

**Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Instituto Chico
Mendes de Conservação da Biodiversidade PIBIC/ICMBio**



Relatório de Final
(Ciclo 2023-2024)

**ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS EM SIRIS (*Callinectes* sp.)
DOS MANGUEZAIS DA BAÍA DE SÃO MARCOS E BAÍA DE
TUBARÃO, MARANHÃO, BRASIL**

Nome da estudante de IC: Eliamara de Sousa Linhares

Orientador: Bruno de Brito Gueiros Souza

Coorientadora: Ione Marly Arouche-Lima

Instituição da coorientadora: Universidade Federal do Maranhão - UFMA

São Luís
2024

RESUMO

As regiões portuárias são de grande importância para a movimentação de cargas a nível mundial. Entretanto, essa atividade gera diversos tipos de impactos ambientais, tais como derramamento de cargas poluentes e a contaminação através dos resíduos das embarcações que podem atingir os organismos aquáticos da região. As espécies do gênero *Callinectes sp.* foram avaliadas o quanto podem ser monitoradas para responder aos critérios de um bom biomonitor. Os espécimes ocorrem em áreas próximas ao Complexo Portuário, localizado na Baía de São Marcos – MA e em áreas na Reserva Extrativista Baía do Tubarão, unidade de conservação federal selecionada como área de referência. Os exemplares foram coletados de outubro de 2023 a março de 2024. Os dados de biometria utilizados na análise estatística foram: Comprimento da carapaça – CC., – Largura da carapaça com espinho – LCe., Largura da carapaça sem espinho- LSe e Peso - Pt. Os resultados das análises biométricas indicaram que os siris da área de referência são maiores que os siris da área portuária. Quanto às alterações histológicas observadas, quantificou-se um maior número de lesões branquiais nos espécimes da área de referência, em contraste com um número significativo de lesões no hepatopâncreas da área portuária. Para isso, foram analisadas informações histológicas de 10 indivíduos em cada área por campanha, totalizando 40 indivíduos identificados como *Callinectes bocourti*. Outras espécies foram coletadas nas armadilhas de pesca em quantidades inferiores aos critérios deste estudo. As respostas dos biomarcadores são indicativas de estresse, seja originada da influência das atividades antrópicas, seja de alterações ambientais naturais.

Palavras-chave: Bioindicador., Histopatologia., Biomonitoramento.

Abstract

Port areas are of great importance for global cargo movement. However, these activities generate various environmental impacts, such as the spillage of pollutant cargo and contamination from vessel residues, which can affect local aquatic organisms. Species of the genus *Callinectes sp.* were evaluated for their potential as effective biomonitors. Specimens were collected from October 2023 to March 2024 from areas near the Port Complex located in the Baía de São Marcos – MA and from areas within the Baía do Tubarão Extractive Reserve, a federal conservation unit selected as a reference area. The biometric data used for statistical analysis included Carapace Length (CC), Carapace Width with Spine (LCe), Carapace Width without Spine (LSe), and Weight (Pt). The biometric analysis results indicated that the crabs from the reference area are larger than those from the port area. Regarding histological changes, a higher number of gill lesions were quantified in specimens from the reference area, whereas a significant number of lesions were observed in the hepatopancreas of crabs from the port area. Histological data from 10 individuals in each area per campaign were analyzed, totaling 40 individuals identified as *Callinectes bocourti*. Other species were captured in the fishing traps in numbers below the criteria for this study. The responses of the biomarkers are indicative of stress, either from anthropogenic influences or natural environmental changes.

Keywords: Bioindicator., Histopathology., Biomonitoring.

Lista de Figuras e gráficos

- Figura 1** - Locais de amostragem na Baía de São Marcos -MA e na Baía de Tubarão - MA. A1- Cajueiro., A2 – Ilha do Figura Gato. **8**
- Figura 2** - 2A: Landruá para coleta de siris. Figura 2B:Canião com isca utilizado como armadilha para coleta dos siris **9**
- Figura 3** - Etapas dos procedimentos histológicos. **11**
- Figura 4** - Alterações histopatológicas encontradas em brânquias de *Callinectes bocourti* coletados na Baía de São Marcos (A1) e Baía de Tubarão (A2) , Maranhão no período chuvoso e de estiagem. **14**
- Gráfico 1** - Frequência das alterações histológicas em brânquias de *Callinectes bocourti*, coletados na Baía de São Marcos (A1) e Baía de Tubarão (A2), Maranhão no período chuvoso e de estiagem. **15**
- Figura 5** - Alterações histopatológicas encontradas no hepatopâncreas de *Callinectes bocourti* coletados na Baía de São Marcos (A1) e Baía de Tubarão (A2) , Maranhão no período chuvoso e de estiagem. **16**
- Gráfico 2** - Frequência das alterações hepáticas de *Callinectes bocourti*, coletados na Baía de São Marcos (A1) e Baía de Tubarão (A2), Maranhão no período chuvoso e de estiagem. **16**

Lista de tabelas

- Tabela 1** - Variáveis físico-químicos (média e desvio padrão) da água coletada nos arredores do complexo portuário de São Luís (Cajueiro-A1) e na Baía de Tubarão (Ilha do Gato - A2) durante as estações chuvosa e seca, e seus respectivos valores de referência. **12**
- Tabela 2** - Dados de biometria (média \pm desvio padrão) de siris da espécie *Callinectes bocourti* gênero *Callinectes*, coletados nas Baías de São Marcos (A1) e Baía de Tubarão (A2), no Estado do Maranhão, no período de estiagem (outubro a dezembro de 2023) e chuvoso (janeiro a março de 2024). **13**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo Geral:	6
2.2 Objetivos Específicos:	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 Área de estudo	7
3.2 Amostragem	8
3.3 Parâmetros físico-químicos da água	9
3.4. Dados biométricos	9
3.5 Análise histológica	9
3.6 Análise Estatística	11
4. RESULTADOS	12
4.1 Análise físico-químicas	12
4.2 Dados de biometria	12
4.3 Análises histológicas em brânquias	13
4.4 Análises histológicas em hepatopâncreas	15
5. DISCUSSÕES E CONCLUSÕES	17
6 RECOMENDAÇÕES DE MANEJO	18
7. AGRADECIMENTOS	19
8. REFERÊNCIAS	19
ANEXO 1	25

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas tropicais são responsáveis pela maior parte da biodiversidade mundial, todavia, mesmo com a dependência humana dos serviços ecossistêmicos, os impactos negativos e as pressões sobre os ambientes naturais continuam crescendo (Duarte, 2017., Barros *et al.*, 2022). Salienta-se a influência das atividades humanas de habitação e a carcinicultura como ameaças aos manguezais e apicuns e o despejo de substâncias tóxicas nos estuários (Schaeffer-Novelli *et al.*, 2012., Lima *et al.*, 2019., Valiela *et al.*, 2020).

No Brasil, além do aumento da densidade populacional nas áreas costeiras, sem o devido planejamento, as atividades industriais próximas aos estuários e áreas de manguezal também têm crescido significativamente (Lima *et al.*, 2019., Kennish, 2002., Teichert *et al.*, 2016., Falcão *et al.*, 2020). O estuário da Baía de São Marcos, no Maranhão, é um exemplo dessas transformações, uma vez que está passando por processos de expansão urbana e de infraestrutura, o que tem impulsionado o desenvolvimento socioeconômico da região. Nesse local, encontra-se o Complexo Portuário de São Luís, que tem convivido com o crescimento de diversos empreendimentos industriais, como cimenteiras, fábricas de asfalto e indústrias de fertilizantes, além da intensificação das atividades minerárias (Coelho *et al.*, 2022). Diante desse cenário, o monitoramento ambiental do complexo industrial e portuário tornou-se indispensável, sendo a implementação de programas de biomonitoramento, utilizando espécies aquáticas residentes, uma estratégia cada vez mais necessária. Essas espécies são fundamentais, pois alterações nos níveis molecular, bioquímico ou celular podem indicar o grau de impacto de poluentes no ecossistema (Pinheiro-Souza *et al.*, 2021).

A pesquisa realizada compara pela primeira vez, exemplares de *Calinectes danae* e *Callinectes bocourti* a serem avaliados como organismo modelo em áreas da Baía de São Marcos e da Baía de Tubarão utilizando biomarcadores histológicos nesses organismos. Como todos os indivíduos da superfamília Portunoidea, estes animais possuem uma variedade de hábitos e são considerados indicadores biológicos de massas de água (Andrade *et al.*, 2015). As espécies estudadas apresentam grande tolerância à salinidade e podem ocupar áreas estuarinas, principalmente áreas com sedimento lodoso, até regiões costeiras e de mar aberto (Melo, 1996). Com relação a cadeia trófica são onívoros e detritívoros, alimentam-se de bivalves, peixes, gastrópodes e outros crustáceos. Devido o amplo nicho que as espécies de *Callinectes* ocupam, possuem contato direto com contaminantes metálicos por meio da coluna

d'água, devido ao hábito de predação com ingestão do próprio sedimento ao ingerir suas presas escondidas no mesmo (Mantelatto., Christofoletti 2001, Ortega *et al.*, 2022).

A exposição desses organismos aos xenobióticos levam a uma série de alterações nos órgãos que estão em constante contato com a água contaminada, como as brânquias e o hepatopâncreas (Alazemi, 1996., Bhavan, Geraldine, 2000). Nas brânquias algumas das lesões incluem fusão das lamelas, deslocamento da cutícula, ruptura de células pilares e entre outras que levam ao mau funcionamento do órgão respiratório desses animais. Enquanto no hepatopâncreas ocorre, por exemplo, vacuolizações, desintegração do lúmen e o aumento de células B como resposta ao estresse oxidativo do ambiente, visto que esse órgão está envolvido em processos de detoxificação, realizando a eliminação dos xenobióticos que entram nos túbulos hepatopancreáticos (Jerome *et al.*, 2017., Maharaja, 2015).

A detecção precoce dos diferentes tipos e níveis elevados de poluição é essencial para a gestão ambiental preventiva (Kadim., Risjani, 2022). Nesse sentido, os biomarcadores têm sido amplamente utilizados, pois permitem identificar alterações mensuráveis nos níveis bioquímicos, celulares, teciduais, de órgãos ou até mesmo em indivíduos inteiros (Smit *et al.*, 2009). Para uma avaliação ambiental mais precisa, recomenda-se o uso de múltiplas espécies sentinelas em programas de monitoramento, pois isso pode melhorar a capacidade de diagnóstico e previsão das alterações ambientais, além de facilitar a identificação dos impactos resultantes de múltiplos estressores (Baroudi *et al.*, 2020., Adam *et al.*, 2023). Há décadas, biomarcadores vêm sendo empregados para avaliar a saúde da biota e, conseqüentemente, do ambiente, ao monitorar os efeitos da presença de xenobióticos e das interações sinérgicas e/ou antagônicas entre contaminantes (Bianchi *et al.*, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Analisar os efeitos toxicológicos em crustáceos (*Callinectes sp.*) que habitam uma região portuária, por meio de biomarcadores histológicos.

2.2 Objetivos Específicos:

- Comparar a frequência e severidade das lesões branquiais em siris da Baía de São Marcos (praia do Cajueiro) e da Baía de Tubarão (Ilha do Gato), Maranhão.

- Comparar a frequência e severidade das lesões nos hepatopâncreas em siris da Baía de São Marcos (praia do Cajueiro) e da Baía de Tubarão (Ilha do Gato), Maranhão.

- Verificar a associação entre as frequências, níveis de severidade das lesões com as características físico-químicas da água e níveis de metais no ambiente

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Este trabalho tem como áreas de estudo a Baía de São Marcos (A1) e a Baía de Tubarão (A2) (Fig 1). Na primeira área estão as localidades próximas ao Porto do Itaqui, onde ocorrem grandes movimentações de cargas que incluem produtos e subprodutos de mineração, *commodities* ligadas ao agronegócio e diversos compostos derivados do petróleo (EMAP, 2023). Por conta disso, essa região sofre influência dessas substâncias que acabam sendo despejadas no ambiente aquático, tornando essa área pouco favorável à sobrevivência de algumas espécies residentes.

Na Baía do Tubarão está situado a reserva extrativista Baía do Tubarão, unidade de conservação federal, criada pelo Decreto Federal nº 9.340 de 05 de abril de 2018, com cerca de 224 hectares (ICMBio, 2021), que tem como um dos objetivos a preservação da diversidade biológica e garantia da subsistência da comunidade extrativista da região (BRASIL, 2018) As coletas foram realizadas na comunidade tradicional da Ilha do Gato (2,53467° S - 43,63871° W), no Município de Humberto de Campos. Essa região foi selecionada como área de referência por ser uma área protegida como unidade de conservação, distando cerca de 81,3 km das atividades portuárias e suas possíveis influências.

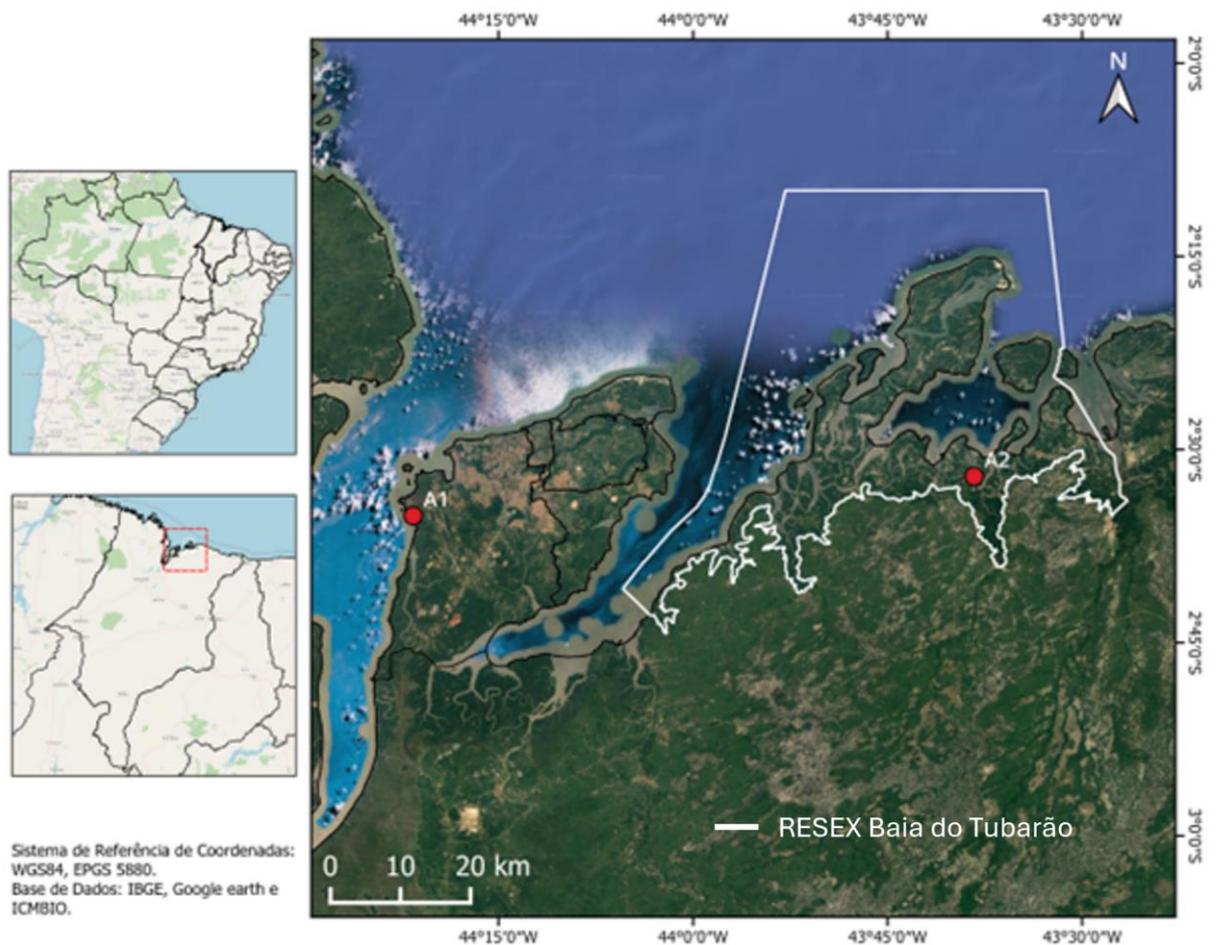


Figura 1 - Locais de amostragem na Baía de São Marcos -MA e na Baía de Tubarão - MA. A1- Cajueiro., A2 – Ilha do Gato.

3.2 Amostragem

As coletas trimestrais foram realizadas no período de estiagem, de outubro a dezembro de 2023 e no período chuvoso, de janeiro a março de 2024. Em cada área, portanto, foram realizadas duas campanhas de coleta. Por meio da pesca artesanal, 30 siris foram coletados em cada área. Para coleta de siris azuis (*C.danae*) e vermelhos (*C.bocourti*), foram fixados landruás na baixa mar, além de outras estratégias, como uso de caniços e redes fixas. As coletas da Baía do Tubarão contaram com o auxílio voluntário dos pescadores locais.(Fig. 2).

Após a captura, os indivíduos foram anestesiados em uma solução analgésica de óleo de cravo na concentração de 200mg/L, eutanasiados, medidos e pesados. Em seguida, foi feita a retirada das brânquias e hepatopâncreas utilizando pinças esterilizadas. Os órgãos foram depositados em recipientes plásticos contendo solução de Davidson para preservação dos tecidos. Por fim, os indivíduos foram acondicionados em sacos plásticos, devidamente

identificados e etiquetados, colocados em caixa térmica contendo gelo para serem transportados e armazenados no laboratório para identificação taxonômica.

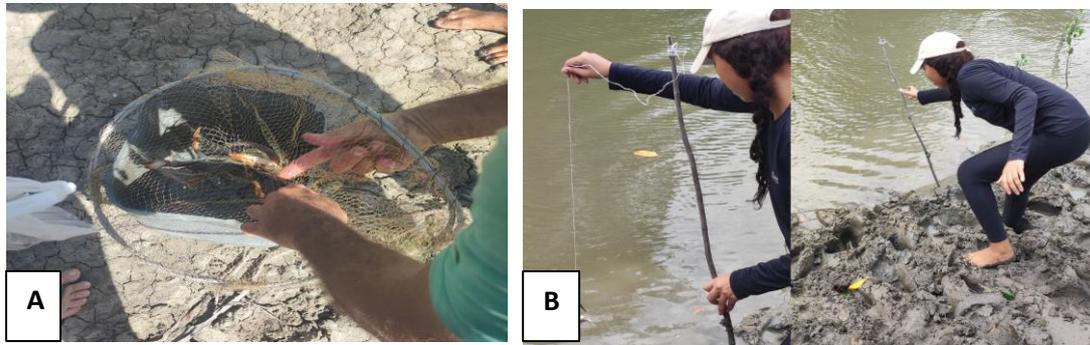


Figura 2 - 2A: Landruá para coletas de siris. Figura 2B: Caniço com isca utilizado como armadilha para coleta dos siris.

3.3 Parâmetros físico-químicos da água

Em cada localidade de coleta dos exemplares de siris foram medidos os seguintes dados abióticos com um medidor multiparâmetro HANNA® (modelo HI98194): pH, salinidade (mg/L) Oxigênio dissolvido (mg/L) e temperatura (°C).

3.4. Dados biométricos

O peso total (PT) de cada exemplar de siri foi registrado em balança digital de precisão de 0,1 g. Com um paquímetro de precisão de 0,1 cm foram medidos segundo Williams (1974) e Hajjej (2016): a Largura da Carapaça (LC), que é a medida da maior distância entre as duas extremidades laterais da carapaça, excluindo os espinhos laterais., Largura da Carapaça incluindo os espinhos laterais (LCe) conforme Sforza (2010) e Comprimento da Carapaça (CC). Para fins de padronização, foram selecionados somente os machos adultos (largura da carapaça > 60 mm) para análise de biomarcadores histológicos e bioquímicos (Pinheiro *et al.*, 2012), evitando desse modo quaisquer efeitos de sexo, muda e estágio de vida que foram relatados anteriormente para outros crustáceos decápodes (Chou *et al.*, 2000., Chen *et al.*, 2005).

3.5 Análise histológica

As brânquias e hepatopâncreas de cada exemplar de siri foram removidas com auxílio de pinças e foram armazenadas em recipientes plásticos e fixadas em solução de Davidson (24 h) contendo formalina (100%): 220 mL, álcool etílico (95 %): 330 mL, ácido acético glacial: 115 mL, água destilada: 335 mL. Em seguida, as amostras foram lavadas e mantidas em álcool 70% até o processamento histológico usual. Para produção das lâminas, os órgãos, já fixados,

passaram pelo processo de clivagem e colocados nos cassetes identificados com o nome da espécie, local e data de coleta (Figura 3A). Foram então mergulhados em séries crescentes de álcoois 80%, 90% e 100%, com o intervalo de 40 minutos entre cada um desses, processo esse conhecido como desidratação (Figura 3B). Após isso, os mesmos materiais passaram pela diafanização, onde foram colocados em Xilol I e Xilol II, pelo tempo de 1 hora e 2 horas, respectivamente. Para impregnação, os cassetes foram deixados em descanso por 1 hora na parafina I e 1 hora e meia na parafina II, todo esse processo em uma estufa a 60°C (Figura 3C). Os blocos de parafina foram seccionados em cortes de espessura de 5µm com auxílio de micrótomo (Leica RM 2125 RT), seguidas de secagem à temperatura ambiente no Laboratório LABOAq (UEMA) (Figura 3D e E). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) (Figura 3F, G e H). Em microscopia de luz foram analisados dois cortes para cada órgão de cada animal. Para o procedimento histológico e de coloração foram utilizadas metodologias adaptadas de Caputo *et al.* (2010) (ANEXO I).

As alterações foram identificadas com base em Maharajan *et al.* (2015, 2017), Negro (2015), Vasanthi *et al.* (2014), Rebelo *et al.* (2000). Após a identificação foram fotomicrografadas com auxílio de microscópio AXIOSKOP - ZEIS. Uma quantificação aproximada dos efeitos histopatológicos foi realizada conforme Rebelo *et al.* (2000), através da contagem do número de lamelas afetadas por cada patologia, em relação ao número total de lamelas em cada brânquia. Uma lamela foi considerada afetada (e, portanto, contada) independente da gravidade da lesão (REBELO *et al.*, 2000).

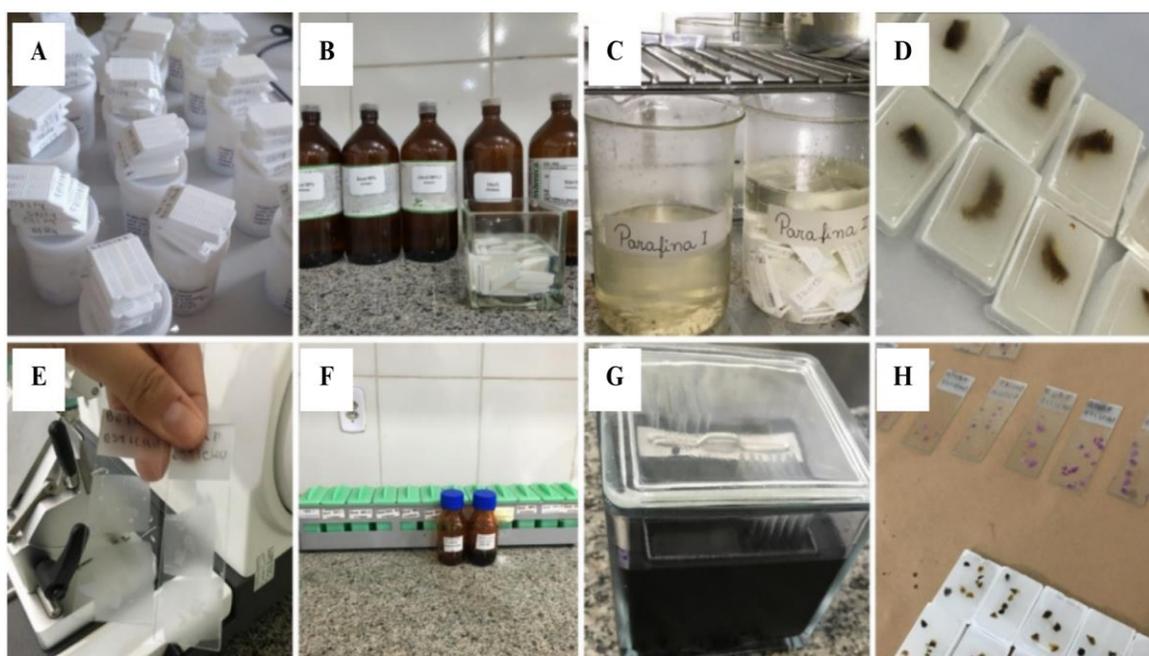


Figura 3 – Etapas dos procedimentos histológicos. A: órgãos colocados em cassetes, B: processos de desidratação, C: impregnação em parafina, D e E: cortes em micrótomo e secagem em temperatura ambiente, F, G e H: cortes corados com Hematoxilina e Eosina.

3.6 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade com o teste de Levene. Para todos os dados com distribuição normal, aplicamos uma ANOVA (Análise de Variância) para investigar se há diferenças significativas entre os tratamentos (pontos de amostragem em diferentes estações do ano). Quando constatadas diferenças significativas entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Tukey *a posteriori*, para saber quais tratamentos diferiram entre si. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas com a utilização do programa *Graphpad Prism 8.4.2*, com os testes estatísticos efetuados conforme recomendado por Sokal & Rohlf (2003).

4. RESULTADOS

4.1 Análise físico-químicas

Os valores dos parâmetros físico-químicos estão representados na Tabela 1. Os resultados foram analisados de acordo com os valores permitidos pela legislação brasileira (CONAMA 357/2005) para águas salobras Classe 3. Os valores de OD% estavam abaixo do estabelecido pela norma ambiental nas duas áreas, com exceção da área de referência (A2) no período de estiagem. Não houve diferença significativa entre os parâmetros físico-químicos ($p < 0,05$) entre as diferentes áreas, tampouco quando analisados os dados dos diferentes períodos (chuvoso e seco) dentro de cada área.

Tabela 1 - Variáveis físico-químicos (média e desvio padrão) da água coletada nos arredores do complexo portuário de São Luís (Cajueiro-A1) e na Baía de Tubarão (Ilha do Gato - A2) durante as estações chuvosa e seca, e seus respectivos valores de referência.

Parâmetros Físico-químicos	A1 (Baía de São Marcos)		A2 (Baía de Tubarão)		Valores referência*
	Estiagem	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso	
Temperatura(°C)	31,2 ± 0,21	28,80±0,16	29,81± 0,81	29,51 ± 0,38	28-32
pH	8,86 ±0,026	8,68±0,05	8,55± 1,79	7,836 ± 0,21	55-9
Salinidade	29,3 ± 0,31	25,17±0,23	43,39±1,02	32,87 ± 0,34	0,5 a 30
Saturação OD %	35,5± 0,01	59,2 ±2,36	91,2 ± 6,23	52,25 ± 1,48	60–80

*Limites do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na resolução nº. 357 de 2005.

4.2 Dados de biometria

As médias e desvios-padrão dos dados biométricos de *C.bocourti* são mostrados na Tabela 2. O peso e o tamanho médios dos siris coletados durante a estação chuvosa foram maiores para A2 do que para A1, no entanto, durante a estação chuvosa, a medida Lse foi maior na área portuária (A1) mesmo não havendo diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as áreas e entre estações.

Tabela 2 - Dados de biometria (média ± desvio padrão) de siris da espécie *Callinectes bocourti* gênero Callinectes, coletados nas Baías de São Marcos (A1) e Baía de Tubarão (A2), no Estado do Maranhão, no período de estiagem (outubro a dezembro de 2023) e chuvoso (janeiro a março de 2024).

Coletas	A1	A2
Out-Dez		
Pt (g)	58,79 ± 18,22	83,60 ± 24,74
CC (cm)	3,48 ± 0,39	5,46 ± 0,42
LCe (cm)	9,25 ± 2,10	9,82 ± 0,42
LSe (cm)	6,40 ± 1,20	8,70 ± 0,35
Jan-Mar		
Pt (g)	71,46 ± 21,80	106,47 ± 48,94
CC (cm)	4,96 ± 0,59	5,55 ± 0,68

LCe (cm)	8,13 ± 1,02	10,75 ± 1,60
LSe (cm)	9,78 ± 1,30	8,98 ± 1,37

Pt, peso úmido total., CC, comprimento da carapaça., LCe, largura da carapaça com espinho., LSe, largura da carapaça sem espinho.

4.3 Análises histológicas em brânquias

Todas as lesões encontradas nos indivíduos da área portuária também ocorreram em menor frequência nos espécimes coletados na Baía do Tubarão. A análise histopatológica permitiu identificar nove tipos de alterações: inchaço da lamela primária, nódulos hemocíticos, perda das células pilares das lamelas secundárias, colapso lamelar, deformidade e rompimento do canal marginal presente no ápice das lamelas secundárias, hiperplasia, deslocamento da cutícula, além da presença de parasitas nas lamelas de alguns espécimes (Figura 4). As brânquias são organizadas a partir da lamela branquial primária, que se divide em lamelas primárias ou filamentos (Figura 7A). Como ainda não existe um método específico para crustáceos, as análises das lesões são identificadas, devido às semelhanças, aos métodos e índices desenvolvidos para peixes, como é o caso do método de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994). Nessa análise, para atender o *n* amostral necessário, apenas a espécie *Callinectes bocourti* foi considerada.

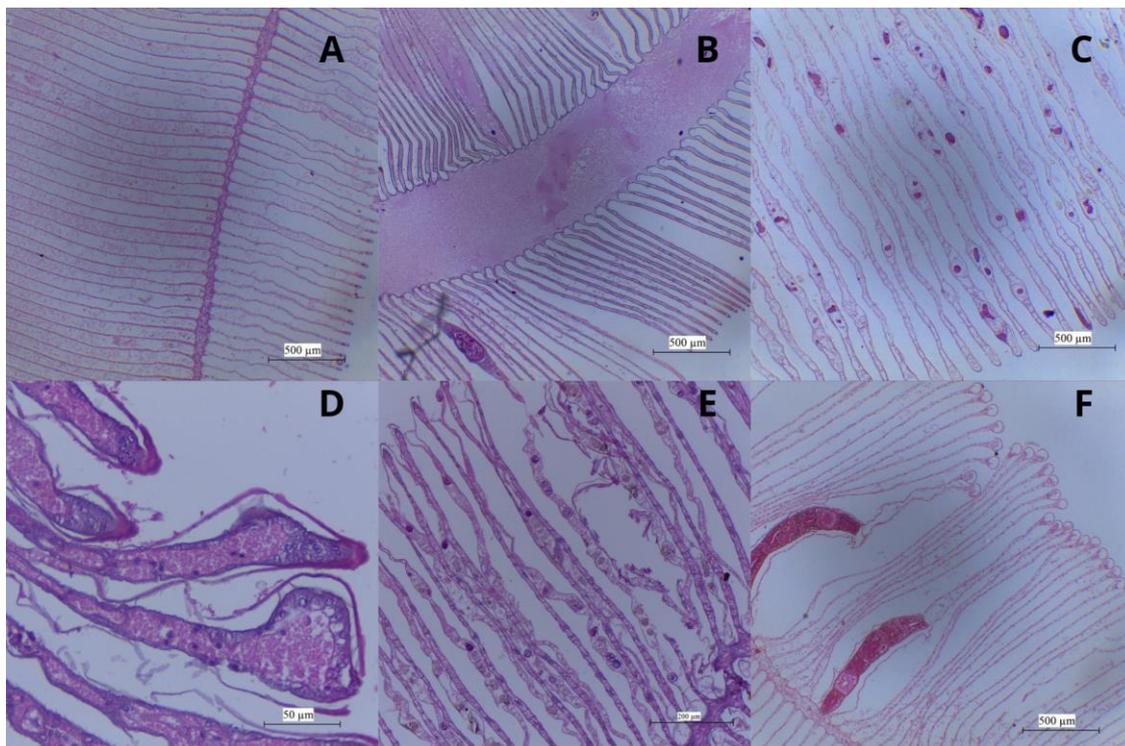


Figura 4 - Alterações histopatológicas encontradas em brânquias de *Callinectes bocourti* coletados na Baía de São Marcos (A1) e Baía de Tubarão (A2), Maranhão no período chuvoso e de estiagem. A: Controle, B: Inchaço da lamela primária, C: Nódulo hemocítico, perda das células pilares e colapso das lamelas, D: Deformação do canal marginal, deslocamento da cutícula e hiperplasia, E: Rompimento do canal marginal, F: Parasitas.

Mesmo não havendo diferenças estatísticas entre as médias de cada lesão nas duas áreas ($P= 0,7405$), destaca-se que as frequências mais altas de lesões em brânquias foram registradas nos siris coletados na área A2, área de referência (Gráfico 1).

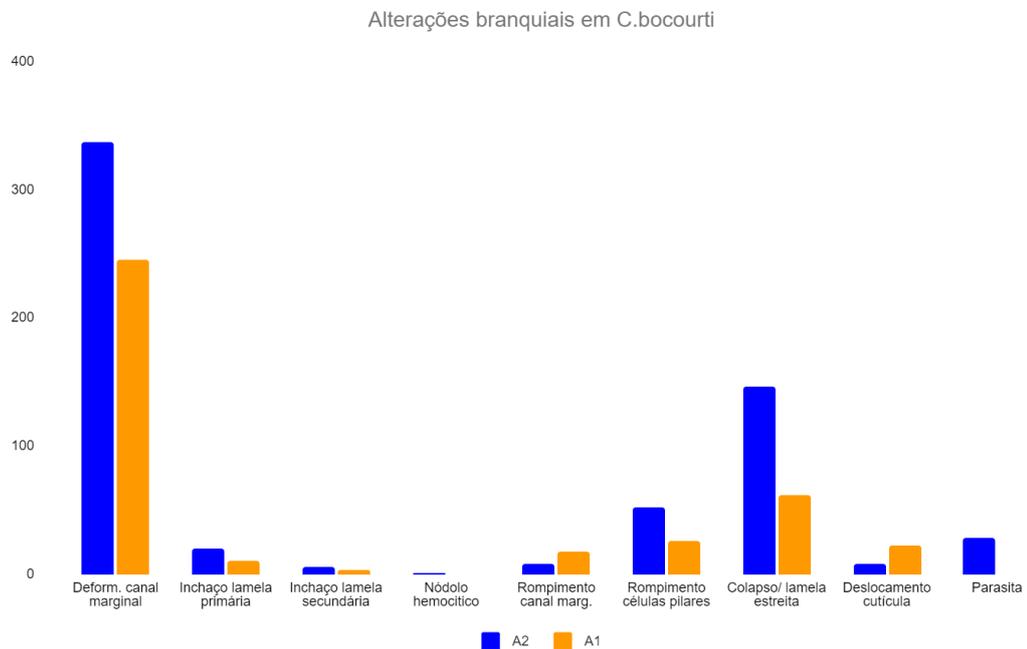


Gráfico 1 - Frequência das alterações histológicas em brânquias de *Callinectes bocourti*, coletados na Baía de São Marcos (A1) e Baía de Tubarão (A2), Maranhão no período chuvoso e de estiagem.

4.4 Análises histológicas em hepatopâncreas

Cinco tipos de lesões foram encontradas no hepatopâncreas dos indivíduos de ambas as áreas de estudo. Essas alterações envolvem o distendimento do lúmen, a presença de vacúolos grandes, células B formando vácuo, a delaminação do epitélio e danificação da

camada mioepitelial (Figura 5). Houve alterações significativas entre as áreas ($p < 0,05$), sendo as lesões mais frequentes na área portuária (A1).

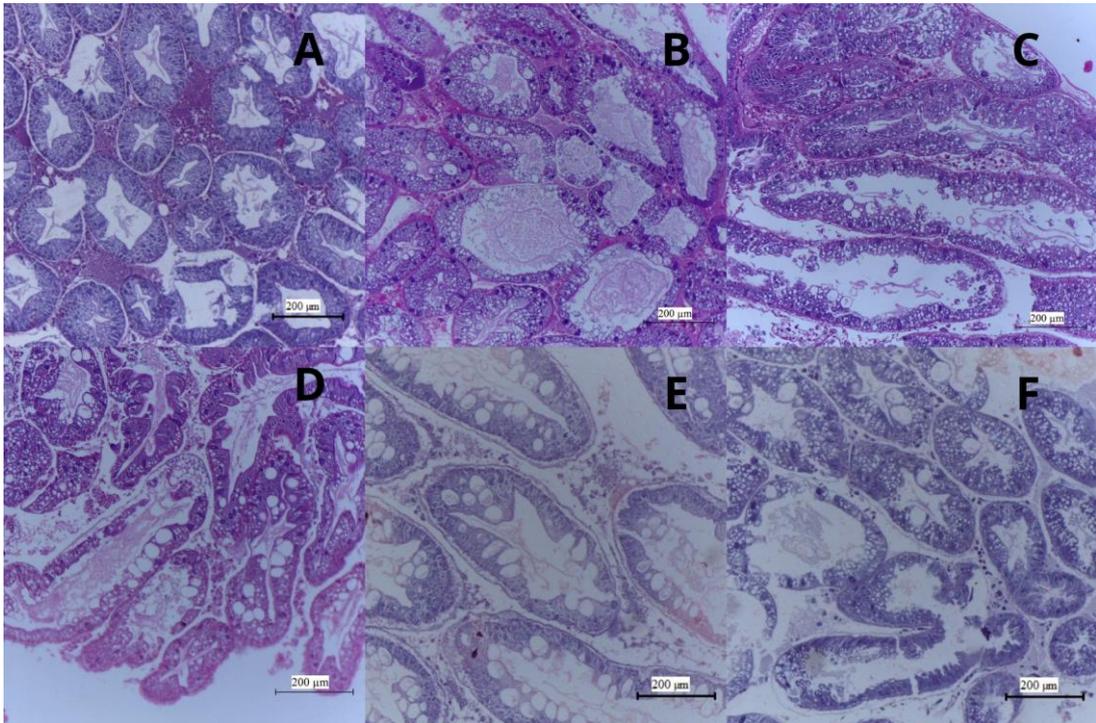


Figura 5 - Alterações histopatológicas encontradas no hepatopâncreas de *Callinectes bocourti* coletados na Baía de São Marcos (A1) e Baía de Tubarão (A2), Maranhão no período chuvoso e de estiagem. A: Controle, B: Lúmen distendido, C: Vacúolo grande, D: Células B vacuolizadas, E: Delaminação do epitélio, F: Camada mioepitelial danificada.

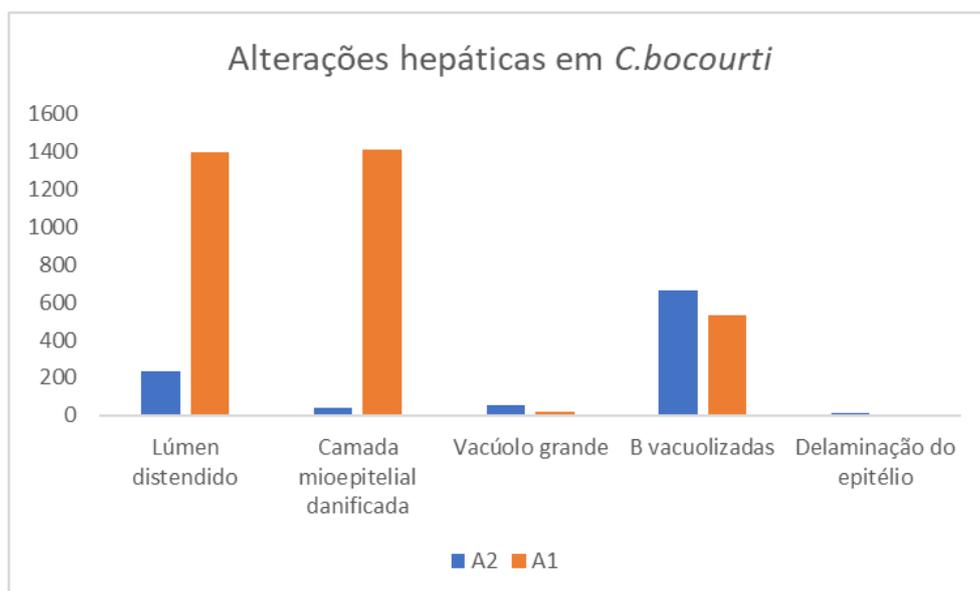


Gráfico 2- Frequência das alterações hepáticas de *Callinectes bocourti*, coletados na Baía de São Marcos (A1) e Baía de Tubarão (A2), Maranhão no período chuvoso e de estiagem.

5 DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

A redução do oxigênio dissolvido (OD) apresentada nas duas áreas pode ter um efeito negativo nos organismos presentes nessas áreas, visto que estudos em aquicultura demonstram que afeta o crescimento, a saúde e o bem-estar dos peixes de aquicultura, tanto devido à alimentação reduzida como ao metabolismo alterado (Gamperl *et al.*, 2020). Na A2, a salinidade foi acima do esperado para águas salobras. Isso tem relação com o aumento de temperatura na última década, onde os ambientes costeiros marinhos e estuarinos estão experimentando frequentes eventos de temperaturas extremas e salinidades alteradas. Essas mudanças podem aumentar a sua suscetibilidade a doenças infecciosas e comprometer o funcionamento dos órgãos, como ocorreu com as brânquias. (Sullivan *et al.*, 2018).

Mesmo não havendo diferença significativa nas médias de lesões nas brânquias das duas áreas, a maior frequência de lesões nas brânquias foram encontradas nos indivíduos da A2, onde a lamela primária apresentou um inchaço por toda a sua extensão, o que sugere uma alta exposição a poluentes de origem agrícola e doméstica atuantes nas áreas de contaminação (Maharajan *et al.*, 2015). O deslocamento da cutícula e a perda das células pilares são alterações consideradas graves, uma vez que alteram a estrutura das células e tecidos. Além disso, essa perda de células pilares leva a outro tipo de alteração, o colapso das lamelas, que, por sua vez, compromete a função respiratória do animal (Jesus *et al.*, 2020., Negro, Collins, 2017). Estudos em *Litopenaeus stylirostris* inferem que a existência de nódulos hemocíticos indicam a presença de bactéria do gênero *Vibrio* (Hernandez, Sandra, 2008). Ainda, segundo Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), o levantamento epitelial e hiperplasia (Fig 4E), surgem como tentativas de defesa das brânquias quando expostas aos poluentes, dificultando o processo das trocas gasosas. Portanto, alterações neste órgão servem como um alerta precoce quanto à possibilidade da presença de poluentes ambientais, o que pode causar desequilíbrio metabólico e comprometer a sobrevivência e o desenvolvimento ideal (De Jesus *et al.*, 2021).

As alterações no hepatopâncreas foram significantes para a A1, onde o mesmo apresentou alterações nas estruturas das células, como a vacuolização das células B (Fig 5D), que pode ser explicada pela intensa atividade do hepatopâncreas no acúmulo e eliminação de substâncias estranhas que entram em contato com o órgão através da alimentação, tendo como resposta um grande número de células F se convertendo em células B. Além disso, a perda da

forma estrelada do lúmen no interior dos túbulos, a delaminação do epitélio que envolve os túbulos, bem como os danos observados nas camadas epiteliais representam respostas do órgão a altas concentrações de poluentes industriais encontrados em áreas portuárias, que levam a alterações morfológicas das células epiteliais presentes nos túbulos (Maharajan *et al.*, 2015). Dessa forma, como o hepatopâncreas está envolvido em processos de digestão, excreção, desintoxicação e absorção (Bhavan, Geraldine, 2000), além de ser um importante local para biotransformação (Maharajan *et al.*, 2015), seu dano leva ao baixo desempenho de processos metabólicos essenciais e, conseqüentemente, afeta as respostas ambientais do animal.

As frequências mais altas de lesões nas brânquias registradas nos siris coletados na área A2, área de referência, foram ocasionadas por estresse agudo (Figura 5), podendo ter relação com a distância entre a Baía do Tubarão e Baía de São Marcos, o que propicia a passagem de uma área para outra, visto que os juvenis migram para os estuários para se protegerem da pressão de predação e as fêmeas migram para essas áreas de maior salinidade na época de desova, favorecendo o desenvolvimento embrionário e larval (Araújo, 2011). No entanto, no hepatopâncreas, a maioria das lesões estatisticamente significativas, foram nos organismos da Baía de São Marcos, lesões sugestivas de poluentes que submetem os organismos ao estresse crônico na área portuária.

6 RECOMENDAÇÕES DE MANEJO

Além de *Callinectes bocourti*, foram coletadas espécies de *Callinectes danae*, *Callinectes sapidus* e mais duas espécies de siris azuis inconclusivas. Este resultado nos conduz a salientar a necessidade de um levantamento da biodiversidade do táxon *Callinectes sp.* na RESEX. Além disso, recomenda-se uma investigação nesta unidade de conservação da presença de xenobióticos na água e /ou no sedimento por meio da análise de metais pesados, considerando a proximidade da grande São Luís.

O monitoramento contínuo dessa área deve ser realizado com o objetivo obter mais resultados acerca da qualidade ambiental e saúde das espécies e, conseqüentemente, garantir a conservação, tendo em vista a importância desses recursos para a subsistência das comunidades beneficiárias da Reserva Extrativista Baía do Tubarão.

7 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao ICMBio, ao CNPq, aos pescadores José de Ribamar Sá Menezes de Azevedo e Jorge Luis Sá Menezes de Azevedo que se dedicaram em cada expedição e aos meus orientadores.

8 REFERÊNCIAS

ADAM, M. L., TORRES, R. A., BOOS, H., PINHEIRO, M. A. A. Espécies sentinelas: Monitoramento Ambiental com Base em Biomarcadores de Efeito Cito- e Genotóxico. Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha, v.12, p. 1-28, 2023.

ALAZEMI, B. M., LEWIS, J. W., & ANDREWS, E. B. Gill Damage in the Freshwater Fish *Gnathonemus Petersii* (Family: Mormyridae) Exposed to Selected Pollutants: An Ultrastructural Study. *Environmental Technology*, 17(3), 225–238, 1996. <https://doi.org/10.1080/09593331708616381>

ANDRADE, L. S, FRAMESCHI, COSTA, I. F. R. C, CASTILHO, A. L, FRANSOZO, A. L. A. The assemblage composition and structure of swimming crabs (Portunoidea) in continental shelf waters of southeastern Brazil, *Continental Shelf Research*, Volume 94, Pages 8-16, 2015. ISSN 0278-4343. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.csr.2014.12.005>.

ARAÚJO, M. S. L., BARRETO, A.V., NEGROMONTE, A. O., SCHWAMBORN, R. Population ecology of the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae) in a Brazilian tropical estuary. *Biological Sciences, An. Acad. Bras. Ciênc.* 84 (1), 2012. DOI:<https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000100013>

BAROUDI, F., AL ALAM, J., FAJLOUN, Z., & MILLET, M. (2020). Snail as sentinel organism for monitoring the environmental pollution; a review. *Ecological Indicators*, 113, 106240, 2020. DOI:10.1016/j.ecolind.2020.106240.

BARROS, T.L., BRACEWELL, S.A., mayer-pinto, M., DAFFORN, K.A., SIMPSON, S.L., FARRELL, M., JOHNSTON, E.L. Wildfires cause rapid changes to estuarine benthic habitat.

Environ. Pollut. (Environmental Pollution)308, 119571, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119571>

BIANCHI, E., LESSING, G., BRINA K.R., ANGELI, L., ANDRIGUETTI, N. B., PERUZZO, J.R.S., NASCIMENTO, C.A., SPILKI, F. R., ZIULKOSKI, A.L., SILVA, L.B. Monitoring the genotoxic and cytotoxic potential and the presence of pesticides and hydrocarbons in water of the Sinos River Basin, Southern Brazil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 72, n. 3, p. 321–334, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-016-0334-0>.

BHAVAN, S ., GERALDINE, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan, Aquatic Toxicology, Volume 50, Ed. 4, Páginas 331-339 , 2000.DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00096-5).

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

BRASIL. Decreto nº 9.340, de 5 de abril de 2018. Cria a reserva extrativista da Baía do Tubarão, localizada nos Municípios de Icatu e Humberto de Campos, Estado do Maranhão. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 6 abr.2018.

CAPUTO, L. F. G., GITIRANA, L. de B., MANSO, P. P. de A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E., CAPUTO, L., AMENDOEIRA, R. (Org.). Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV., CAPUTO., GITIRANA., MANSO, 2010. p. 89-188.

COELHO, A. L. *et al.* Os impactos da expansão do setor portuário na capital do estado do Maranhão. **Revista do CEDS**, v. 2, n. 11, 2022.

CHEN, M.-H., CHEN, C.-Y., CHOU, H.-Y., WEN, T.-C. Gender and size effects of metal bioaccumulation on the rock crab, *Thalamita crenata*, in Dapeng Bay, southwestern Taiwan. Mar. Pollut. Bull. 50, 463-484, 2005.

CHOU, C.L., PAON, L.A., MOFFATT, J.D., ZWICKER, B. Copper contamination and cadmium, silver and zinc concentrations in the digestive glands of the American lobster

(*Homarus americanus*) from the Inner Bay of Fundy, Atlantic Canada. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 470-477, 2000.

De Jesus, W. B., ANDRADE, T. S., SOARES, S. H., PINHEIRO-SOUSA, D.B. S., OLIVEIRA, S. R., TORRES, H. S., PROTAZIO, G. S., DA SILVA, D. S., SANTOS, D.M., CARVALHO NETA, A. V., BENJAMIN, L. A., CARVALHO-NETA, R. N. Biomarkers and occurrences of heavy metals in sediment and the bioaccumulation of metals in crabs (*Ucides cordatus*) in impacted mangroves on the Amazon coast, Brazil, *Chemosphere*, Volume 271, 2021, 129444, ISSN 0045-6535. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129444>.

DE JESUS, W.B., OLIVEIRA, S.R.S.D., ANDRADE, T.S.O.M., et al. Biological responses in gills and hepatopancreas of *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) as indicative of environmental contamination in mangrove areas in Maranhao State, Brazil. *Lat. Am. J. Aquat.* 48, 226-236, 2020.

DUARTE, L.F.A., SOUZA, C.A., PEREIRA, C.D.S., PINHEIRO, M.A.M. Metal toxicity assessment by sentinel species of mangroves: In situ case study integrating chemical and biomarkers analyses, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 145, 2017, Pages 367-376, ISSN 0147-6513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.051>.

EMAP (Empresa Maranhense de Administração Portuária). Disponível em: <<https://www.portodoitaqui.com/porto-do-itaqui/operacoesportuarias/movimentacao-de-carga>>. Acessado em 09/01/2024.

FALCÃO, C.B.R., PINHEIRO, M.A.A., TORRES, R.A., ADAM, M.L. Spatial-temporal genome damaging in the blue crab *Cardisoma guanhumi* as ecological indicators for monitoring tropical estuaries, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 156, 111232, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111232>.

GAMPERL, A. K., AJIBOYE, O. O., ZANUZZO, F. S., SANDRELLI, R. M., PERONI, E. F. C., BEEMELMANN, A. The impacts of increasing temperature and moderate hypoxia on the production characteristics, cardiac morphology and haematology of Atlantic Salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture*, Volume 519, 734874, ISSN 0044-8486, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734874>.

HAJJEJ G., Sley A. & O. JARBOUI. Morfometria e relação comprimento-peso no caranguejo azul, *Portunus segnis* (Decapoda, Brachyura) do Golfo de Gabes, Tunísia. *International Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(12): 10-16, 2016.

HERNÁNDEZ, C, SANDRA, Edith de la. Evaluación del efecto de los fosfolípidos dietarios sobre la respuesta inmune de camarones *Litopenaeus stylirostris* infectados con *Vibrio parahaemolyticus*. Tese de Doutorado. Universidad Autónoma de Nuevo León, 2008.

HENRY, R. P. Membrane-associated carbonic anhydrase in gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Am. J. Physiol.* 252, R966–R971, 1987.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de conservação da Biodiversidade). Disponível em:<<https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/marinho/lista-de-ucs/resex-da-baia-do-tubarao>> Acessado em 09/01/2024.

JEROME, C. F., HASSAN, A., GANIAT, O., OLUWOLE O. Odujoko., CHUKWUKA, A. V.. Metal uptake, oxidative stress and histopathological alterations in gills and hepatopancreas of *Callinectes amnicola* exposed to industrial effluent, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 139, Pages 179-193, ISSN 0147-6513, 2017. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.032>.

KENNISH, M.J. .Environmental threats and environmental future of estuaries *Environ. Conserv.*, 29 (1), pp. 78-107, 2002.

KADIM, M.K., RISJANI, Y. Biomarker for monitoring heavy metal pollution in aquatic environment: An overview toward molecular perspectives, *Emerging Contaminants*, Volume 8, Pages 195-205, 2022, ISSN 2405-6650, <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2022.02.003>.

LIMA, T. B. B. de ., SILVA, M. R. F. da ., & CARVALHO, R. G. de. Artisanal fishing, shrimp farming and mangroves: perspectives on the Federal Law nº 12651/2012 and the use of “apicum” and “salgado” areas in Canguaretama/RN, Brazil. *Sociedade & Natureza*, 31, e37481, 2019. doi: <https://doi.org/10.14393/SN-v31n1-2019-37481>

LUCU, C. Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. *Comp. Biochem. Physiol.* 97A, 297–306, 1990. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(90\)90615-Y](https://doi.org/10.1016/0300-9629(90)90615-Y)

MANTEL, L. H. & FARMER, L. L. Osmotic and ionic regulation. In *The Biology of Crustacea* (ed. in chief E. Bliss), vol. 5 (ed. L. H. Mantel), pp. 53–161. London: Academic Press, 1983.

MELO, G. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. 1996.

NEGRO, C.L. Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: tricho-dactylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 87-94, 2015.

MAHARAJAN, A., NARAYANASAMY, Y., GANAPIRIYA, V., SHANMUGAVEL, K. Histological alterations of a combination of Chlorpyrifos and Cypermethrin (Nurocombi) insecticide in the freshwater crab, *Paratelphusa jacquemontii* (Rathbun). *The Journal of Basic & Applied Zoology*, Volume 72, 104-112, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.08.002>.

ORTEGA, P., VITORINO, H. A., GREEN, S., ZANOTTO, F. P., CHUNG, J. S., MOREIRA, R. G. Experimental effects of cadmium on physiological response of *Callinectes danae* (Crustacea, Portunidae) from environments with different levels of Cd contamination, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 251, 109210, 2022. ISSN 1532-0456, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109210>.

POLEKSIĆ, V, MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal Chronic Eff Pollut Freshw Fish* 339–352, 1994.

REBELO, M., RODRIGUEZ, E.M., SANTOS, E.A., et al. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 125, 157-164, 2000.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y., ROVAI, AS, COELHO-JR, C., MENGHINI, RP., De Almeida, R. *Alguns Impactos do PL 30/2011 Sobre os Manguezais Brasileiros. Código Florestal e a Ciência: o que Nossos Legisladores Ainda Precisam Saber*. Comitê Brasil: Brasília, 2012.

SMIT, M. G. D., BECHMANN, R. K., HENDRIKS, A. J., SKADSHEIM, A., LARSEN, B. K., BAUSSANT, T., BAMBER, S., SANNI, S. Relating biomarkers to whole-organism effects using species sensitivity distributions: A pilot study for marine species exposed to oil. *Environ Toxicol. Chem.*, v.28, p.1104–1109, 2009.

SULLIVAN TJ, NEIGEL JE. Effects of temperature and salinity on prevalence and intensity of infection of blue crabs, *Callinectes sapidus*, by *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in Louisiana. *J Invertebr Pathol*. 2018. doi: 10.1016/j.jip.2017.11.004. Epub 2017 Nov 7. PMID: 29126967.

SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. New York: W.H.Freeman, 3rd Ed., 887p,2003.

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

TEICHERT,N. BORJA, A., CHUST,G., URIARTE, A., LEPAGE. M. Restoring fish ecological quality in estuaries: implication of interactive and cumulative effects among anthropogenic stressors .*Sci. Total Environ.*, 542, 2016, pp. 383-393

VASANTHI, R. L., MURUGANANDAM, A., REVATHI, P., Baskar B, JAYAPRIYAN, K., BABURAJENDRAN, R., MUNUSWAMY, N. The application of histo-cytopathological biomarkers in the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) to assess heavy metal toxicity in Pulicat Lake, Chennai. *Mar. Pollut. Bull.* 81, 85- 93, 2014.

VALIELA, I., JUMAN, R., ASMATH, H., HANACEK, D., LLORET, J., ELMSTROM, E., CHENOWETH, K., BROOKSHIRE, P. T. J. Water quality, nutrients, and stable isotopic signatures of particulates and vegetation in a mangrove ecosystem exposed to past anthropogenic perturbations. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 35:101208, 2020. doi: 10.1016/j.rsma.2020.101208

WILLIAMS, A.B. The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda, Portunidae). Fish. Bull. 72 (3):685-798, 1974.

ANEXO I- Protocolos adaptados de inclusão em parafina e coloração de lâminas.

Quadro 1- Protocolo de impregnação, adaptado de Caputo *et al.* (2010).

ETAPA	AGENTE	TEMPO
DESIDRATAÇÃO	Álcool 80%	40 min
	Álcool 90%	40 min
	Álcool 100% I	40 min
DIAFANIZAÇÃO	Xilol I	1 hora
	Xilol II	2 horas
IMPREGNAÇÃO 60°C	Parafina I	1 hora
	Parafina II	1h 30 min

Quadro 2- Protocolo de coloração, adaptado de Caputo *et al.* (2010).

ETAPA	AGENTE	TEMPO
DESPARAFINIZAÇÃO	Estufa 60° C	20 min
	Xilol I	5 min
HIDRATAÇÃO	Álcool 100% I	5 min
	Álcool 100% II	5 min
	Álcool 100% III	5 min
	Álcool 90%	5 min
	Álcool 80%	5 min
LAVAGEM	Água corrente	2 min
COLORAÇÃO	Hematoxilina	40 segundos
LAVAGEM	Água corrente	10 min
COLORAÇÃO	Eosina	3 segundos
DESIDRATAÇÃO	Álcool 95%	5 mergulhos
	Álcool 100% III	5 mergulhos
	Álcool 100% II	5 mergulhos

	Álcool 100% I	5 mergulhos
DIAFANIZAÇÃO	Xilol II	5 mergulhos
FIXAÇÃO	Entellan	*