2002). Segundo Zwaan et al. (1983) este tecido possui alta atividade de enzimas como anolopina e estrombina desidrogenase (ambas da família das oxirredutases como a Catalase). A estrombina é a principal opina advinda do piruvato, ocorrendo seu acúmulo somente neste tecido em condições de hipóxia (Zurbug et al., 1982). Ou seja, o maquinário metabólico deste órgão é principalmente voltado para a os períodos de baixa-mar em que há necessidade de fechamento das valvas frente ao déficit de oxigênio, realizando a glicólise anaeróbica que culmina com a produção de piruvato. A exposição ao ar é a principal moduladora da capacidade muscular e do nível de exaustão do músculo (Grieshaber &

Gade, 1977). Assim, o estresse salino e a variação dos demais parâmetros físico-químicos não foram facilmente detectados por este órgão devido seu baixo aparato metabólico em termos de osmoconformação e defesa antioxidante.

Os animais do estuário inferior, assim como nas brânquias, apresentaram altos conteúdos de lipídeos peroxidados durante a estação chuvosa e também durante a estiagem para este tecido. Concomitantemente, a capacidade antioxidante aumentou durante o período de transição I (salinidade baixa) em relação aos períodos de maior salinidade (estiagem e transição II). Sugere-se que a demanda de regulação osmótica ocasionada pela diminuição da salinidade pode gerar aumento na necessidade de exercício nos organismos através do fechamento de valvas como estratégia de proteção contra o estresse osmótico (seja por diminuição ou aumento da salinidade fora dos limites de tolerância da espécie) (Leonel et al., 1983), a chamada pseudo-osmorregulação facultativa (Berger & Kharazova, 1997). No entanto, o fechamento prolongado das valvas tem impactos significativos na fisiologia dos animais podendo levar à morte principalmente por baixa de consumo de oxigênio (Lombardi et al., 2013). A maior utilização do órgão viabiliza a produção de espécies reativas através do aumento da taxa metabólica. Segundo Petry et al. (2010) a realização contínua de exercício físico induz ao estresse oxidativo através de EROs geradas durante e após o esforço. Zwaan et al. (1983) afirmam que a intensa a atividade anaeróbia no músculo adutor pode conduzir à exaustão com acúmulo de octopina e outras opinas, substâncias derivadas das vias metabólicas anaeróbicas que integram o catabolismo celular (Grandón et al., 2008). Essas substâncias são produzidas durante o esforço e também no período de recuperação após a exaustão (Livingstone et al., 1981) que geram impactos no funcionamento das células principalmente através da diminuição do pH da hemolinfa (Ocanõ-Higuera et al., 2011).

Os baixos níveis de lipoperoxidação visualizados durante o período de transição I ainda apontam para eficiência de mitigação de danos oxidativos. Logo, períodos metabolicamente menos dispendiosos do ponto de vista da regulação osmótica (estiagem) podem abrir margem para efeitos deletérios advindos do metabolismo energético de outras necessidades fisiológicas (como a reprodução já mencionada) ou até mesmo advindos de possíveis impactos antrópicos futuros.

Assim, a oscilações dos parâmetros físico-químicos, sobretudo a salinidade, ainda que não afetem diretamente a modulação do sistema antioxidante no músculo dos organismos, possuem efeitos indiretos através de estratégias adaptativas que modificam as condições homeostáticas celulares transmitindo efeitos metabólicos secundários dessas oscilações.

Analogamente no período chuvoso, houve aumento dos valores de peso mole, sobretudo para os animais do estuário superior - mais influenciados por águas hiposalinas - sugerindo que apesar de toda demanda metabólica imposta pelo meio ainda não há comprometimento energético das demais funções vitais, tais como crescimento.

## **5. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos permitem inferir que os biomarcadores em brânquias apresentam modulação influenciada pela sazonalidade, havendo maior desafio do ponto de vista metabólico para os organismos durante o período chuvoso com supressão das defesas antioxidantes. Este período pode abrir precedentes para potenciais efeitos deletérios advindos de futuras fontes de atividade antrópica, dada a maior fragilidade das defesas antioxidantes.

Os organismos parecem melhor adaptados às condições de alta salinidade, parecendo ser o período de estiagem energeticamente estável quanto à osmoconformação. No entanto, outras funções vitais associadas ao aumento da salinidade naturalmente impõe danos celulares ao organismo. Enquanto os biomarcadores em músculo mostraram-se pouco sensíveis as mudanças naturais do meio, estando a modulação de seus biomarcadores mais relacionada à utilização do tecido durante os períodos de baixa-mar. A aplicabilidade destes organismos em programas de biomonitoramento é alta uma vez que os mesmos são sensíveis às mudanças do meio e apresentam plasticidade fisiológica conduzida pelos períodos climáticos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajana, A.M. 1980. Fishery of the mangrove oyster, *Crassostrea gasar*, Andanson (1757), in the Lagos area, Nigeria. *Aquaculture*. 21(2): 129–137.

Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters*. 7: 363–368.

Amado, L.L., Longaray Garcia, M., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ribas Ferreira, J.L., Yunes, J.S., Monserrat, J.M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407: 2115–2123.

Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C. 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*. 34: 151–162.

Bernard, F. 1983. Physiology and the mariculture of some northeastern pacific bivalve mollusks. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*. 63:24 pp.

Berrêdo, J. F.; Costa, M. L.; Progene, M. P.S. 2008. Efeitos das variações sazonais do clima tropical úmido sobre as águas e sedimentos de manguezais do estuário do rio Marapanim, costa nordeste do Estado do Pará. *Acta Amazonica*. 38(3): 473–482.

Boyd, C.E. Water quality management aeration and shrimp farming. 1989. Fisheries and Allied, Aquaculture, Auburn University Agricultural Experimental Station, Departmental Series, Alabama, USA. 21–83p.

Burdon, R.H. *Genes in the Environment*. 1999, Taylor & Francis Inc., Philadelphia, PA.

Berger, V.J.; Kharazova, A.D. 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia*. 355 (1): 115–126.

Chanley, P.E. 1958. Survival of some juvenile bivalves in water of low salinity. *Proceedings of the National Shellfish Association*. 48(1): 52–65.

Cheng, W.; Yeh, S.P.; Wang, C.S.; Chen, J.C. 2002. Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity levels. *Aquaculture*. 203(1): 349–357.

Costa, P.F. *Biologia e tecnologia para o cultivo*. 1985. In: Ministérios da Marinha. Instituto Nacional de Estudos do Mar. Manual de Maricultura. Rio de Janeiro, Brasil, Cap.VIII, parte B. Information Division.

Crawford, D.R., Suzuki, T., Davies, K.J.A., 2000. Redox regulation of gene expression, in: Sen, C.K., Sies, H., Baeuerle P.A. (Eds), *Antioxidant and redox regulation of gene*. Academic Press, San Diego. 21–45 pp.

Ehrich, M.K.; Harris, L.A. 2015. A review of existing eastern oyster filtration rate models. *Ecological Modelling*. 297:201-212.

Esteves, F.A., 1998. *Fundamentos de limnologia*. Interciência, Rio de Janeiro. Brasil.

Fairbridge, R. W. 1980. The Estuary: its Definition and Geodynamic Cycle. In: *Chemistry and Biogeochemistry of Estuaries*, E. Olausson & I. Cato (Eds.). Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York. 1–35 pp.

Férrandez, B., Campillo, J.A., Martínez-Gomez, C., Benedicto, J. 2012. Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites. *Chemosphere*. 87 (11):1235–1245.

Funô, I.C.S.A.; Antonio, I.G.; Marinho, Y.F.; Gálvez,A.O. 2015. Influência da salinidade sobre a sobrevivência e crescimento de *Crassostrea gasar*. *Boletim do Instituto de Pesca*. 41(4):837–847.

Gaillardet, J., Dupré, B., Allègre, C., Négrel, P. 1997. Chemical and Physical Denudation in the Amazon River Basin. *Chemical Geology*. 142: 141–173.

Gainey, L. F.; Greenberg, M. J. 1977. Physiological basis of the species abundance-salinity relationship in molluscs: a speculation. *Marine Biology*. 40: 41–49.

Giese, A.C.; J.S. Pearse. 1979. Introduction: general principles, p. 1-49. In: A. C.G. Giese; J.S. Pearse (eds.). *Reproduction of Marine Invertebrates*, vol. 1. Academic, New York, USA.

González-Fernández, C.; Albentosa, M.; Sokolova, I. 2017. Interactive effects of nutrition, reproductive state and pollution on molecular stress responses of mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. *Marine Environmental Research*, in press, <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.08.011>

Grandón, M.A.; Barros, J.A.; González, R.R. 2008. Metabolic characterization of *Diplodon chilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia: Hyriidae) exposed to experimental anoxia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 43(3): 531–537.

Grieshaber, M. K. & Gäde, G. 1977. Energy supply and the formation of octopine in the adductor muscle of the scallop, *Pecten ja-cobaeus* (Lamarck). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 58(B): 249–252.

Guimarães, I.M.; Antonio, I.G.; Peixoto, S.; Olivera, A. 2008. Influência da salinidade sobre a sobrevivência da ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae*. *Arquivos de Ciências do Mar*. 41(1): 118–122.

Gurer-Orhan, H.; Sabir, H.U.; Özgünes, H. 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*. 195: 147–154.

Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assay for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods in Enzymology*. 77: 398–405.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biological Chemistry*. 249: 7130–7139.

Heilmayer, O.; Digialleonardo, J.; Qian, L.; Roesijadi, G. 2008. Stress tolerance of a subtropical *Crassostrea virginica* population to the combined effects of temperature and salinity. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 79(1): 179–185.

Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K. B., 1995. Quantification of the lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylene orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 19: 271–280.

Hosoi, M.; Kubota, S.; Toyohara, M.; Toyohara, H.; Hayashi, I. 2003. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. *Fisheries Science*. 69(2): 395–400.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6):1841–1856.

Ignacio, B.L.; Absher, T.M.; Lazoski, C.; Solé-Cava, A.M. 2000. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Marine Biology*. 136: 987–991.

Joshep, M.M.; Madhyastha, M.N. 1984. Annual reproductive cycle and sexuality of the oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston). *Aquaculture*. 40: 223-231.

Kannan, K.; Johnson-Restrepo, B.; Yohn, S. S.; Giesy, J.P.; Long, D. T. 2005. Spatial and temporal distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Michigan Inland Lakes. *Environmental Science Technology*. 39:4700–47006.

Lam, P.K.S., Gray, J.S., 2003. The Use of Biomarkers in Environmental Monitoring Programmes. *Marine Pollution Bulletin*. 46: 182–186.

Lam, K.; Morton, B. 2003. Mitochondrial and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China. *Aquaculture*. 228: 1–13..

Leonel, R.M.V.; Magalhães, A.R.M.; Lunetta, J.E. 1983. Sobrevivência de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia), em diferentes salinidades. *Boletim de Fisiologia Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil*. 7: 63–72.

Livingstone, D.R.; Zwaan A. de; Thompson, R.J. 1981. Aerobic metabolism, octopine production and phosphoarginine as sources of energy in the phasic and catch adductor muscles of the giant scallop *Placopecten magellanicus* during swimming and the subsequent recovery period. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 70:35-44.

Lombardi, S.A.; Harlan, N.P.; Paynter, K.T. 2013. Survival, acid-base balance, and gaping responses of the asian oyster *Crassostrea ariakensis* and the eastern oyster *Crassostrea*

*virginica* during clamped emersion and hypoxic immersion. *Journal of Shellfish Research*. 32(2): 409–415.

Martínez, I.; Aldana, D.; Brulé, T.; Cabrera, E. 1995. Crecimiento y desarrollo gonadal del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Ostreidae), en la Península de Yucatán, México. *Avicennia*. 3:61–75.

Melo, A.G.C.; Varela, E.S.; Beasley, C.R.; Schneider, H.; Sampaio, I.; Gaffney, P.M.; Reece, K.S.; Tagliaro, C.H. 2010. Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oyster (*Crassostrea*). *Genetics and Molecular Biology*. 33(3): 564–572.

Montserrat, J. M.; Geracitano, L. A.; Pinho, G. L. L.; Vinagre, T. M.; Faleiros, M.; Alciati, J. C. & Bianchini, A. 2003a. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylene orange complex formation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 45:177-183.

Montserrat, J.M., Rosa, C.E., Sandrini, J.Z., Marins, L.F.F., Bianchini, A., Geracitano, L.A., 2003b. Annelids and nematodes as sentinels of environmental pollution. *Comments on Toxicology*. 9: 289–301.

Montserrat, J.M., Martínez, P.E, Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M., Pinho, G.T.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*. 146(1–2): 221–34.

Monteiro, S.M., El-Robrini, M., Alves, I.C.C., 2015. Seasonal dynamics of nutrients in an Amazon estuary. *Mercator*. 14(1):151–162.

Moriarty, D. 1986. Bacterial productivity in ponds used for culture of penaeid prawns. *Microbial Ecology*. 12: 259–270.

Millero, F.J., 1984. The conductivity-density-salinity-chlorinity relationship for estuarine waters. *Limnology and Oceanography*. 29(6): 1317–1321.

Ocaño-Higuera, V.M.; Pacheco-Aguilar, R.; Maeda-Martínez, A.N.; Lugo Sánchez, M.E., Beltrán-Lugo, A.I. 2011. Bioquímica posmortem y procesamiento de los moluscos pectínidos

del género *Nodipecten* spp. In: Maeda-Martínez, A. N.; Lodeiros-Seijo, C. (Eds). *Biología y Cultivo de los Moluscos Pectínidos del Género Nodipecten*. Edit. Limusa, México.

Oliva, M., Vicente, J.J., Gravato, C., Guilhermino, L., Galindo-Riano, M.D. 2012. Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Soleasene galensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SWS pain): Seasonal and spatial variation. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 75: 151–162.

Oliveira, L.C.; Botero W.G.; Santos, A.; Cordovil, M.C.O.; Rocha, J.C; Silva, H.C. 2011. Influência das características físico-químicas dos solos no ciclo hidrobiogeoquímico do mercúrio na região do rio Aracá – AM. *Química Nova*. 34(8):1303–1308.

Paixão, L.; Ferreira, M.A.; Nunes, Z.; Fonseca-Sizo, F.; Rocha, R. 2013. Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the collection of brood stock oysters. *Aquaculture*. 6(12):380–383.

Perrone, S.; Negro, S.; Tataranno, M.L.; Buonocore, G. 2010. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 23(S3): 63 –65.

Petry, É.R., Alvarenga M.L., Cruzat, V.F., Tirapegui, J., 2010. Exercício físico e estresse oxidativo: mecanismos e efeitos. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*. 8(4): 90–99.

Santos, T. G.; Bezerra-Junior, J. L.; Costa, K. M. P. da; Feitosa, A. do N. 2009. Dinâmica da biomassa fitoplanctônica e variáveis ambientais em um estuário tropical (Bacia do Pina, Recife-PE). *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*. 4(1):95–109.

Schmidt-Nielsen, K., 1997. *Animal Physiology: adaptation and environment*. 5ª Ed., Cambridge University Press, Cambridge, England.

Sheehan, D., Power, A. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 123: 193–199.

Silveira, L.R., Hirabara, S.M., Lambertucci, R.H., Leandro, C.V., Fiamoncini, J., Pinheiro, C.H.J., Anielle, C., D'Angelo, A., Bassit, R.A., Pithon-Curi, T.C., Curi, R., 2008. Regulação

metabólica e produção de espécies reativas de oxigênio durante a contração muscular: efeito do glicogênio na manutenção do estado redox intracelular. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 14(1): 57–63.

Sogorb, M.A, Estévez, J., Vilanova, E., 2014. In: Gupta, R.C. (ed.), *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press. 965–973 pp.

Stegeman, J.J.; Renton, K.W.; Woodin, B.R.; Zhang, Y.S.; Addison, R.F. 1990. Experimental and Environmental Induction of Cytochrome-P450E in Fish from Bermuda Waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 138(1–2): 49–67.

Storer, T.I.; Usinger, R. L.; Stebbins, R.C.; Nybakken, J. W. 1984. *Zoologia geral*. Companhia Editora Nacional, São Paulo, Brasil. 816 pp.

Urbina, M.A, Glover, C.N., 2015. Effect of salinity on osmoregulation, metabolism and nitrogen excretion in the amphidromous fish, inanga (*Galaxias maculatus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 473: 7–15.

Viarengo, A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Critical reviews in Aquatic Sciences*. 1: 295-31.

Willmer, P.; Stone, G.; Johnston, I. 2004. *Environmental Physiology of Animals*, 2<sup>a</sup> ed., Blackwell, Oxford, England.

Witters, H. E.1998. Chemical speciation dynamics and toxicity assessment in aquatic systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 41(1): 90–95.

Zar, J. H., 1984. *Biostatistical analysis*, 2<sup>o</sup> ed. Prentice Hall, New Jersey.

Zamora, A.G.; Hernández, M.L.S.; Aranda, D.A. 2003. Ciclo gonádico del ostión americano *Crassostrea virginica* (Lamellibranchia: Ostreidae) em Mecocacán, Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*. 51(4): 109–117.

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: 135–150.

Zurburg, W.; de Bont, A.M.T.; deZwaan, A. 1982. Recovery from exposure to air and the occurrence of strombine in different organs of the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Molecular physiology*. 2: 135–147.

Zwaan, A.de; Bont, A.M.T. de; Zurburg, w.; Bayne, B.L.; Livingstone, D.R. 1983. On the role of Strombine formation in the energy metabolism of adductor muscle of a sessile bivalve. *Journal of Comparative Physiology*. 149: 557–563.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Mapa com a localização geográfica da área da Baía do Japerica (ao norte do Município de Primavera), indicando os dois locais de coleta de amostragem na Baía de Japerica. (Fonte:Johnata Azevedo).....40

**Figura 2:** Precipitação em Salinópolis, PA de março/13 a março/2014. As setas indicam os meses de coleta dos organismos. A barra destacada em preto corresponde à maior precipitação. (Fonte: INMET).....43

**Figura 3:** Precipitação em Salinópolis, PA de março/13 a fevereiro/2014 representada pelas barras. As setas indicam os meses de coleta dos organismos. A linha representa os valores médios de salinidade de todos os pontos de coleta para cada período climático escolhido.(Fonte:INMET).....45

**Figura 4:** Capacidade antioxidante total em brânquias de *Crassostrea* sp.(n=5–10 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....47

**Figura 5:** Atividade da Glutathione-S-transferase em brânquias de *Crassostrea* sp.(n=5–17 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....48

**Figura 6:** Lipoperoxidação em brânquias de *Crassostrea* sp.(n=6–19 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....49

**Figura 7:** Capacidade antioxidante total em músculo adutor de *Crassostrea* sp. (n=5–10 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As

letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....50

**Figura 8:** Atividade da Glutathione-S-transferase em músculo adutor de *Crassostrea* sp. (n=7–17 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....50

**Figura 9:** Lipoperoxidação em músculo adutor de *Crassostrea* sp. (n=7–16 indivíduos) da Baía do Japerica, PA. Valores expressos em mediana  $\pm$  quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre períodos para um mesmo local e letras minúsculas diferentes representam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os locais no mesmo período.....51

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1:** Parâmetros físico-químicos da água ao longo de quatro períodos sazonais no estuário da Baía do Japerica, PA. Os dados são apresentados como os valores registrados na maré baixa. (Temp. = Temperatura; OD= Oxigênio dissolvido; Conduct.=Condutividade; Sal.=Salinidade; Est. Inf.= Estuário Inferior; Est. Sup.= Estuário Superior).....45

**Tabela 2:** Biometria de *Crassostrea* sp.para todos os locais ao longo de quatro períodos sazonais no estuário da Baía do Japerica, PA. Os dados estão expressos em mediana  $\pm$  primeiro quartil. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre períodos para um mesmo local e as letras minúsculas diferentes representam diferenças entre locais em um mesmo período.....46

## CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo mostra que na Amazônia o principal diferencial é sua sazonalidade única que modifica padrões ambientais e fisiológicos classicamente descritos na literatura gerando novos padrões de comportamento e adaptação em sua biota. Assim, ambas as espécies apresentaram modulação dos parâmetros de estresse oxidativo conduzidos pela mudança sazonal que conseqüentemente modificava a demanda metabólica.

Além disso, adaptações fisiológicas locais foram visualizadas sobretudo para a espécie *Ucides cordatus* evidenciando que as condições internas do estuário amazônico já possibilitam a exploração de novas rotas de comportamento bioquímico, aumentando assim a possibilidade da espécie de se estabelecer em novos e diversos ecossistemas.

No entanto, tanto o caranguejo uçá quanto a ostra-do-mangue parece ainda ser eminentemente condicionado por sua origem na água marinha demonstrando estabilidade dos biomarcadores em estações de aumento da salinidade.

Ambas as espécies apresentam viabilidade de uso em programas de biomonitoramento. As ostras-do-mangue apresentam sensibilidade elevada de seu aparato bioquímico, sobretudo nas brânquias, e plasticidade fisiológica sazonalmente modulada o que a torna boa biomonitora. E a espécie *U. cordatus* também demonstrou grande capacidade adaptativa fisiológica através de sua eurihalidade tornando-o propício à resistir em condições de pressão antrópica, viabilizando seu uso.