

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS EXPERIMENTAL DO LITORAL PAULISTA
UNIDADE DO LITORAL PAULISTA

A INFLUÊNCIA DE METAIS PESADOS NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
***Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763) (BRACHYURA, OCYPODIDAE),**
EM MANGUEZAIS DO LITORAL PAULISTA

Karina Rodrigues da Silva Banci

São Vicente - SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS EXPERIMENTAL DO LITORAL PAULISTA
UNIDADE DO LITORAL PAULISTA

A INFLUÊNCIA DE METAIS PESADOS NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
***Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763) (BRACHYURA, OCYPODIDAE),**
EM MANGUEZAIS DO LITORAL PAULISTA

Karina Rodrigues da Silva Banci

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Antonio Amaro Pinheiro

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Campus Experimental do Litoral Paulista (CLP), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Habilitação em Biologia Marinha.

São Vicente - SP

2008

Banci, Karina Rodrigues da Silva

A influência de metais pesados na diversidade genética de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae) em manguezais do Litoral Paulista. / Karina Rodrigues da Silva Banci – São Vicente, 2008.

55 p.

Trabalho de conclusão (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista - Unidade São Vicente.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Antonio Amaro Pinheiro

Co-orientação: Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira

1. Decapoda (Crustacea) 2. Caranguejo - Genética

CDD 595.384

Palavras-chaves: *Ucides cordatus*, RAPD, diversidade genética, manguezal, metais pesados, conservação.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Aquisição e Tratamento da Informação (STATI) da UNESP, Campus Experimental do Litoral Paulista.

Dedico este trabalho à toda minha família,
ressaltando aqui minha mãe, pelo
companheirismo, dedicação, amizade...
Enfim, por ser a melhor mãe do mundo!

*"Pedras no caminho? Guardo todas, um dia
vou construir um castelo." – Fernando Pessoa*

Vida

*Já perdoei erros quase imperdoáveis,
tentei substituir pessoas insubstituíveis
e esquecer pessoas inesquecíveis.*

*Já fiz coisas por impulso,
já me decepcionei com pessoas
que nunca pensei que iriam me decepcionar,
mas também decepcionei alguém.*

*Já abracei para proteger,
já dei risada quando não podia,
fiz amigos eternos,
amei e fui amado,
mas também já fui rejeitado,
fui amado e não amei,
já gritei e pulei de tanta felicidade,
já vivi de amor e fiz juras eternas,
"quebrei a cara" muitas vezes,
já chorei ouvindo música e vendo fotos,
já liguei só pra escutar uma voz,
me apaixonei por um sortiso,
já pensei que fosse morrer de tanta saudade e
tive medo de perder alguém especial (e acabei perdendo)!*

Mas vivi!

E ainda Vivo!

Não passo pela vida... e você também não deveria passar.

Viva!

*Bom mesmo é ir a luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante."*

- Augusto Branco -

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, minha família. Mãe, você é a pessoa mais importante no mundo todo pra mim, e sem todo o seu apoio, companhia, amizade, sem suas instruções, seus carinhos, ensinamentos, broncas e bons exemplos, nem sei o que seria de mim! Pai, apesar de todas as dificuldades que se colocaram entre nós, creio que conseguimos ultrapassar todas, e queria te dizer que tenho um carinho muito grande por você, uma grande admiração, muito orgulho por te ter como pai, e queria agradecer todo o apoio, presença, e também o fato de você ter expandido meus horizontes, abrindo mais minha cabeça. Vó (Iolanda) e vô (Valdo, meu segundo pai), eu amo muitos vocês, e acho que nunca conseguirei retribuir todo o cuidado, atenção e carinho que vocês sempre dedicaram a mim. Aos meu terceiro pai, Telo, todo meu amor e admiração, e meu profundo agradecimento por todo o carinho. Às minha tias Márcia e Adriana e à minha madrastra Margareth, agradeço pela amizade, cumplicidade e pelos conselhos. Aos meu tios Dinho e Silmara, agradeço principalmente pelas muitas risadas e momentos alegres. Aliás, agradeço a família toda pelas risadas (tenho que admitir que nossa família é bastante feliz, mesmo com todos os desentendimentos que às vezes acontecem), incluindo aqui os agradecimentos aos meu primos (Marcelinho, Raul, Juliano, Kauê e Victória), e aos agregados da família (Brigite, Solange, Isolda, Oldair, Aldaísa, Gustavo). Amo vocês muito, família minha!!!! Meus agradecimentos, ainda, aos meus tios Valdemir, Silvania, Valter, Adriana, Vanderli e Regina (quase tia!), meu avós Neusa e Celdo e meus primos Silmar, Patrícia, Mayra, Vatinho, Leonardo, Ricardo, Heloísa, Maria Eduarda e Maria Luíza. Madrinha, Padrinho, Tuta, Fio e Tita, obrigada por todo o apoio e carinho que vocês sempre dedicaram a mim. Aos meus amores, Tiffany e Teco, os cachorros mais lindos do mundo, motivos de minha grande alegria, agradeço pelo amor incondicional, pela companhia, o carinho e a doçura constantes.

Gostaria de expressar meus mais sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Marcelo A. A. Pinheiro, pela oportunidade de trabalhar junto ao senhor e junto ao seu laboratório desde que entrei na faculdade, e por todo o apoio, profissionalismo, atenção e confiança que o senhor depositou em mim. Obrigada por participar de minha formação profissional, sempre demonstrando uma postura científica notável. Espero que este trabalho reflita ao menos uma pequena parcela de tudo que consegui aprender com o senhor! Ao Prof. Dr. Marcos A. de Oliveira, meu muito obrigada pela co-orientação, pela ajuda, correções, sugestões e críticas construtivas. À Profa. Dra. Ana Júlia Fernandes, meus sinceros agradecimentos por fazer parte de minha banca, vindo a acrescentar importantes sugestões ao trabalho, além de toda a atenção durante todo o meu período de estudos. Agradeço, ainda, as contribuições de Fernanda Paganelli, Profa. Eiliana Lemos (UNESP Campus Jaboticabal) e Prof. Rodrigo Torres (UFPE) na realização deste trabalho.

Minha imensa gratidão ao meu melhor amigo de sempre, André. Dé, ter você tão presente na minha vida é um presente indescritível, e você já sabe que eu te amo de monte! O mesmo vale pras minhas irmãs, Viviane e Luciana, que eu tanto amo! Gostaria de dizer um muito obrigada, ainda, ao Guilherme, pessoa bastante especial, e que eu adoro muito, que sempre me apoiou, me ajudou, me ensinou muito, e me fez

muito feliz, deixando ótimas recordações. Aos meus amigos da época da escola, agradeço, além dos já citados, ao Bruno (Pipou) e ao Marcos, por tantos bons momentos!

Aos meus amigos da UNESP São Vicente, meu muito obrigada pela convivência, amizade, alegrias, tristezas, brigas, confidências: Aline (Santa Branca), Paula Thaís, Mariana, Bruno (Juvenal), Kaline, Valéria, Adolfo (Mineiro), Aline (Castanha), Raphael, Thiago (Macu), Renato (Farofero), Felipe (Navala). Vocês estarão sempre no meu coração, junto com todos os bons momentos vividos com a melhor turma desta Universidade, a III! Um agradecimento especial ao Rafael (Mogli), por toda a amizade, companheirismo e carinho durante nosso um ano na Universidade de Aveiro. É uma pena que começamos a conversar tão tardiamente, mas tenho certeza que daqui pra frente continuaremos assim! Da Universidade de Aveiro, gostaria de agradecer, ainda, a bons amigos que lá fiz, pela amizade e apoio durante este período tão longe de casa: Luciana, Thiago, Adriano, Crhis, Carol, Mateusz, Paweł, Tomek, Martin, Ana Luísa, Marta, Inês, Arie, Paulo, Hugo, Rafael, Paulo, Patrícia, Natália, Nélia, João e Bibó.

Meus agradecimentos aos amigos do CRUSTA (os que ainda estão, e os que já foram embora) - Ronaldo Chistofolletti, Gustavo Hattori, Bruno Sant'Anna, Alison, Bruno Sayão, Evandro - pelos ensinamentos, boa convivência, companheirismo e amizade. Ronaldo, Gustavo e Bruno Sant'Anna, agradeço-lhes imensamente pela amizade, pela paciência, e pelo tanto que vocês me possibilitaram aprender com vocês (nas saídas de campo, postura em laboratório, análises estatísticas, organização, postura científica e profissional).

Agradeço imensamente ao corpo docente da UNESP São Vicente, por serem professores sempre tão atenciosos, esclarecedores, que incrementaram substancialmente os conhecimentos dos alunos e instigaram a busca pelo saber, fornecendo-nos a base para iniciarmos nossos passos enquanto biólogos: Profa. Dra. Selma Dzimidas, Prof. Dr. Marcelo Pinheiro, Prof. Dr. Fernando Zara, Profa. Dra. Áurea Ciotti, Profa. Dra. Tânia M. Costa, Prof. Dr. Ronaldo Christofolletti, Profa. Dra. Patrícia Serafim, Profa. Dra. Ana Júlia, Prof. Dr. Denis Abessa, Prof. Dr. Otto Gadig, Prof. Dr. Augusto Flores, Prof. Dr. Mario Rollo, Prof. Dr. Francisco Buchmann, Prof. Dr. Gelson Genaro, Profa. Dra. Maria Bernadete Martins, Prof. Dr. Marcos Teixeira, Prof. Dr. Marcos Toyama e Profa. Dra. Iracy Pecora.

Meu obrigada, ainda, aos funcionários da Universidade: Denise, Luís, Conceição, Douglas (Batuta), Edson (Pastel), Paulo, Mayara, Sônia, Andréia, Valdete, Roberto (Beto), Márcia.

Com certeza esqueci de citar nomes, aqui, mas quem é querido por mim sabe disso, e peço, então, que aceitem meus agradecimentos!

Agradeço a Deus, por olhar sempre por mim e pelas pessoas que amo, e permitir que tantas coisas boas acontecessem na minha vida!

RESUMO

A poluição por metais pesados é um fato recorrente em áreas industriais, sendo as regiões estuarinas as mais afetadas. Uma vez alcançando as águas dos rios, estes metais podem se depositar facilmente sobre os sedimentos de manguezais, podendo comprometer sua fauna e flora. Entretanto, não existem estudos relacionando esse tipo de impacto ambiental ao nível molecular de *Ucides cordatus*. Este trabalho teve como objetivo detectar possíveis diferenças na diversidade genética dos exemplares de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) coletados em manguezais da Juréia, Cubatão e São Vicente, utilizando técnicas de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), tendo como base as concentrações de cádmio, chumbo, cobre, cromo e mercúrio presentes em amostras de sedimento e água destes locais. As análises de metais pesados demonstraram menores teores para a Juréia, seguida por Cubatão e apresentando as maiores concentrações em São Vicente. Da mesma maneira, as análises moleculares empregando as distâncias genéticas de Nei e o coeficiente de Nei & Li (com base na média das medidas de distância - UPGMA), demonstraram maior similaridade entre a Juréia e Cubatão, com São Vicente ocupando um ramo diferente. Os resultados encontrados indicam o RAPD como uma importante ferramenta na investigação dos efeitos causados pelos metais pesados, embora seja necessário evidenciar que a diversidade genética pode ser influenciada por outros fatores que não os de contaminação ambiental.

Palavras-chave: *Ucides cordatus*; RAPD; Diversidade Genética; Manguezal; Metais Pesados; Conservação.

ABSTRACT

In industrial areas, the pollution for heavy metals is a common reality, and estuarine regions are the most affected of all. Once reaching the rivers waters, these metals can easily settle in mangrove sediments, compromising its fauna and flora. However, there are no studies relating this kind of environmental impact at the molecular level of *Ucides cordatus*. This study has the aim of seeking for differences on genetic diversity of the uçá-crab (*Ucides cordatus*), collected on mangroves from Juréia, Cubatão and São Vicente, utilizing the techniques of *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), and based on cadmium, lead, copper, chromium and mercury concentrations, present in sediment and water samples. Through heavy metals analysis, Juréia showed the smallest levels, followed by Cubatão, with São Vicente showing the highest levels. Similarly, molecular analysis using Nei's Genetic Distance and Nei & Li's Coefficient (based on Unweighted Pair-Group Arithmetic Average - UPGMA) showed biggest similarity between Juréia and Cubatão, with São Vicente in a different cluster. The results obtained with the current study suggest that RAPD is an important tool on the investigation of heavy metals effects above organisms, although it's important to emphasize that genetic diversity may be influenced by several factors beyond exposition to contamination itself.

Key-words: *Ucides cordatus*; RAPD; Genetic Diversity; Mangrove; Heavy Metals; Conservation.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O Ecossistema Manguezal.....	1
1.2. Mangues.....	2
1.3. Fauna.....	3
1.4. Energia e ciclagem do Carbono.....	5
1.5. <i>Ucides cordatus</i>	7
1.6. Impactos sobre as áreas de manguezais.....	9
1.7. Ferramentas moleculares.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Áreas de estudo.....	14
3.2. Metais pesados.....	16
3.3. Coleta dos animais e obtenção de material genético.....	17
3.4. Extração de DNA.....	18
3.5. <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> – RAPD.....	19
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Metais pesados.....	22
4.2. Análises moleculares.....	25
5. DISCUSSÃO.....	31
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição dos manguezais pelo globo terrestre, associada às correntes oceânicas quentes.....	1
FIGURA 2: O caranguejo de manguezal, <i>Ucides cordatus</i>	7
FIGURA 3: A distribuição do caranguejo de manguezal <i>Ucides cordatus</i>	7
FIGURA 4: Imagens de satélite das três áreas de manguezal do Estado de São Paulo avaliadas no presente estudo, com a porção do litoral paulista que abrange as três áreas de estudo (a) e manguezais de Cubatão (b), Juréia (c) e São Vicente (d).....	16
FIGURA 5: Fotografia do gel obtido a partir da reação feita utilizando-se o oligonucleotídeo OPE12 para as amostras de <i>Ucides cordatus</i> obtidas nas áreas de manguezal da Juréia, Cubatão e São Vicente (n=15/cada). À esquerda do conjunto superior e inferior das amostras, verifica-se o marcador molecular DNA Ladder 1kb.....	26
FIGURA 6: Representação do número de <i>loci</i> gerado por cada um dos oligonucleotídeos investigados no presente estudo.....	27
FIGURA 7: Número de fragmentos amplificados por cada um dos oligonucleotídeos investigados, entre cada uma das áreas de manguezal.....	28
FIGURA 8: Dendograma das medidas originais de distância genética de Nei (1972).....	29
FIGURA 9: Dendograma construído com base nos dados fornecidos pelos sete oligonucleotídeos investigados.....	30

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I: Lista dos oligonucleotídeos do kit <i>Operon</i> utilizados no presente estudo e suas respectivas seqüências nucleotídicas. Em destaque, estão representados os oligonucleotídeos que apresentaram resultados informativos.....	21
TABELA II: Valores de referência para o sedimento (Eastside Environmental Statement: Sediment Quality, 2007) e a água salobra (Resolução CONAMA nº 357/05).....	23
TABELA III: Médias das concentrações de metais pesados ($\mu\text{g.g}^{-1}$) nas amostras de sedimento em cada uma das áreas de manguezal, para a superfície e nas três profundidades (cm).....	23
TABELA IV: Médias das concentrações de metais pesados ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) nas amostras de água em cada uma das áreas de manguezal.....	24
TABELA V: Medidas originais de distância genética de Nei (1972) calculadas para as três áreas de estudo.....	29

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Ecossistema Manguezal

Encontrado entre os trópicos, os manguezais possuem seu limite inferior (no hemisfério sul) e superior (no hemisfério norte), claramente demarcados pelas correntes oceânicas quentes. SPALDING *et al.* (1997) estimaram que os manguezais possuíam uma cobertura mundial de 181.000km² (Figura 1). No Brasil os manguezais estão localizados entre o Cabo Orange, no Amapá (04°30'N) e Laguna, em Santa Catarina (28°30'S) (S CHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1990), totalizando cerca de 13.400km², conferindo-lhe a segunda posição no ranking mundial (SPALDING *et al.*, 1997).

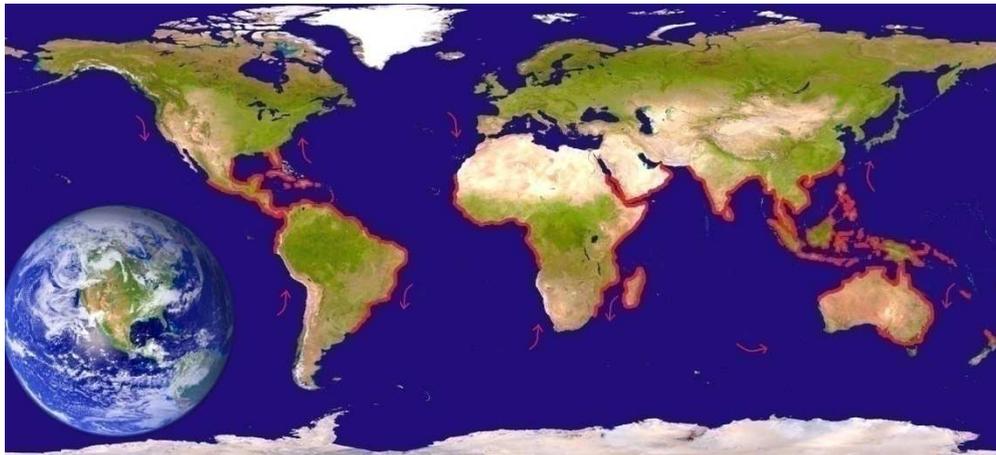


Figura 1: Distribuição dos manguezais pelo globo terrestre, associada às correntes oceânicas quentes (Fonte: Adaptado de "Imagem true-color planificada do Planeta Terra (NASA - U.S. Geological Survey)").

Dados da literatura demonstram que a localização geográfica dos manguezais tem relação com a temperatura superficial do mar, estando restrita à isoterma de 24°C, ocorrendo redução em sua biodiversidade à medida que se aproximam destes limiares (HUTCHINGS & SAENGER, 1987). Como exemplo deste fato, temos pesquisas desenvolvidas por BRANCO (1993), durante três anos em Santa Catarina, que é o limite austral da distribuição dos manguezais no Brasil, onde evidenciou grande mortalidade dos exemplares de *Ucides cordatus* durante junho e julho, quando a temperatura no interior das galerias escavadas por estes animais pode chegar a 10°C. Neste mesmo estudo, este

autor percebeu que a temperatura do ar também pode afetar a biologia destes animais, de tal modo que a partir de 15°C, eles reduzem sua atividade, passando a maior parte do tempo dentro das galerias.

1.2. Mangues

A vegetação encontrada nos manguezais recebe a denominação mangue, que é representado mundialmente por 69 espécies. No Brasil, esta vegetação é constituída principalmente por três espécies arbóreas (DUKE, 1992), a saber: o mangue vermelho - *Rhizophora mangle* (LINNAEUS); o mangue preto - *Avicennia schaueriana* (STAPF & LEECHMAN); e o mangue branco - *Laguncularia racemosa* (C.F. GAERTNER). Outras espécies menos representativas deste ambiente são a gramínea *Spartina alterniflora* e a angiosperma *Avicennia germinans*, sendo esta última não encontrada na Região Sudeste do país.

Para viver neste ambiente de transição entre os ecossistemas marinho e terrestre, a flora dos manguezais é altamente especializada. Assim, as plantas possuem adaptações morfológicas e fisiológicas específicas para sobreviverem à expressiva variação de salinidade causada pela ação das marés, bem como pela condição anaeróbica do sedimento (constituído por grãos finos e de elevada compactação) e baixa estabilidade deste substrato altamente inconsolidado. Com a inundação dos manguezais durante parte do dia, a respiração das plantas é comprometida, uma vez que os espaços intersticiais do solo são preenchidos por água, e não somente por oxigênio, dificultando o processo de difusão gasosa. Como adaptações merecem destaque as raízes escoras e aéreas que partem dos galhos inferiores de *Rhizophora mangle*, e os pneumatóforos em *Avicennia schaueriana* e *Laguncularia racemosa* (nesta última espécie de menor porte), que apresentam lenticelas, responsáveis pelas trocas gasosas (SCHOLANDER *et al.*, 1955; HOGARTH, 1999; NASCIMENTO, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2008). A condição salobra dos ambientes de manguezal pode ser prejudicial às plantas por criar pressão negativa à absorção de água (HOGARTH, 1999). Em relação ao controle da osmolaridade, NASCIMENTO (2007) diferencia as espécies de mangue como filtradoras ou excretoras de sal. *Rhizophora mangle* é considerada uma espécie filtradora de sal, possuindo

raízes permeáveis à água e nutrientes, mas não ao sal. *Avicennia shaueriana*, por sua vez, é uma espécie excretora, absorvendo o sal do solo, que é excretado, posteriormente, pelos estômatos radiculares. Mesmo sendo uma espécie filtradora, *Rhizophora* não consegue impedir totalmente a absorção do sal, que pode ser depositado nos troncos e raízes, o mesmo ocorrendo com as espécies de *Avicennia* (HOGARTH, 1999). PINHEIRO *et al.* (2008) ressalta, ainda, a presença de glândulas de sal na superfície abaxial das folhas de *Avicennia*.

Adaptações reprodutivas, em conjunto com as adaptações citadas anteriormente, também garantem o sucesso das espécies de manguezal. De maneira geral, as espécies vegetais características de manguezal possuem reprodução por viviparidade, liberando propágulos (sementes germinadas), que permitem a colonização junto a espécie mãe, como também, por flutuação, sua dispersão pela água. Um bom exemplo são os Rhizophoraceae, que possuem propágulos que podem durar até meses em estágio de dormência, com grande capacidade de dispersão (DUKE, 1992).

1.3. Fauna

Os manguezais podem ser considerados ambientes marginais, cujos limites são definidos pelos níveis das marés, de maneira que seus organismos, tanto vegetais quanto animais, vivem em condições ambientais extremas. Este fato faz com que a biodiversidade nesses locais seja relativamente pequena, uma vez que poucos organismos estão adaptados a extremos de salinidade, vento, radiação solar, aridez e inundação, entre outros parâmetros que se alteram brusca e, constantemente, além da própria intervenção antrópica (VANUCCI, 2001).

Os animais constituintes da fauna dos manguezais podem fazer parte tanto da micro-, quanto da macrofauna, podendo ser aquáticos ou terrestres, e classificados como residentes ou temporários. Entretanto, a classificação da fauna real dos manguezais é discutível, uma vez que existem animais que são residentes permanentes, totalmente dependentes deste ambiente, enquanto outros são classificados como visitantes oportunistas (MACINTOSH & ASHTON, 2002), freqüentando-o apenas em determinados períodos do ano ou de seu ciclo de vida.

Os troncos das árvores de manguezal possuem comunidades de organismos constituintes da chamada epifauna, tais como esponjas, bivalves, briozoários e cracas. O sedimento, por sua vez, serve de habitat para componentes da meiofauna, tais como anelídeos, alguns moluscos e nemátodos. Entre os insetos, figuram espécies herbívoras, detritívoras, predadoras ou de hábito alimentar mais generalista, entre os quais figuram uma grande variedade de mosquitos, cuja presença é justificada pelas poças d'água que lhes permite a postura de ovos. As famílias de crustáceos decápodos braquiúros predominantes nos manguezais são a Ocypodidae e Grapsidae (GOLLEY *et al.*, 1962), podendo, ocasionalmente, serem também encontrados representantes de Xanthidae, Portunidae, além de algumas espécies de camarões (*Peneidea* e *Caridea*) e ermitões (*Anomura*). Os anfíbios e répteis são pouco comuns neste ambiente, encaixando-se na categoria de visitantes, tendo como exemplos algumas cobras, lagartos e rãs. Os peixes, que em sua maioria são juvenis, podem ser encontrados nos canais estuarinos, poças e entre as raízes aquáticas, permitindo caracterizar o ecossistema de manguezal como verdadeiros berçários naturais. Devido à baixa diversidade florística, grande parte das espécies de aves é temporária, recorrendo a este ambiente em busca de poleiros para descanso/nidificação e, no caso daquelas que se alimentam de peixes (p. ex., garças) e crustáceos (p. ex., socó-caranguejeiro), por alimento. Da mesma maneira, os mamíferos que ocorrem nos manguezais podem ser classificados como visitantes oportunistas, utilizando estas áreas apenas como sítio de alimentação (MACINTOSH & ASHTON, 2002).

No que diz respeito aos manguezais do litoral paulista, entrevistas feitas com catadores de caranguejo no Município de Iguape, apontam para a presença do socó (*Nyctanassa violacea cayennensis*), da saracura (*Aramides mangle*), do mão-pelada (*Procyon cancrivorus*), de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), do camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis* e *F. paulensis*) e dos caranguejos guaiamú (*Cardisoma guanhumi*) e uçá (*Ucides cordatus*) (FISCARELLI & PINHEIRO, 2002).

PINHEIRO *et al.* (2008) citam diversas espécies características para o litoral paulista. Entre os moluscos, são exemplos *Littorina* sp., *Crassostrea*

rhizophorae, *Mytella falcata* e *Anomalocardia brasiliensis*. Os crustáceos mais comuns são *Cardisoma guanhumi*, *Ucides cordatus*, *Goniopsis cruentata*, *Aratus pisonii*, *Callinectes danae* e *C. sapidus*, *Sesarma rectum*, *Armases angustipes* e *A. Rubripes*, e *Macrobrachium* spp. Entre os peixes, destacam-se a tainha (*Mugil* spp.), o robalo (*Centropomus* spp.), a corvina (*Micropogonias furnieri*) e o espada (*Trichiurus lepturus*). Os répteis encontrados são cobras-d'água (*Liophis miliaris* e *Helicops carinicaudus*) e, eventualmente, jacaré-do-papo-amarelo (*Caiman latirostris*). As aves características são guará-vermelho (*Eudocimus ruber*), garças (*Ardea alba* e *Egretta thula*), maguari (*Ardea cocoi*), socós (*Nyctasnassa violacea*, *Nycticorax nycticorax*) e colhereiro (*Ajaja ajaja*). Os mamíferos mais típicos são o mão-pelada (*Procyon cancrivorus*), o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o boto-cinza (*Sotalia guianensis*).

1.4. Energia e Ciclagem do Carbono

A entropia dos manguezais é considerada alta, com intensa reciclagem de nutrientes decorrente dos processos químicos e físicos, que ocorrem sob elevadas temperaturas. Por este motivo, este ecossistema é capaz de oferecer proteção, constituindo um verdadeiro berçário natural para muitas espécies, principalmente de peixes e crustáceos, bem como um cenário ideal para a alimentação e nidificação da avifauna (VANUCCI, 2001).

Quanto à produtividade, ALONGI (1998) demonstrou que os mangues das regiões da Carolina do Sul, Nova Iorque, Massachusetts e Austrália contribuem com a Produção Primária Anual ($C.m^{-2}.ano^{-1}$) em valores superiores a 70% quando comparados às macroalgas, microalgas, fitoplâncton e epífitas, mostrando a importância desse tipo de vegetação na captação e exportação do carbono atmosférico para a rede trófica. JENNERJAHN & ITTEKKOT (2002) estimaram um acúmulo nos sedimentos dos manguezais tropicais da ordem de $23.10^{12}g$ de carbono, e a introdução de cerca de $46.10^{12}g$ de carbono proveniente destas áreas de manguezal na costa oceânica, constituindo 11% do aporte total de carbono no oceano.

A serrapilheira dos manguezais, composta por folhas, propágulos e demais estruturas vegetais que caem ao solo, constituem a necromassa, que pode ter quatro destinos. O mais comum é que seja processada por caranguejos ou diretamente decomposta por bactérias e fungos (HOGARTH, 1999). Entretanto, devido às marés oceânicas, costeiras e ao fluxo fluvial, esta necromassa pode ser exportada dos manguezais, seja na forma de matéria orgânica dissolvida ou particulada, podendo atingir distâncias relativamente grandes, dependendo do regime das correntes no local (VANUCCI, 2001). Além dos três destinos citados anteriormente, a necromassa pode ainda ser acumulada no sedimento.

Ao atingir o solo, o material vegetal pode ser imediatamente fragmentado pelo sistema digestório dos caranguejos e gastrópodos, ou permanecer por tempo suficientemente longo no solo, onde ocorre a liberação de Carbono Orgânico Dissolvido (DOC), taninos e polifenóis. Somente após este processo inicial ocorre a interação microbiana, uma vez que produtos como o tanino inibem o crescimento microbiano. De maneira geral, é difícil mensurar a produtividade decorrente do processamento pelos caranguejos, bactérias e fungos, embora seja evidente que tais atividades irão resultar na liberação de DOC para outros organismos. No Brasil, o processamento do material vegetal confere ao caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) o segundo lugar no fluxo energético e a maior biomassa no manguezal (KOCH, 1999). Cerca de 68% das folhas ingeridas por este caranguejo retornam ao sedimento em forma de partículas, maximizando em até 70% a eficiência da ação bacteriana (BEGON *et al.*, 1996).

A fragmentação da matéria vegetal por gastrópodos e pelos crustáceos braquiúros acelera o processo microbiano, disponibilizando alimento para organismos detritívoros de menor porte e sua conversão para biomassa animal, que ficará disponível para consumidores (p. ex., peixes e aves). Além disso, as fezes dos gastrópodos e crustáceos representam uma fonte com alto teor de nitrogênio. Assim, o processamento microbiano resultará em disponibilização de Carbono Orgânico Particulado (POC), que servirá de alimento aos organismos da meiofauna, como também aos detritívoros da macrofauna. Por outro lado, a morte de bactérias também resultará em liberação de DOC ao ambiente, que será utilizado por outros microrganismos (HOGARTH, 1999).

Cabe, portanto, ressaltar a importância do caranguejo não só para as comunidades ribeirinhas, enquanto alimento ou fonte alternativa de renda, mas também como participante ativo da ciclagem do carbono, tão importante para o manguezal e para as áreas adjacentes, através da exportação de matéria orgânica.

1.5. *Ucides cordatus*

O caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Figura 2), é um crustáceo braquiúro amplamente distribuído em manguezais do Atlântico Ocidental, entre as latitudes 25°N e 27°S (MELO, 1996) (Figura 3). Essa espécie constrói suas galerias no sedimento dos manguezais, alimentando-se, principalmente, das folhas de mangue das espécies arbóreas já mencionadas.



Figura 2: Exemplar macho adulto do caranguejo de manguezal, *Ucides cordatus*. (Fonte: Marcelo Pinheiro).

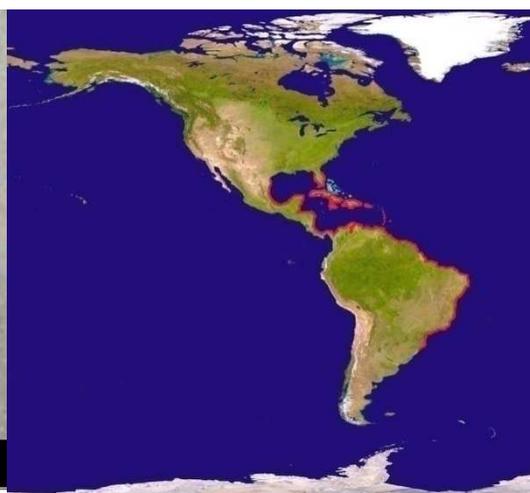


Figura 3: A distribuição do caranguejo de manguezal *Ucides cordatus*. (Fonte: Adaptado de “Imagem true-color planificada do Planeta Terra (NASA - U.S. Geological Survey)”).

É muito comum as comunidades ribeirinhas utilizem-se da extração dos organismos de manguezal para sua subsistência. Entre os crustáceos decápodos, merece destaque a comercialização dos braquiúros, majoritariamente o caranguejo-uçá (*U. cordatus*), conferindo a esta espécie expressiva importância econômica (ALVES & NISHIDA, 2003). Entretanto, como existe um grande mercado consumidor para este item alimentar, sua exploração vem crescendo exponencialmente, com relato pelos próprios

catadores sobre tal diminuição na abundância e de tamanho dos animais (FISCARELLI & PINHEIRO, 2002). Como consequência do quadro atual, a espécie *Ucides cordatus* é classificada como sobrexplotada na Lista Vermelha do Brasil, assim como na Instrução Normativa nº 5, de 21/05/2004, do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2004; CRITICAL ECOSYSTEM PARTNERSHIP FUND, 2007). GLASER & DIELE (2004) indicam declínio populacional desta espécie, com base na análise do tamanho comercial, estabelecendo uma redução de 16% na captura por unidade de esforço entre 1997 e 2001, bem como em 20% no retorno econômico decorrente desta atividade.

Além de *U. cordatus* ser uma espécie de crescimento lento (PINHEIRO *et al.*, 2005), sua reprodução sofre limitação por uma série de fatores abióticos e bióticos, entre os quais podem ser inclusas as atividades antrópicas decorrentes de sua exploração comercial. A captura predatória e número excessivo de catadores podem atuar negativamente sobre o estoque populacional, acarretando na diminuição do recurso em abundância e tamanho. Tal fato é devido à reduzida taxa de crescimento da espécie, que atinge o tamanho mínimo de captura (6cm, segundo a Portaria IBAMA 70/2000), com uma idade de 4 a 5 anos, segundo PINHEIRO *et al.* (2005). Neste sentido, é imprescindível a elaboração de um plano de manejo para este recurso pesqueiro, proporcionando um equilíbrio entre a produção e exploração, com vistas à sustentabilidade. A análise de crescimento de *Ucides cordatus* demonstra que, apesar de apresentar grande porte na fase adulta, possui reduzida taxa de crescimento (PINHEIRO & FISCARELLI, 2001), o que traz preocupação quanto a continuidade futura de sua exploração. A ausência de um plano de manejo nacional para a espécie, particularmente em regiões brasileiras onde ela apresenta maior comércio, já tem promovido o declínio populacional e redução do tamanho dos exemplares.. As dificuldades encontradas para a produção larval desta espécie em laboratório, seja para otimizar a sobrevivência larval ou produzir alimento adequado ao desenvolvimento das larvas e formas adultas, ainda são tarefas difíceis (OSTRENSKI *et al.*, 1995; LIMA & OSHIRO, 2006). Neste sentido, o manejo das populações naturais desta espécie ainda é a melhor solução para a continuidade dos estoques populacionais deste recurso pesqueiro (MARCELO PINHEIRO, *com. pess.*).

Visando a conservação da espécie, a Portaria nº 52, de 30/09/2003 (IBAMA, 2003), regula a exploração de *Ucides cordatus* na região Sudeste-Sul Brasileira, compreendendo os Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Esta legislação proíbe, em qualquer época do ano, a captura de fêmeas ovígeras e de indivíduos com largura cefalotorácica inferior à 60mm, do estoque e comercialização de partes isoladas (p. ex., quelípodos), bem como o uso de armadilhas, petrechos, instrumentos cortantes e produtos químicos na captura, estando os infratores sujeitos às penalidades previstas em Lei.

PASSOS & DI BENEDITTO (2004) conduziram trabalhos no Manguezal do Gargaú (RJ), visando investigar o respeito às Portarias do IBAMA quanto ao defeso de *U. cordatus*, através de mensurações dos exemplares e levantamento das técnicas empregadas em sua captura. As autoras perceberam que a largura cefalotorácica dos espécimes capturados obedecia a legislação, com medidas entre 60 e 65mm, embora a forma de captura mais comum seja com redinhas, que são tramas de ráfia colocadas na entrada das galerias, terminantemente proibidas pela Portaria IBAMA nº 52/2003.

1.6. Impactos sobre as Áreas de Manguezal

De modo geral as regiões costeiras tendem a apresentar intensa ocupação humana, ocasionando forte pressão sobre os frágeis ecossistemas que aí se encontram. No Brasil, grandes cidades estão localizadas na zona litorânea, promovendo elevado adensamento populacional humano nessas regiões, o que é agravado, ainda mais, pelo contínuo crescimento destas populações. No litoral paulista é grande o número de pessoas morando em palafitas, que são habitações construídas precariamente às margens de rios e estuários (AGEM, 2005). A ocupação irregular dessas áreas resulta em destruição dos manguezais, acabando por causar deterioração das áreas de manguezal adjacentes, principalmente devido ao acúmulo de lixos e dejetos.

Outro fator muito importante, que deve ser levado em conta quando o assunto é o impacto de manguezais, diz respeito à opinião pública. Na maioria das vezes, por desconhecimento, os manguezais são confundidos com áreas de esgoto (PINHEIRO, 1997), devido ao odor desagradável que sua lama rica em

matéria orgânica exala, de maneira que vêm sendo dada preferência por sua exploração em curto prazo (SAENGER *et al.*, 1983). Por este motivo, este ambiente vem sendo destruído sistematicamente, seja pela exploração e comercialização de sua madeira, instalação de tanques para o cultivo de camarões ou demais formas de aquicultura, além da especulação imobiliária, que tem sido intensa e desenfreada (MACINTOSH & ASHTON, 2002; PINHEIRO, 2004; ELLISON, 2008).

Muitas pesquisas já foram feitas acerca da poluição das águas e também de áreas de manguezal por metais pesados e derivados de petróleo (BURNS *et al.*, 1993; KLEKOWSKI *et al.*, 1994; MACKEY & HODGKINSON, 1996; TAM & WONG, 2000; DE WOLF *et al.*, 2001; TAM *et al.*, 2001; VALDOVINOS & ZÚÑIGA, 2002; KE *et al.*, 2005; TAM *et al.*, 2005), sendo a Baixada Santista um dos exemplos. No presente estudo será dado enfoque aos efeitos que os metais pesados podem ter sobre a diversidade genética em populações de *Ucides cordatus*.

Os compostos tóxicos podem afetar os indivíduos de maneira direta (compostos tóxicos primários) ou indireta (compostos tóxicos secundários), neste último caso logo após terem sofrido transformações físico-químicas em interações com o meio (DE WOLF *et al.*, 2004). Desta forma, os efeitos podem ocorrer diretamente, por resultado mutagênico, ou decorrente de exposição aos seus elementos tóxicos (BELFIORE & ANDERSON, 2001; THEODORAKIS, 2001; DE WOLF *et al.*, 2004 *apud* BECERRIL *et al.*, 2001).

Há muitos estudos na literatura que relacionam os efeitos da poluição sobre espécies vegetais (SILVA *et al.*, 1990; KLEKOWSKI *et al.*, 1994), morfologia (DE WOLF *et al.*, 2001), comportamento (MACKEY & HODGKINSON, 1996) e fisiologia de representantes do Subfilo Crustacea (HARRIS & SANTOS, 2000; GRECO *et al.*, 2001; VALDOVINOS & ZÚÑIGA, 2002). Porém, são escassos os trabalhos que utilizam metodologias moleculares para averiguar o efeito dos impactos ambientais sobre a fauna, particularmente nos ecossistemas marinhos e estuarinos.

1.7. Ferramentas Moleculares

As ferramentas moleculares são amplamente empregadas em estudos com marcadores moleculares e taxonomia de espécies, principalmente as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), visando a detecção de Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD). Os marcadores moleculares possuem a capacidade de discriminar os taxa a partir da análise do padrão de bandas, após amplificação ou, mais precisamente, a partir da ausência ou presença dessas bandas nas amostras examinadas (PARKER *et al.*, 1998; VON SOOSTEN *et al.*, 1998; KLINBUNGA *et al.*, 2000; ALI *et al.*, 2004; NGUYEN *et al.*, 2005). Sendo assim, da mesma forma como é utilizada para determinar marcadores moleculares, a técnica de RAPD também pode ser empregada em estudos de ecotoxicologia, uma vez que pode ocorrer adição ou perda de alelos (bandas) em função de mutações, inversões, deleções ou rearranjos cromossômicos (DE WOLF *et al.*, 2004).

O RAPD tem a vantagem de ser uma técnica simples, hábil e altamente sensível na detecção de *loci* múltiplos, exigindo pouco tempo de experimentação e análise de dados. Além disso, apresenta baixo custo operacional por permitir a análise de um grande número de amostras, não exigindo conhecimento prévio acerca da genética da espécie estudada, uma vez que são utilizados oligonucleotídeos aleatórios (VON SOOSTEN *et al.*, 1998; LU *et al.*, 2000).

O uso de marcadores moleculares, aliado a estudos acerca da ecologia da espécie, são de extrema importância por possibilitarem maior conhecimento do assunto. Tal fato é de grande conveniência, principalmente na avaliação de espécies de elevado valor econômico e sobrexplotadas, como é o caso do caranguejo-uçá, além da importância social que esta espécie apresenta para as comunidades ribeirinhas. A intenção é que as atuais investigações suportem planos de manejo adequados, assegurando a continuidade da espécie, visto que sua reduzida taxa de crescimento anual indica que suas populações apresentam baixa capacidade de recuperação em função do tempo. Este estudo possui grande importância, ainda, para incrementar os conhecimentos

bioecológicos sobre a espécie, complementando dados já obtidos até o presente momento (BRANCO, 1993; PINHEIRO & FISCARELLI, 2001; HATTORI, 2002; FISCARELLI & PINHEIRO, 2002; HATTORI & PINHEIRO, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003; PINHEIRO & HATTORI, 2003; FISCARELLI, 2004; CHRISTOFOLETTI, 2005; DALABONA *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2005; DIELE & SIMITH, 2006; HATTORI, 2006; SANT'ANNA, 2006; PINHEIRO & HATTORI, 2006; e SANT'ANNA *et al.*, 2007).

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo analisar os efeitos da poluição por metais pesados sobre o caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*), a nível molecular, tendo como parâmetro os índices de cádmio, chumbo, cobre, cromo e mercúrio em três localidades de manguezal da Região Metropolitana da Baixada Santista (Juréia, Cubatão e São Vicente), para avaliar o possível impacto ambiental sobre a diversidade genética das populações desta espécie.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Áreas de Estudo

Foram realizadas coletas em três áreas de manguezal (figura 4), distintas entre si pelo grau de impacto ambiental, presumindo-se que a ordem crescente de impacto seja: (1) Manguezal da Juréia, localizado no interior do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, próximo à Barra do Una (24°26'0,3"S - 47°04'61,4"W); (2) Manguezal de São Vicente, localizado no Rio Branco (23°56'24,23"S - 46°28'10"W), Município de São Vicente, considerado um intermediário entre os manguezais de Cubatão e Juréia; e (3) Manguezal de Cubatão, localizado no canal da Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA), ao lado inferior desta indústria, próximo ao Rio Morrões (23°52'51,19"S 46°22'25,26"W), no Município de Cubatão (SP).

O Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins localiza-se no litoral Sul de São Paulo, e possui cerca de 80.000ha, abrangendo os municípios de Itariri, Miracatu, Pedro de Toledo, Iguape e Peruíbe (OLIVEIRA, 2004). Conforme o histórico do local, a proposta de implantação de uma usina nuclear (Nuclebrás) na região de Juréia-Itatins, em 1980, acabou por ganhar a atenção dos ambientalistas, que se opuseram a sua implantação em um local de tão grande biodiversidade (NOGUEIRA-NETO, 2004 *apud* SOUZA, 2007). A pressão destes ambientalistas gerou o Movimento de Proteção da Juréia, resultando na criação da Estação Ecológica Juréia-Itatins, a partir do Decreto Estadual nº 24.646, de 20/01/1986 (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1986). Esta situação foi mantida até dezembro/2006, quando houve a promulgação da Lei Estadual nº 12.406, transformando a Estação Ecológica em Mosaico de Unidades de Conservação (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006). A partir desta lei, a região da Barra do Una foi classificada como uma Reserva de Desenvolvimento Sustentável (RDS) que, por definição, é uma área natural que abriga populações tradicionais, tendo por objetivo a preservação da natureza e garantia de melhores condições à qualidade de vida e exploração dos recursos naturais pelas populações tradicionais (SNUC, 2000). Nestas áreas é permitida a visitação pública, a pesquisa científica (com prévia autorização) e a

exploração de recursos em regime de subsistência, minimizando os impactos antrópicos.

São Vicente é um dos nove municípios da Região Metropolitana da Baixada Santista, possuindo aproximadamente 323.600 habitantes (IBGE, 2007). Apesar de contar com apenas 11 fontes industriais poluidoras (CETESB, 2007), os manguezais de São Vicente vêm sofrendo expressiva pressão antropogênica, particularmente pela ocupação humana irregular (p. ex., construção de casas e palafitas), o que se soma ao descarte incorreto de resíduos diretamente no ambiente. De acordo com dados da Agência Metropolitana da Baixada Santista (AGEM, 2005), existe um grande número de habitações subnormais e/ou favelas, principalmente nas zonas periféricas da região, dentre as quais uma parcela significativa das pessoas (cerca de 1/3 da população) vive sobre palafitas às margens dos rios e sobre áreas de manguezal.

Cubatão é outro dos municípios que compõe a Região Metropolitana da Baixada Santista, estando localizado no Litoral Centro Paulista. Possui cerca de 120.270 habitantes (IBGE, 2007) e um dos maiores pólos industriais brasileiros, sediando 29 indústrias que produzem fertilizantes, aço e compostos químicos (CETESB, 2007). Entre elas destaca-se a Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA), uma das principais emissoras de metais pesados. A intensa atividade industrial na área levou Cubatão a tornar-se alvo de discussões ambientais mundiais, por volta de 1980, com registros de doenças respiratórias (UECHI, 2008), casos de câncer (FARIA *et al.*, 1999), alterações hematológicas, com comprometimento dos eritrócitos (NAOUM *et al.*, 1984), anencefalia (YOUNG & LUSTOSA, 2001), entre outros (LABUNSKA *et al.* 1999; LUIZ-SILVA *et al.*, 2002; HYPOLITO *et al.*, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2005). Como aponta o relatório da CETESB (2007), muitas vezes a água acaba sendo o destino final destes poluentes, de maneira que os manguezais da região são altamente afetados. Apesar da implantação de programas de recuperação ambiental em Cubatão, tais como o Programa de Controle de Poluição Ambiental, iniciado em julho/1983, dados da literatura demonstram que os compostos tóxicos podem se acumular nos sedimentos (TAM & WONG, 2000; HYPOLITO *et al.*, 2005),

fortalecendo a necessidade de estudos sobre seus efeitos sobre a fauna dos ecossistemas estuarinos expostos.

A seleção desses três manguezais, portanto, foi feita com base em dados da literatura e no conhecimento sobre a região. As coletas em São Vicente e Cubatão foram conduzidas em 20/05/2006, e na Juréia, em 04/06/2006.

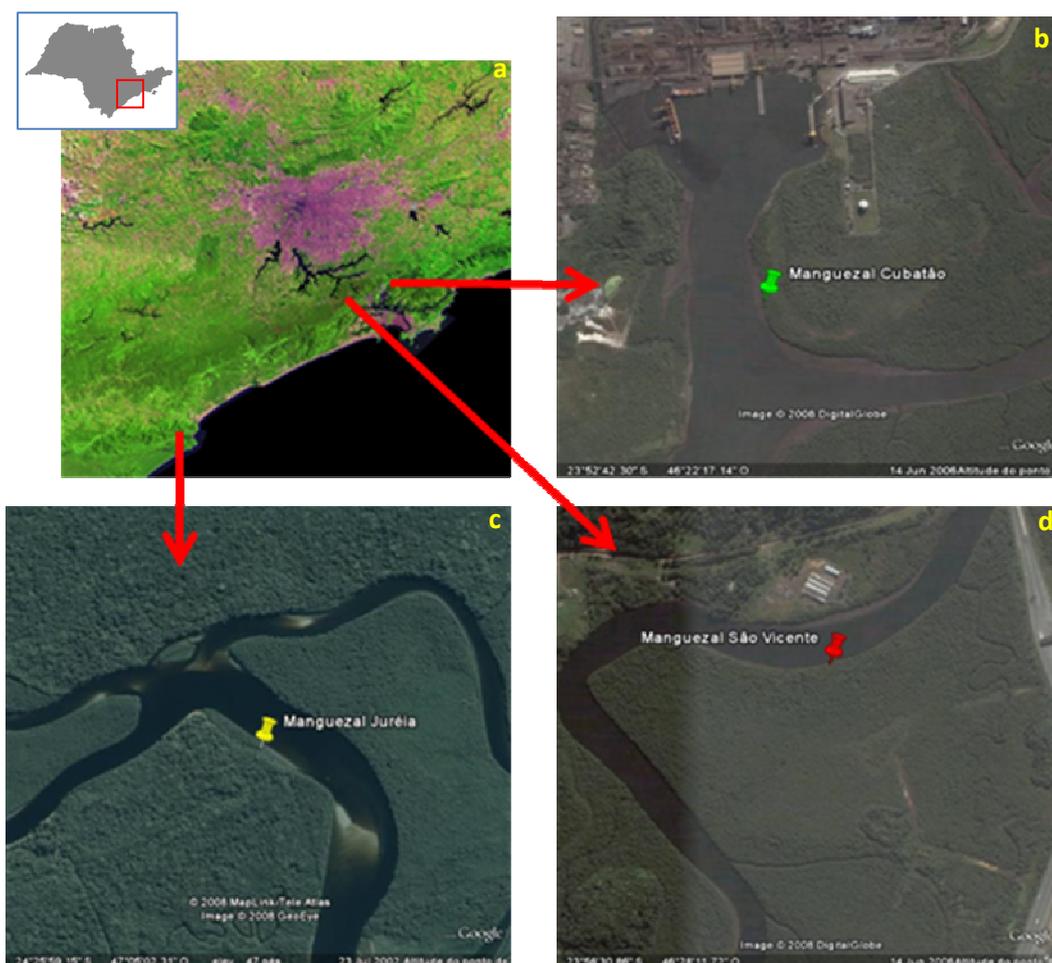


Figura 4: Imagens de satélite das três áreas de manguezal do Estado de São Paulo avaliadas no presente estudo, com a porção do litoral paulista que abrange as três áreas de estudo (a) e manguezais de Cubatão (b), Juréia (c) e São Vicente (d). Fonte: Adaptado de "Imagens de Satélite do Estado de São Paulo", da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e *Google Earth*.

3.2. Metais Pesados

Para a verificação dos níveis de metais pesados nas áreas de manguezal em estudo, foram coletadas amostras de água e sedimento seguindo o Protocolo de coleta fornecido pelo Centro de Assistência

Toxicológica (CEATOX), do Instituto de Biociências (IB) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu.

Em cada uma das áreas de manguezal foram coletadas amostras de sedimentos em quatro diferentes profundidades (superfície, 15cm, 30cm e 45cm), totalizando três amostragens em cada um dos manguezais. Para a coleta, foram utilizados pá, trena e frascos plásticos de polipropileno esterilizados e devidamente etiquetados. Frascos similares foi feita uma amostragem de água em cada área de manguezal, constituída por quatro amostras de água (25mL cada), sendo uma delas junto à margem do manguezal e as demais perpendicularmente e contíguas, a cada 10m, em direção ao *apicum* (porção mais interna do manguezal).

As amostras de água e sedimento foram levadas ao laboratório e, posteriormente, enviadas ao CEATOX/UNESP Botucatu para determinação das concentrações de Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo e Mercúrio. O método utilizado foi o de mineralização por via úmida com ácido nítrico (HNO₃) 65% (BASSET *et al.*, 1981) em forno de microondas (Provecto – DGT – 100 plus), por meio de um programa específico para solo/sedimento, fornecido pelo fabricante do microondas. A identificação foi realizada pelo método de Espectrofotometria por Absorção Atômica (GBC - 932 AA) (ATHANASOPOULOS, 1994).

Os resultados obtidos foram submetidos a análises de variância (uma ou duas vias) ou ao Teste T-Student, utilizando os programas *Statistica* v. 6.0 e *BioEstat* v. 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

3.3. Coleta dos animais e obtenção de material genético

Em cada um dos manguezais foram coletados exemplares de *Ucides cordatus* por braceamento, que consiste na captura direta dos animais pelo catador com a introdução do braço nas galerias, resultando na obtenção de exemplares com largura cefalotorácica (LC) superior a 6cm, em respeito à Portaria IBAMA nº52/2003.

No total foram coletados 56 espécimes (16 no manguezal da Juréia e 20 no manguezal de Cubatão e 20 espécimes em São Vicente, respectivamente). Uma vez capturados, os animais eram colocados em caixas plásticas e transportados ao laboratório. No momento das análises, com uso de material esterilizado, foi extraído cerca de 1cm³ da musculatura associada aos pereiópodos, na região abaixo das brânquias. Este material foi então armazenado em tubos *Eppendorf* com capacidade de 2ml, com etanol absoluto, sendo estocado a -20°C, para posterior realização das análises moleculares.

3.4. Extração de DNA

Amostras da musculatura do cefalotórax de 15 espécimes de *Ucides cordatus* de cada uma das três áreas de estudo foram utilizadas como fonte de material genético, sendo utilizado o protocolo descrito por SAMBROOK *et al.* (1989) para extração de DNA genômico, com algumas modificações.

Pesou-se 20mg da musculatura de cada amostra, que foram transferidos para um cadinho para sua maceração com nitrogênio líquido. Em seguida este material foi transferido para tubos *Falcon* de 15ml, onde foram adicionados 3ml de solução de lise, composta por Tris HCl 0,1M pH8,0; NaCl 0,4M; Edta 0,1M pH8,0; Proteinase K 0,1mg/ml; e SDS 0,1%. Os tubos foram incubados em banho-maria (56°C, por quatro horas), sendo homogeneizado a cada 30 minutos pela leve inversão dos mesmos. Decorrido o tempo do banho-maria, as amostras permaneceram em descanso até atingirem a temperatura ambiente, sendo adicionados 420µl de Acetato de Amônio 7,5M. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (15 minutos a 20°C, a 3.220Xg). O sobrenadante foi recuperado, com acréscimo de dois volumes de Etanol absoluto gelado. Os tubos foram novamente homogeneizados por inversão e as amostras mantidas, durante 40 minutos, em um freezer a -80°C. O material foi novamente centrifugado (25 minutos a 4°C, a 3.220Xg) e o sobrenadante descartado, com adição de 800µl de Etanol 70% gelado em cada amostra. Após nova inversão dos tubos, as amostras foram mais uma vez centrifugadas (5 minutos a 4°C, a 3.220Xg). O sobrenadante de cada tubo foi novamente

descartado e o *pellet* resultante foi deixado para secar (40 minutos em fluxo laminar). Posteriormente, foi feita a solubilização do DNA contido nos tubos pela adição de 200µl de tampão TE1x (preparado a partir de uma solução estoque de TE10x contendo Tris-HCl 10mM, pH8,0, e EDTA 1mM, pH8,0).

3.5. *Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD*

Para a realização do *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), foram feitas reações de amplificação de volume total de 20µl, utilizando-se 2,0µl de tampão de reação de PCR T1x 2µM, 0,4µL de dNTP 200µM, 1,0µL de oligonucleotídeo 5pmol, 0,6µl de MgCl₂ 6mM, 0,5µl de taq-polimerase 1U, 40ng de DNA e água ultra-pura (Milli-Q) q.s.p.. As definições adotadas no termociclador consistiam em um programa com uma etapa de denaturação inicial do DNA por 3 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C, e 60 segundos a 72°C, finalizando com uma etapa de extensão de 4 minutos a 72°C.

Após a amplificação, as amostras foram visualizadas após eletroforese em gel de agarose 2% com TBE 1x (preparado a partir de uma solução estoque de TBE 10x, contendo Tris 0,89M, EDTA 0,02M e Ácido Bórico 0,89M), contendo 8µl de Brometo de Etídio 0,025%. Para cada gel foram aplicadas 45 amostras, correspondendo a 15 amostras de cada área de manguezal estudado. Para a determinação do conteúdo de nucleotídeos dos produtos amplificados foram utilizados 8µl (10µg/ml) o marcador de peso molecular Ladder 1Kb. Foram acrescentados 2µl de uma mistura contendo Azul de Bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água para cada 8µl de amostra para a aplicação no gel. As eletroforeses foram realizadas em cubas horizontais médias, durante uma hora e quarenta minutos, a 75V. Transcorrido este tempo, os géis eram visualizados em um transiluminador com luz ultravioleta, e os resultados foram documentados com o auxílio do programa *Gel Doc XR System*, que possibilita a análise digital das imagens.

Os oligonucleotídeos utilizados no presente estudo fizeram parte do kit *Operon*, sendo testados 21 deles, dos quais foram selecionados sete que

resultaram em melhores ampliações, sendo eles: OPE12, OPE14, OPE15, OPE18, OPG5, OPI7 E OPJ9 (vide tabela I).

Os resultados obtidos a partir da visualização dos géis foram transformados em matrizes numéricas binárias, sendo a ausência do marcador representada com “0” e a presença com “1”. Assim, foram construídas oito matrizes binárias, sendo sete delas referente aos oligonucleotídeos analisados e uma geral para o conjunto deles. Após realizada a medição da distância migrada por cada um dos fragmentos a partir do poço de introdução da amostra, em milímetros, foi efetuada sua conversão para tamanho em pares de bases, utilizando-se o programa *Fragment Size Calculator* (disponível em <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/SizeCalc.html>).

As matrizes obtidas foram submetidas ao Algoritmo de Distância de Nei & Li (NEI & LI, 1979) e dendogramas foram construídos utilizando o programa *Free Tree* v. 0.9.1.50 (Pavlicek & Flegr, 2001 - disponibilizado em <http://www.natur.cuni.cz/~flegr/freetree.php>), pelo método de médias das distâncias (*unweighted pair-group method using arithmetic average* – UPGMA). Optou-se pela utilização do *bootstrapping* como método de reamostragem, com 400 repetições. Além disso, as matrizes binárias foram analisadas utilizando-se o programa *PopGene* v. 1.32., segundo YEH *et al.* (1999), para determinação dos parâmetros de distâncias genéticas entre populações (G_{ST}) (NEI, 1972).

Visando confirmar possíveis diferenças genéticas quanto ao número de *loci* amplificados para cada um dos sete oligonucleotídeos foram realizadas análises de variância (ANOVA) utilizando-se o programa *BioEstat* v. 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

Tabela I: Lista dos oligonucleotídeos do kit *Operon* utilizados no presente estudo e suas respectivas seqüências nucleotídicas. Em destaque, estão representados os oligonucleotídeos que apresentaram resultados informativos.

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQÜÊNCIA
OPD13	5' -GGGGTGACGA-3'
OPD18	5' -GAGAGCCAAC-3'
OPE11	5' -GAGTCTCAGG-3'
OPE12	5' -TTATCGCCCC-3'
OPE14	5' -TGCGGCTGAG-3'
OPE15	5' -ACGCACAACC-3'
OPE16	5' -GGTGA CTGTG-3'
OPE17	5' -CTACTGCCGT-3'
OPE18	5' -GGACTGCAGA-3'
OPF5	5' -CCGAATTCCC-3'
OPF13	5' -GGCTGCAGAA-3'
OPF16	5' -GGAGTACTGG-3'
OPG2	5' -GGCACTGAGG-3'
OPG5	5' -CTGAGACGGA-3'
OPG8	5' -TCACGTCCAC-3'
OPG11	5' -TGCCCGTTCGT-3'
OPH5	5' -AGTCGTCCCC-3'
OPH13	5' -GACGCCACAC-3'
OPI7	5' -CAGCGACAAG-3'
OPJ9	5' -TGAGCCTCAC-3'
OPJ14	5' -CACCCGGATG-3'

4. RESULTADOS

4.1. Metais Pesados

Os teores de metais pesados no sedimento foram analisados com base em valores-guia para a qualidade do sedimento, originários do Canadá, denominados níveis limiares de efeitos (*threshold effect levels* - TEL) e níveis prováveis de efeitos (*probable effect levels* - PEL), que levam em conta os efeitos causados por estas concentrações na biota local. Deste modo, considera-se que valores inferiores ao TEL não implicam em efeitos biológicos adversos, concentrações entre TEL e PEL repercutem em possíveis efeitos adversos, e quando os valores são superiores ao PEL os efeitos biológicos adversos são considerados prováveis (EASTSIDE ENVIRONMENTAL STATEMENT: SEDIMENT QUALITY, 2007).

No Brasil os valores-guia relacionados à água são determinados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução CONAMA nº 357/05. De acordo com esta resolução, as águas salobras das áreas de manguezal estudadas são classificadas como pertencentes à Classe 1 (Juréia - água salobra dentro de Unidade de Conservação), Classe 2 (São Vicente - atividades pesqueiras exercidas na região) e Classe 3 (Cubatão - água indicada para navegação e harmonia paisagística).

Na tabela II estão representados os valores-guia de TEL e PEL para o sedimento e os valores máximos para as classes de água salobra permitidos pela legislação brasileira.

As concentrações de metais pesados encontradas nas amostras de sedimento e água encontram-se listadas nas tabelas III e IV, respectivamente.

As concentrações de metais pesados contidos nas amostras de sedimento foram todas inferiores aos valores-guia de TEL e PEL. Desta maneira, não se pode afirmar que tenham causado efeito biológico adverso em qualquer das áreas de manguezal avaliadas.

Tabela II: Valores de referência para o sedimento (Eastside Environmental Statement: Sediment Quality, 2007) e máximos permitidos para águas salobras (Resolução CONAMA n° 357/05).

METAIS PESADOS	SEDIMENTO		ÁGUA SALOBRA		
	TEL (mg.kg ⁻¹)	PEL (mg.kg ⁻¹)	CLASSE 1 (mg.l ⁻¹)	CLASSE 2 (mg.l ⁻¹)	CLASSE 3 * (mg.l ⁻¹)
Cu	18,7	108	0,005	0,0078	-
Cd	0,7	4,2	0,005	0,04	-
Cr	52,3	160	0,05	1,1	-
Pb	30,2	112	0,01	0,210	-
Hg	0,13	0,77	0,0002	1,8	-

(*) Não existem valores-guia estabelecidos para a classe 3 pela Resolução CONAMA n° 357/05

Tabela III: Médias das concentrações de metais pesados (µg.g⁻¹) presentes nas amostras de sedimento em cada uma das áreas de manguezal, para a superfície e nas três profundidades (cm).

ÁREA DE MANGUEZAL	PROFUNDIDADES (cm)	CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS (µg.g ⁻¹)				
		Cu	Cd	Cr	Pb	Hg
JURÉIA	Superfície	1,92	0,053	3,17	4,56	<0,1
	15	1,30	0,046	3,08	3,19	<0,1
	30	3,19	0,043	2,14	8,35	<0,1
	45	5,17	0,057	4,37	3,97	<0,1
CUBATÃO	Superfície	3,81	0,063	6,38	5,33	<0,1
	15	4,01	0,077	6,91	6,18	<0,1
	30	3,78	0,063	7,47	5,41	<0,1
	45	2,81	0,057	5,24	3,86	<0,1
SÃO VICENTE	Superfície	5,81	0,100	7,07	10,30	<0,1
	15	5,35	0,060	6,00	5,93*	<0,1
	30	4,32	0,087	5,26	10,04	<0,1
	45	5,29	0,080	7,72	10,61	<0,1

(*) Apesar de serem três amostras para cada profundidade, a média desta profundidade para chumbo foi calculada com base em duas amostras, uma vez que a terceira possuía concentração de Pb abaixo dos níveis detectados pelas técnicas empregadas.

Tabela IV: Médias das concentrações de metais pesados (mg.l^{-1}) nas amostras de água em cada uma das áreas de manguezal.

ÁREA DE MANGUEZAL	CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS (mg.l^{-1})				
	Cu	Cd	Cr	Pb	Hg
JURÉIA	<0,05	<0,01	<0,05	<0,125	<0,1
CUBATÃO	<0,05	<0,01	<0,05	0,150	<0,1
SÃO VICENTE	<0,05	<0,01	<0,05	0,178	0,44

O método utilizado para analisar o teor de metais pesados nas amostras de água não detecta concentrações inferiores a $0,1\text{mg.l}^{-1}$ para mercúrio, 125mg.l^{-1} para chumbo, $0,05\text{mg.l}^{-1}$ para cobre, e $0,01\text{mg.l}^{-1}$ para cádmio, o que impossibilitou a classificação das amostras de água provenientes da Juréia, se superiores ou inferiores aos permitidos pela legislação vigente, sendo evidente, apenas, que o teor de cromo encontra-se dentro dos limites permitidos.

Como também não existem valores-guia para a qualidade de água salobra da Classe 3 na Resolução CONAMA n° 357/05, nenhuma afirmativa pode ser feita com relação às amostras de água obtidas em Cubatão.

No caso de São Vicente, o método utilizado não conseguiu detectar concentrações inferiores a $0,05\text{mg.l}^{-1}$ para cobre, o que impossibilita a classificação dos teores encontrados com base na legislação vigente. As concentrações encontradas para cádmio, chumbo e cromo foram inferiores aos limites permitidos, enquanto a concentração média de mercúrio demonstrou estar mais de 240 vezes acima do máximo permitido pela Resolução CONAMA n° 357/05.

Por outro lado, a realização das Análises de Variância (duas vias), realizadas com os dados das concentrações presentes em cada uma das profundidades, em cada área de estudo, possibilitou a detecção de diferenças significativas para alguns dos metais pesados. Foram encontradas diferenças significativas nos níveis de cádmio entre Juréia e São Vicente ($p < 0,05$), e entre Cubatão e São Vicente ($p < 0,05$), mas não entre Juréia e Cubatão ($p < 0,05$). Tratando-se do cromo, ocorreram diferenças significativas entre Juréia e

Cubatão ($p < 0,05$), e entre Juréia e São Vicente ($p < 0,05$), mas não entre Cubatão e São Vicente ($p < 0,05$). No caso do cobre, as três áreas de estudo mostraram-se diferentes ($p < 0,05$), ocorrendo o inverso com o teor de chumbo, que não diferiu significativamente entre as áreas de manguezal avaliadas ($p < 0,05$).

Como as concentrações de mercúrio presentes no sedimento foram muito baixas, a sensibilidade do método utilizado não pôde quantificá-las, representando, em todos os casos, valores inferiores a $0,1\mu\text{g.g}^{-1}$, o que impossibilitou a realização de análises estatísticas.

Os resultados das Análises de Variância (Uma Via), visando comparar as médias de concentração para cada metal pesado, entre as diferentes profundidades em uma mesma área de estudo, não demonstraram diferenças significativas em nenhum caso. Para São Vicente a média da concentração de chumbo foi calculada com base em apenas dois valores, pois um dos três valores da análise resultou inferior a $0,05\mu\text{g.g}^{-1}$. Como já mencionado anteriormente, o mesmo ocorreu com o mercúrio, devido aos valores gerados terem sido inferiores a $0,1\mu\text{g.g}^{-1}$, impossibilitando a execução de análises estatísticas.

4.2. Análises de Marcadores Genéticos Moleculares

Conforme mencionado no tópico 3.5 dos “Materiais e Métodos”, somente os sete oligonucleotídeos considerados mais informativos (maior número de alelos e amplificação reproduzível) estão sendo abordados no presente trabalho, a exemplo do OPE12 (vide figura 5). Os primers investigados resultaram em fragmentos que variaram entre 191 e 1625pb.

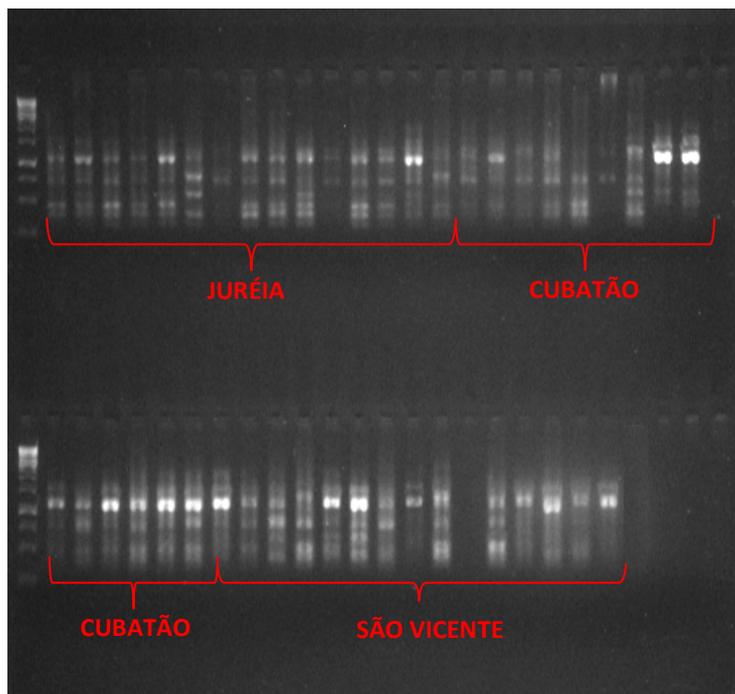


Figura 5: Fotografia do gel obtido a partir da reação com uso do oligonucleotídeo OPE12 para as amostras de *Ucides cordatus* nas áreas de manguezal da Juréia, Cubatão e São Vicente (n=15/cada). À esquerda do conjunto superior e inferior das amostras, verifica-se o marcador molecular DNA Ladder 1Kb.

Os sete oligonucleotídeos testados amplificaram, em média, sete *loci*, com o OPE15 fornecendo o maior número de *loci* amplificados (nove), e o OPE18 o menor deles (seis) (vide figura 6). Considera-se como *loci* um mesmo espectro de tamanho de fragmentos, em termos de pares de bases, tendo como referência as análises visuais dos géis. Não ocorreram diferenças significativas quando o número total de *loci* amplificados por oligonucleotídeo foi confrontado entre as áreas de manguezal ($F=0,049$; $p>0,05$). Da mesma maneira, análises de variância (uma via) não demonstraram diferenças significativas entre o número de *loci* amplificados em cada uma das áreas de manguezal ($F=0,785$; $p>0,05$).

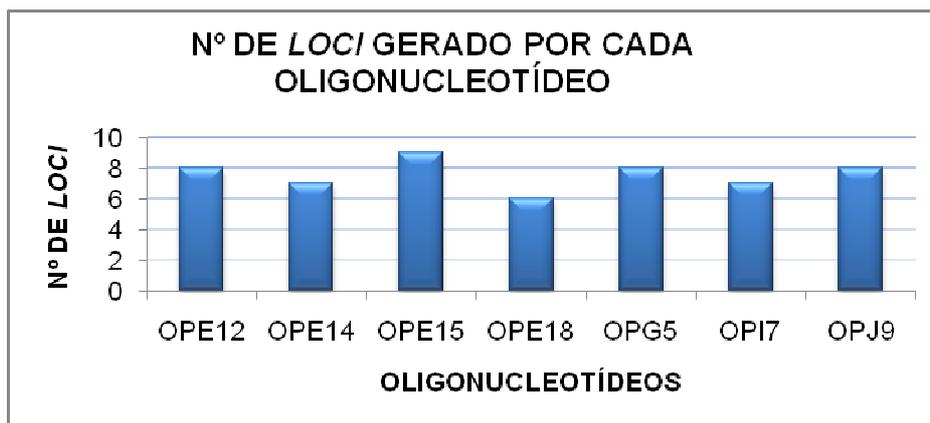


Figura 6: Representação do número de *loci* gerado por cada um dos oligonucleotídeos investigados no presente estudo.

Os resultados obtidos para o número de fragmentos gerados por cada um dos oligonucleotídeos investigados no presente estudo encontram-se compilados na figura 7.

As análises de variância demonstraram ausência de diferenças significativas entre as médias do número de fragmentos gerados pelos oligonucleotídeos OPE14, OPE15 e OPE18 entre as três áreas de estudo. Por outro lado, o oligonucleotídeo OPE12 resultou em diferenças significativas entre Juréia-Cubatão e Juréia-São Vicente no número de fragmentos gerados ($F=12,827$; $p<0,01$), mas não entre Cubatão-São Vicente ($p>0,01$). Em termos numéricos, enquanto a Juréia teve 45 fragmentos amplificados no total, para as quinze amostras, Cubatão e São Vicente tiveram 27 e 25, respectivamente.

O oligonucleotídeo OPG5 demonstrou diferenças significativas entre Juréia-São Vicente e entre Cubatão-São Vicente ($F=4,304$; $p<0,05$), mas não entre Juréia-Cubatão ($p>0,05$), sendo que a Juréia teve 36 fragmentos amplificados para as quinze amostras, ocorrendo o mesmo para Cubatão, enquanto São Vicente teve apenas 20 fragmentos amplificados.

O oligonucleotídeo OPI7 demonstrou diferenças significativas entre Juréia-São Vicente ($F=10,582$; $p<0,01$) e entre Cubatão-São Vicente ($p<0,05$), mas não entre Juréia-Cubatão ($p>0,05$). Todavia, especificamente no caso deste oligonucleotídeo, a Juréia apresentou o menor número de fragmentos amplificados para as amostras (quinze), enquanto Cubatão e São Vicente apresentaram 25 e 47, respectivamente.

O oligonucleotídeo OPJ9 demonstrou diferenças significativas entre Juréia-Cubatão e entre Cubatão-São Vicente ($F=4,657$; $p<0,05$), mas não entre Juréia-São Vicente ($p>0,05$).

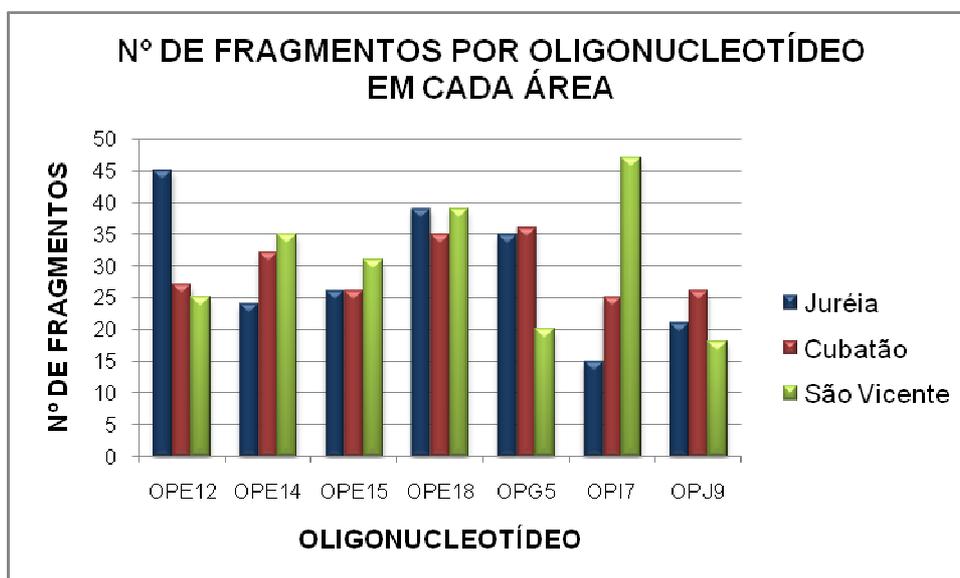


Figura 7: Número de fragmentos amplificados por cada um dos oligonucleotídeos investigados, entre cada uma das áreas de manguezal.

É importante ressaltar que nem sempre os oligonucleotídeos amplificaram todas as amostras para as áreas de manguezal. Assim, oito amostras não foram amplificadas para o OPJ9 (01 Juréia + 04 Cubatão + 03 São Vicente); quatro amostras para o OPE14 (02 Juréia + 01 Cubatão + 01 São Vicente), OPE15 (01 Juréia + 01 Cubatão + 02 São Vicente) e OPE17 (02 Juréia + 02 Cubatão); três amostras para o OPE12 (02 Juréia + 01 São Vicente); e duas amostras para o OPE18 (01 Juréia + 01 São Vicente). O OPG5 foi o único oligonucleotídeo testado que gerou amplificação para as 45 amostras.

Considerando-se as medidas originais de distância genética de Nei (1972) entre os oligonucleotídeos, é possível observar três diferentes padrões, sendo eles: 1) diferenças entre Juréia-Cubatão e Juréia-São Vicente, mas não entre São Vicente-Cubatão (obtido a partir do oligonucleotídeo OPE12); 2) diferenças entre Juréia-São Vicente e Cubatão-São Vicente, mas não entre Juréia-Cubatão (obtido a partir dos oligonucleotídeos OPE14, OPE15, OPE18 e

OPI7); e 3) diferenças entre Juréia-Cubatão e São Vicente-Cubatão, mas não entre Juréia-São Vicente (obtido a partir dos oligonucleotídeos OPG5 e OPJ9).

Por sua vez, as medidas originais de distância genética de Nei (1972), calculadas com base na união dos dados fornecidos por todos os oligonucleotídeos, demonstraram diferenças genéticas entre Juréia-São Vicente e entre Cubatão-São Vicente, mas não entre Juréia-Cubatão, corroborando os resultados obtidos para a maioria dos oligonucleotídeos (OPE14, OPE15, OPE18 e OPI7) (vide tabela V e figura 8).

Tabela V: Medidas originais de distância genética de Nei (1972), calculadas para as três áreas de estudo.

População	Juréia	Cubatão	São Vicente
Juréia	****	0,9533	0,9040
Cubatão	0,0478	****	0,9150
São Vicente	0,1010	0,0888	****



Figura 8: Dendrograma das medidas originais de distância genética de Nei (1972).

As análises de matrizes binárias feitas com o software *Free Tree v. 0.9.1.50* resultaram em diferentes padrões de dendogramas para cada um dos oligonucleotídeos testados, entretanto, o foco será dado sobre o dendrograma construído com base na união dos resultados fornecidos por todos os oligonucleotídeos. Os agrupamentos do dendrograma serão aqui numerados em ordem crescente (superior para inferior), visando facilitar a descrição dos resultados obtidos. Desta forma, em um dendrograma com cinco agrupamentos, o primeiro na porção superior será chamado de Agrupamento 1, o

imediatamente abaixo de Agrupamento 2, e assim por diante, até aquele localizado na porção mais inferior, denominado de Agrupamento 5. Cabe ressaltar que os clados maiores, nos quais os agrupamentos estão contidos, serão aqui tratados como ramos.

O dendograma construído com base nos dados gerais fornecidos por todos os oligonucleotídeos, com base no coeficiente de Nei & Li (1979), resultou em oito maiores agrupamentos, sendo os Agrupamentos 2, 3 e 4 integralmente constituídos por amostras da Juréia (treze amostras, no total). Logo a seguir, as amostras de Cubatão estiveram presentes integralmente no Agrupamento 5 e quase integralmente nos Agrupamentos 6 e 7 (treze amostras). Finalmente, em um ramo diferente, houve a concentração da maior parte das amostras de São Vicente, no Agrupamento 8 (quatorze amostras). O padrão encontrado demonstra maior relação entre as amostras da Juréia e de Cubatão (figura 9), ocorrendo o mesmo com os resultados fornecidos por três dos oligonucleotídeos (OPE14, OPE15 e OPG5) e parcialmente com outros dois (OPE12 e OPI7).

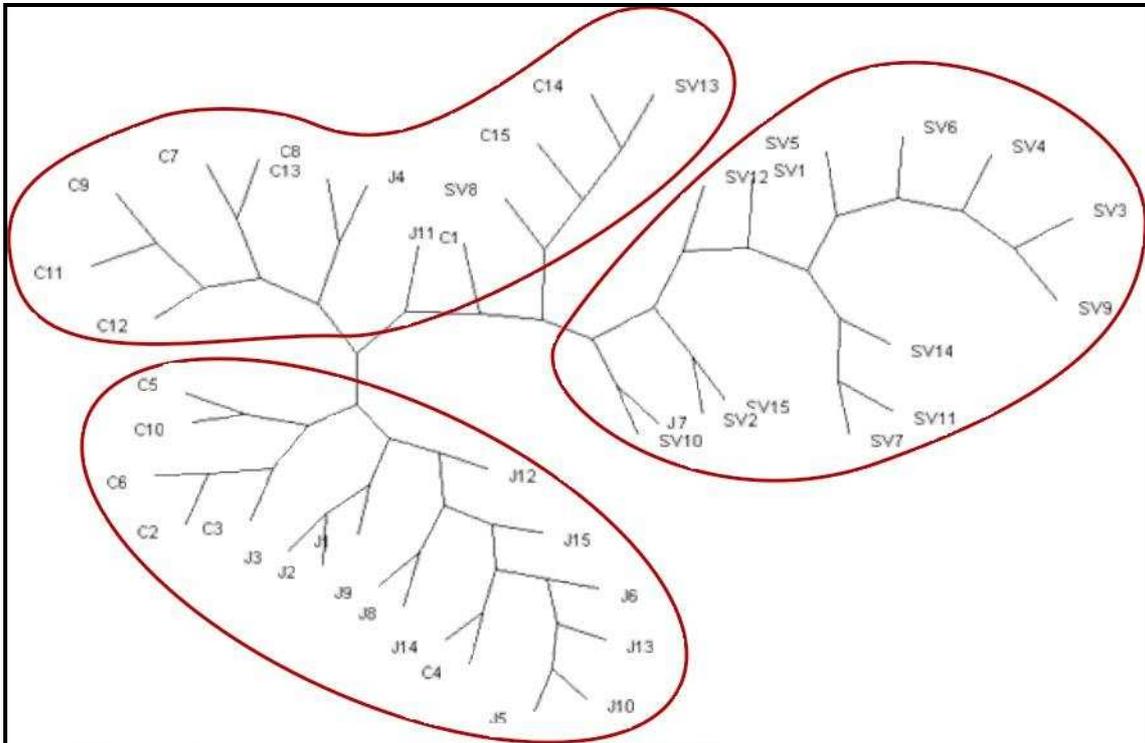


Figura 9: Dendograma construído com base nos dados fornecidos pelos sete oligonucleotídeos investigados, com destaque para os três ramos que representam as áreas de manguezal analisadas (SV = São Vicente; C = Cubatão; J = Juréia).

5. DISCUSSÃO

As concentrações de metais pesados no sedimento, detectadas no presente estudo, estiveram abaixo dos valores-guia estabelecidos pelo Canadá para os níveis limiares de efeitos (*threshold effect levels* - TEL) e níveis prováveis de efeitos (*probable effect levels* - PEL). Por esta razão, levando-se em consideração apenas estas análises, não ficam evidentes riscos ao nível biológico em nenhuma das três áreas de manguezal investigadas. O fato dos níveis de metais pesados detectados nas amostras de sedimentos da Juréia serem expressivamente inferiores a aquele do TEL confirmou a hipótese inicial do presente estudo, ocorrendo o mesmo com as amostras de sedimento do manguezal de São Vicente. Entretanto, contrariando a mesma hipótese, as concentrações de metais pesados para as amostras de Cubatão também foram inferiores ao TEL.

Cabe ressaltar, ainda, que os resultados obtidos pelas Análises de Variância (duas vias) também geraram informação diversa do que era esperado. Ao início do estudo, as três áreas foram selecionadas com base em seu histórico, sendo, a partir dele, assumido que o manguezal da Juréia seria o de menor impacto ambiental (inserção no Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins), sendo seguido pelo manguezal de São Vicente, enquanto o manguezal de Cubatão foi considerado como o de maior impacto. As análises estatísticas confirmaram a posição da Juréia em relação aos menores teores de metais pesados, embora estes teores tenham sido mais elevados para São Vicente do que Cubatão, contrariando os resultados divulgados pelo Relatório da CETESB de Agosto de 2001.

Conforme mencionado no item 4.1 dos “Resultados”, devido aos métodos de quantificação dos metais pesados não terem sido suficientes para concentrações mais reduzidas, não foi possível avaliar a qualidade da água nas áreas de manguezal considerando-se a maioria dos metais pesados da Juréia e um dos metais pesados em São Vicente (cobre). Observou-se que a concentração de cromo na Juréia encontra-se dentro dos padrões estabelecidos, assim como as concentrações de cádmio, chumbo e cromo em São Vicente. Entretanto, dentre os resultados, merece destaque os teores de

mercúrio encontrados em São Vicente, que superam os limites permitidos pela legislação em mais de 240 vezes, apontando para a necessidade de acompanhamento das variações destes níveis, além da necessidade de investigação de potenciais fontes de mercúrio para a região do Rio Branco.

As análises estatísticas demonstraram diferenças significativas entre as amostras de água das áreas de estudo e, da mesma maneira que no caso do sedimento, foram encontrados maiores teores de metais pesados nas amostras de São Vicente do que naquelas de Cubatão. As amostras de água da Juréia apresentaram as menores concentrações de metais pesados.

A retenção e acúmulo de metais pesados no ambiente é resultado de seu próprio incremento temporal. Entretanto, dependendo da granulometria do sedimento de manguezal, pode ocorrer potencialização da retenção destes metais, o que é mais evidente nos sedimentos compostos por frações mais finas, característica dos sedimentos lamosos e argilo-arenosos (VANNUCCI, 2003; LITTLE, 2006), mais freqüentes em manguezais. Assim, quanto mais finos os grãos, maior sua propensão em acumular poluentes (TAM & YAO, 1998; TAM & WONG, 2000; HYPOLITO *et al.*, 2005). Outros parâmetros também podem influenciar a ocorrência e acúmulo de metais pesados no ambiente, entre os quais destacam-se: o pH do sedimento, a quantidade/qualidade da matéria orgânica, a concentração de ânions, o potencial de oxi-redução, os tipos de sais presentes e a solubilidade (ZANDERS & ROJAS, 1996; TAM & WONG, 2000 *apud* VERTACNIK *et al.*, 1995; HYPOLITO *et al.*, 2005).

Sabe-se que o Programa de Controle de Poluição Ambiental de Cubatão, iniciado em julho/1983, resultou no controle de 98,8% das fontes de poluição atuadas e na redução de 92,5% dos poluentes lançados nos corpos d'água (CETESB, 2003). Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que as medidas tomadas pelo município podem estar sendo efetivas, ao menos no que diz respeito ao lançamento de efluentes tóxicos em corpos d'água (p. ex., cádmio, chumbo, cobre, chumbo e mercúrio).

Uma hipótese provável seria que a redução do lançamento destes compostos tóxicos na água pelas indústrias, bem como a complexa hidrologia fluvial e de marés no completo estuarino em questão, sejam responsáveis pela

lavagem constante dos sedimentos de manguezal, bem como pela exportação destes materiais para fora do sistema estuarino, ou mesmo para áreas adjacentes ao próprio estuário. Além disso, dados da literatura demonstram que a bioturbação do sedimento ou a redistribuição pós-deposicional podem mascarar os picos de concentração dos compostos tóxicos presentes no sedimento de manguezal (MACHADO *et al.*, 2002). De acordo com as características do sedimento de manguezal, podem ocorrer dois processos com os metais pesados: 1) absorção, com redução de sua remobilização e/ou biodisponibilidade, onde o manguezal atuaria como receptor; ou 2) adsorção, com acúmulo de metais por um curto período de tempo até que, devido às características edáficas, eles são remobilizados e ressuspensos, de modo que o manguezal atua como fonte (TAM & WONG, 1996).

Análises de variância não demonstraram diferenças significativas entre a concentração de cada metal pesado entre as profundidades analisadas (superfície, 15cm, 30cm e 45cm). Contrariando estes dados, TAM & WONG (1996), investigando manguezais em Hong Kong, encontraram concentrações mais elevadas de metais pesados (cobre, zinco, manganês e cádmio) na superfície do sedimento. Entretanto, vale ressaltar que os estudos destes autores foram conduzidos em locais com grande influência antrópica e constante descarga de efluentes, diferindo de Cubatão, que conta desde 1983, com o Programa de Controle de Poluição Ambiental, já mencionado anteriormente.

MACHADO *et al.* (1998) demonstraram que a concentração de metais aumenta com a profundidade, em função do tempo em que ocorreu a diminuição ou encerramento da liberação de compostos tóxicos pelas fontes poluidoras. Como cada área de manguezal tem sua própria taxa de sedimentação, de acordo com sua característica e dinâmica hídrica, pode-se levantar a hipótese de que em Cubatão, cujo principal histórico de contaminação remonta a década de 70, os sedimentos com maiores concentrações de metais pesados seriam encontrados em maiores profundidades. GODOY *et al.* (1998), estudando as taxas de sedimentação na Baía da Guanabara (RJ), encontraram valores entre 0,17 e 2,2cm.ano⁻¹, considerando camadas de sedimentos de 0-15 a 33-45cm. Assim, pode-se

assumir como possibilidade que o sedimento mais contaminado em Cubatão seja encontrado abaixo dos 45cm de profundidade, não amostrado no presente estudo. Apesar disso, as freqüentes dragagens que ocorrem na região de Cubatão (CETESB, 2005) possam inviabilizar tal hipótese, devido a alteração nas taxas de distribuição e sedimentação natural pela ressuspensão dos compostos tóxicos.

Deve ser considerada, ainda, a possibilidade de absorção e acúmulo dos metais pesados pelas espécies arbóreas de manguezal nas áreas investigadas, nomeadamente *Rhizophora mangle*, *Avicennia schaueriana* e *Laguncularia racemosa*. RAMOS & GERALDO (2007) investigaram a retenção de cádmio, chumbo, cobre, cromo e zinco pelas folhas destas três espécies vegetais em manguezais do Rio Cubatão e, apesar de *Avicennia* ter mostrado maior propensão à bioacumulação, não houve diferença significativa entre as espécies analisadas. Demonstraram, também, que, de maneira geral, não há uma acentuada contaminação nos vegetais apesar da evidência de contaminação por cádmio e cromo em diversas amostras de folhas analisadas.

WEN-JIAOL *et al.* (1997) estudando bioacumulação de alguns metais pesados por *Rhizophora stylosa*, em um manguezal da China, demonstraram diferenças tanto na absorção, quanto no local de armazenamento destes metais. A espécie mostrou uma maior habilidade na absorção do cádmio (folhas e raízes enterradas), uma absorção intermediária de chumbo (principalmente nos ramos) e uma difícil absorção do cobre (ramos e raízes enterradas) e cromo (ramos, cascas, galhos e raízes escora). Estes autores demonstraram, ainda, que as concentrações encontradas nos vegetais atingiam entre 90 a 96% da concentração destes mesmos metais no solo, indicando sua expressiva absorção e armazenamento nas raízes, troncos e ramos, frequentemente não consumidas pelos animais, reduzindo sua bioacumulação progressiva aos consumidores secundários.

MACFARLANE & BURCHETT (2002) investigaram a bioacumulação de cobre, chumbo e zinco por exemplares de *Avicennia marina* em manguezais de Sydney, na Austrália. Os autores demonstraram que o cobre é acumulado nos tecidos radiculares, e que sua translocação para as folhas é baixa. O chumbo,

por sua vez, é encontrado em menor concentração por ser extrusado a partir do epitélio radicular ou pelas folhas, no caso de concentrações mais elevadas deste metal no sedimento. As maiores taxas de incorporação ocorreram com o cobre e o zinco, apresentando transporte para as folhas, ocorrendo o mesmo com o chumbo. MACFARLANE *et al.* (2003), também estudando exemplares de *Avicennia marina*, nos manguezais de Sydney, demonstraram bioacumulação de cobre, chumbo e zinco nos tecidos radiculares, com translocação da raiz para as folhas, sendo que a concentração de cobre e zinco nas folhas era igual a 10% à presente nas raízes e, no caso do chumbo igual a 3%. Os autores mencionam que as plantas acumulavam cobre e chumbo nos tecidos de suas raízes em concentração igual ou superior àquela presente no sedimento do entorno. O chumbo, por não ser um metal essencial à planta, apresentou baixas taxas de translocação, sugerindo um forte mecanismo de extrusão, conforme mencionado no estudo anterior. Da mesma forma, estes dois artigos também demonstram que na presença de chumbo e zinco no sedimento, ocorre a potencialização do efeito, com aumento na acumulação de chumbo, tanto nas raízes quanto nos tecido foliculares, enfatizando as interações que ocorrem entre as diversas substâncias presentes no sedimento e, conseqüentemente, sobre a biota local. MACHADO *et al.* (2002) investigaram a bioacumulação de determinados metais pesados pelas folhas de *Laguncularia racemosa* nos manguezais da Baía da Guanabara (RJ), demonstrando uma maior transferência de cobre, manganês e níquel do sedimento para as folhas, quando comparado ao zinco e chumbo.

De qualquer modo, seria interessante, também, que fossem determinadas as concentrações de metais pesados presentes nos tecidos dos animais, para verificação da taxa de incorporação destes compostos a partir do meio ambiente. O Relatório da CETESB (2001), relativo ao Programa de Controle de Poluição (PROCOP) para o Sistema Estuarino de Santos-São Vicente, apresenta a determinação da concentração de metais pesados no tecido muscular de diversos organismos aquáticos e semi-terrestres, entre os quais figuram caranguejo-uçá. Entretanto, exemplares desta espécie foram coletados somente no Estuário de São Vicente, e as concentrações

encontradas para cádmio, chumbo, cobre, cromo e mercúrio foram inferiores ao limites máximos estabelecidos ao consumo humano.

O número de fragmentos gerados pelos oligonucleotídeos não diferiu significativamente entre as áreas de manguezal avaliadas. A exposição continuada de populações animais a compostos tóxicos geralmente implica em redução da variabilidade genética (efeito pescoço de garrafa - *bottleneck*) e no acasalamento de animais com baixa variabilidade genética (endogamia) (NADIG *et al.*, 1998; MA *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2002). Entretanto, reduções na variabilidade genética só foram observadas a partir da utilização dos oligonucleotídeos OPE12 e OPG5, com um menor número de fragmentos gerados para as amostras de São Vicente, local com as maiores concentrações dos metais pesados investigados neste estudo. Contraditoriamente ao esperado, os resultados gerados pelo oligonucleotídeo OPI7 mostraram o menor número de fragmentos para as amostras da Juréia, enquanto as amostras de São Vicente apresentaram a maior variabilidade genética, similarmente ao encontrado por NADIG *et al.* (1998), no estudo com *Lepomis auritus*. Com base no estudo de THEODORAKIS (2001), pode-se inferir que o efeito pescoço de garrafa não ocorreu nas três áreas de manguezal analisadas no presente estudo, uma vez que somente 28,6% dos sete oligonucleotídeos testados demonstraram redução na variabilidade genética, aqui referida como quantidade de fragmentos gerados no local com os maiores teores de metais.

Os resultados obtidos pelas medidas originais de distância genética de Nei (1972) estiveram de acordo com os dados obtidos para as concentrações de metais pesados presentes nas amostras de sedimento e de água. Assim, foram demonstradas diferenças significativas entre Juréia-São Vicente e Cubatão-São Vicente, mas não entre Juréia-Cubatão, com São Vicente aparecendo em um ramo diferente do dendograma gerado.

Da mesma maneira, os resultados visualizados nos dendogramas, obtidos a partir das amostras do caranguejo-uçá nas áreas de manguezal estudadas, demonstraram um maior grau de similaridade genética entre aquelas da Juréia e Cubatão, que se concentraram em um ramo diferente das amostras de São Vicente. Tal fato é concordante aos resultados individuais

fornecidos por alguns dos oligonucleotídeos (OPE14, OPE15 e OPG5) e parcialmente com outros (OPE12 e OPI7). Para a construção destes dendogramas, optou-se por utilizar o coeficiente de similaridade de Nei & Li, que estima a proporção esperada de fragmentos amplificados compartilhados pelas amostras. Além disso, em estudos com RAPD baseados na investigação de organismos com relações próximas, foi demonstrado que este coeficiente causa menor viés, sendo o mais recomendado nestes casos (LAMBOY, 1994).

Assim como verificado para os resultados dos metais pesados, os dados de diversidade genética demonstraram maior similaridade entre os animais coletados nos manguezais da Juréia e Cubatão, indicando diferença daqueles procedentes de São Vicente. Levando-se em conta que da implantação do Programa de Controle de Poluição Ambiental em Cubatão, até a realização do presente estudo, decorreram somente 23 anos, é pouco provável que a população de *Ucides cordatus* possa ter recuperado sua diversidade genética. Por este motivo, é plausível supor que os teores dos metais avaliados não afetaram as populações do caranguejo-uçá de Cubatão, bem como que os manguezais deste município agiram apenas como fonte, absorvendo temporariamente estes metais, que foram adsorvidos devido às características edáficas e de dinâmica hídrica, sendo depois ressuspensos e transportados estuário abaixo. Contrariamente, dependendo das características edáficas e hidrodinâmicas, os manguezais de São Vicente poderiam acabar funcionando como área receptora de metais pesados, gerando redução da diversidade genética de suas populações animais, explicando a maior similaridade genética entre aqueles procedentes de Cubatão e Juréia. Não foram encontradas diferenças significativas de variabilidade genética, expressa em número de *loci* amplificados pelas amostras para cada uma das áreas de manguezal analisadas.

O fato do manguezal de São Vicente ter apresentado elevada taxa de metais pesados, e se diferenciar geneticamente da Juréia e Cubatão (conforme demonstrado pelos cálculos de distância genética), evidencia a necessidade premente de uma intensificação de estudos sobre as fontes poluidoras às quais os manguezais da região estão expostos. O Relatório da CETESB (2001), resultante do Programa de Controle de Poluição (PROCOP) para o Sistema

Estuarino de Santos-São Vicente, também demonstrou elevadas concentrações de cádmio, chumbo, cobre e mercúrio para os manguezais do Estuário de São Vicente. Possivelmente tal quadro seja causado por contaminação pela CIEL, uma indústria localizada no estuário de São Vicente, próxima à desembocadura do Rio Branco, que por manipular escórias da COSIPA, pode acabar importando seus resíduos contaminados. Além disso, em São Vicente existem locais de disposição irregular de resíduos industriais contaminados, tais como os da RHODIA, que influenciam diretamente a região do Rio Branco, que também recebe a drenagem de esgotos domésticos, servindo como fonte de metais pesados, cianeto, e outros compostos fenólicos (CETESB, 2001). Os manguezais de São Vicente sofrem, ainda, impactos das estradas de rodagem próximas, de maneira que na época das chuvas diversos compostos (metais pesados, fenóis, hidrocarbonetos, entre outros) são lixiviados e atingem os ecossistemas estuarinos (DENIS ABESSA, *com. pess.*). PINHEIRO & TOLEDO (em preparação) descrevem um exemplar de *Ucides cordatus* com malformação de um de seus quelípodos (pinça), verificando $11,5 \pm 2$ células micronucleadas/1.000 analisadas, ou seja, três vezes acima do estabelecido como normal na literatura, atribuindo esta diferenciação à exposição do animal aos efluentes industriais de Cubatão e contaminantes dos lixões públicos da Alemoa e Sambaiatuba.

Diversos dados da literatura demonstram as altas concentrações de metais pesados presentes nos manguezais de Cubatão, não detectadas no presente trabalho. Conforme mencionado anteriormente, a lavagem do sedimento destes manguezais pode ter promovido o transporte dos metais para outros locais do estuário. Deve-se ressaltar, ainda, o reduzido número de animais coletados por área de manguezal ($n=15$), o que poderia enviesar os resultados. Assim, o ideal seria a condução de mais coletas, com pelo menos três réplicas por área de estudo, e captura de 15 animais/réplica ($n=45$), além de um maior número de amostras de água e sedimento nestas réplicas, na tentativa de cobrir uma maior área do estuário. Talvez fosse interessante, ainda, recorrer a outros métodos mais sensíveis à determinação da concentração de metais pesados presentes nas amostras.

Outro fato que vale ser ressaltado é a possibilidade que no presente estudo tenham sido selecionados metais pesados de menor influência sobre a diversidade genética, em detrimento de outras substâncias, tais como solventes aromáticos, fertilizantes ou hidrocarbonos aromáticos policíclicos, todos eles com caráter mutagênico. Cabe ressaltar, ainda, que Cubatão emergiu enquanto grande pólo industrial na década de 60, com a instalação de 23 indústrias na região (UECHI, 2008), tendo transcorrido 23 anos deste fato até a implantação do Programa de Controle de Poluição Ambiental ocorrido em 1983. Talvez a população de *Ucides cordatus* do manguezal de Cubatão tenha sido exposta a compostos sem efeito tóxico direto, e o tempo de exposição (23 anos) não tenha sido suficiente para causar alterações na diversidade genética. Todavia, não se pode descartar a hipótese de que a população de *Ucides cordatus* do manguezal de Cubatão tenha recuperado sua variabilidade genética, através de processos de fluxo gênico. É importante ressaltar, ainda, que as diferenças na variabilidade genética podem ser resultado de fatores, tais como fluxo gênico, deriva genética, endogamia, densidade populacional, complexidade do habitat, seleção natural e mutação (NEI *et al.*, 1975; THEODORAKIS & SHUGART, 1997). Tal fato resulta em diferentes respostas para cada população estudada, lembrando a peculiaridade característica de cada manguezal, e que os resultados obtidos no presente trabalho não refletem a realidade da Juréia, de São Vicente e de Cubatão, mas sim, especificamente, dos manguezais investigados nestes locais.

NADIG *et al.* (1998) não conseguiram demonstrar diferenças significativas relacionando diversidade genética de peixes (*Lepomis auritus*) expostos a contaminantes. Entretanto, outros parâmetros analisados demonstraram diferenças significativas, tais como a concentração de mercúrio na água e nos tecidos dos peixes, assim como a atividade da enzima de detoxificação (*detoxification enzyme* – EROD) e a integridade do DNA. No presente estudo foi utilizada somente a técnica de RAPD. Para uma análise refinada seria interessante a aplicação conjunta de outras metodologias moleculares como análise de expressão gênica e medidas de bioacumulação tecidual para a comparação dos resultados, com aumento de sua robustez. Além disso, a utilização de mais de uma espécie para avaliar possíveis alterações a nível

genético também é uma sugestão válida, principalmente em casos de comparação entre populações provenientes de locais contaminados e de referência. Tal fato torna-se ainda particularmente evidente quando a pretensão é determinar relações de causa/efeito ou quando inferências sobre o sucesso de medidas remediadoras (MA *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2002).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Visando complementar os resultados obtidos, assim como incrementar os conhecimentos sobre a bioecologia de *Ucides cordatus*, recomendam-se para estudos futuros na área:

- Seleção de três manguezais a serem investigados em cada área de estudo, visando o aumento da área de cobertura, do número de animais analisados e a maior robustez dos dados;
- Determinação da concentração de metais pesados presentes nos tecidos dos animais;
- Determinação da concentração de metais pesados em tecidos de *Rhizophora mangle*, *Avicennia schaueriana* e *Laguncularia racemosa*;
- Determinação dos teores de um maior número de metais pesados no sedimento, na água e nos tecidos, além da escolha de outros compostos tóxicos relevantes, liberados pelo homem neste ecossistema;
- Estudos envolvendo modelagem para maiores conhecimentos sobre a hidrodinâmica dentro dos estuários estudados;
- Levantamento das características edáficas dos manguezais, envolvendo dados de granulometria e quantidade de matéria orgânica presente no sedimento;
- Estudos sobre dispersão larval da espécie-alvo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA METROPOLITANA DA BAIXADA SANTISTA. Ata da Vigésima Terceira reunião extraordinária do conselho de desenvolvimento da região metropolitana da Baixada Santista, realizada em 30 de Novembro de 2005. Disponível em <http://www.agem.sp.gov.br/condesb_atas_2005_23.htm>. Acesso em: 6 de Out. 2008.
- ALI, B.A.; HUANG, T.; QIN, D. & WANG, X. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.14, p.443-453, 2004.
- ALONGI, D.M. **Coastal Ecosystem Processes**. Boca Raton: CRC Press, 1998, 419p.
- ALVES, R.R.N. & NISHIDA, A.K. Aspectos socioeconômicos e percepção ambiental dos catadores de caranguejo-uçá *Ucides cordatus cordatus* (L. 1763) (Decapoda, Brachyura) do estuário do Rio Mamanguape, Nordeste do Brasil. **Interciência**, v.28, n.1, p.36-43, 2003.
- ATHANASOPOULOS, N. **Flame methods manual for atomic absorption**. Victoria: GBC Scientific Equipment PTY LTD, 1993, pp.1-11.
- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. 5. ed. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM/ MCT/ CNPq, 2007, 364p. + CD-Rom.
- BASSET, J.; DENNEY, R.C.; JEFFERY, G.H. & MENDHAN, J. **Vogel – Análise Inorgânica Quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981, 690p.
- BEGON, M.; HARPER, J.L. & TOWNSEND, C.R. (1996). **Ecology**. 3. ed. London: Blackwell Science, 1996, 256p.

- BELFIORE, N.M. & ANDERSON, S.L. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. **Mutation Research**, v.489, p.97-122.
- BRANCO, J.O. Aspectos bioecológicos do caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda) do Manguezal do Itacorubi, Santa Catarina, BR. **Arq. Biol. Tecnol.** v.36, n.1, p.133-148, 1993.
- BURNS, K.A.; GARRITY, S.D. & LEVINGS, S.C. How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil spills? **Marine Pollution Bulletin**, v.26, n.5, p.239-248, 1993.
- CANADIAN SEDIMENT QUALITY GUIDELINES FOR THE PROTECTION OF AQUATIC LIFE. **Summary Tables**. Disponível em: < http://www.ccme.ca/assets/pdf/sedqg_summary_table.pdf>. Acesso em 6 Out. 2008. 2002, 7p.
- CHRISTOFOLETTI, R.A. **Ecologia trófica do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Ocypodidae) e o fluxo de nutrientes em bosques de mangue, na Região de Iguape (SP)**. 2005. 139f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **CETESB presta contas do Programa de Controle da Poluição em Cubatão**. Out. 2003. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 6 Out. 2008.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Programa de controle de poluição – Programa de Assistência Técnica – Sistema Estuarino de Santos e São Vicente**. Ago. 2001. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/publicacoes.asp>. Acesso em 8 Out. 2008.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relação de áreas contaminadas – Novembro de 2007 – Relação por municípios**. Nov. 2007. Disponível em < http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp>. Acesso em 7 Out. 2008.

- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005.
- CRITICAL ECOSYSTEM PARTNERSHIP FUND. Relatório Especial: Avaliação de Cinco Anos de Investimento do CEPF no *hotspot* de biodiversidade da Mata Atlântica – Brasil. 2003. Disponível em http://www.cepf.net/ImageCache/cepf/content/pdfs/final_5fatlanticforest_5fassessment_2eportuguese_2emarch07_2epdf/v1/final_5fatlanticforest_5fassessment.portuguese.march07.pdf. Acesso em 8 Out. 2008.
- DALABONA, G.; SILVA, J.L. & PINHEIRO, M.A.A. Size at morphological maturity of *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae) in the Laranjeiras Bay, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.1, p.139-145, 2005.
- DE WOLF, H.; BLUST, R. & BACKELJAU, T. The use of RAPD in ecotoxicology. **Mutation Research**, v.566, p. 249-262, 2004.
- DE WOLF, H.; ULOMI, S.A.; BACKELIAU, T.; PRATAP, H.B. & BLUST, R. Heavy metal levels in the sediments of four Dar es Sallam mangroves accumulation in, and effect on the morphology of the periwinkle, *Littoraria scabra* (Mollusca: Gastropoda). **Environmental International**, v.26, p. 243-249, 2001.
- DUKE, N.C. Mangrove floristics and biogeography. In: Robertson, A.I. & Alongi, D.M. (Eds.), **Tropical Mangrove Ecosystems**. Washington D.C.: Coastal and Estuarine Studies Series, American Geophysical Union, 1992, p.63-100.
- EASTSIDE ENVIRONMENTAL STATEMENT. **Sediment Quality**. Disponível em: < http://www.gibraltar.gov.gi/gov_depts/trade_industry/eastside/7.pdf>. Acesso em 6 Out. 2008. Jul. 2007, 13p.
- ELLISON, A.M. Managing mangroves with benthic biodiversity in mind: moving beyond roving banditry. **Journal of Sea Research**, v.59, p.2-15, 2008.

- FISCARELLI, A.G. & PINHEIRO, M.A.A.. Perfil sócio-econômico e conhecimento etnobiológico do catador de caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), nos manguezais de Iguape (24°41'S), SP, Brasil. **Actual. Biol.**, v.24, n.77, p.129-142, 2002.
- FISCARELLI, A.G. **Rendimento, análise químico-bromatológica da carne e fator de condição do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae).** 2004. 103f. Dissertação(Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- FRAGMENT SIZE CALCULATOR. Disponível em <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/SizeCalc.html>>. Acesso em 8 Out. 2008.
- GLASER, M. & DIELE, K. Asymmetric outcomes: Assessing central aspects of the biological, economic and social sustainability of a mangrove crab fishery, *Ucides cordatus* (Ocypodidae), in North Brazil. **Ecological Economics**,v.49, p.361-373, 2004.
- GODOY, J.M.; MOREIRA, I., BRAGANÇA. M.J.; WANDERLEY, C. & MENDES, L.B. A study of Guanabara Bay sedimentation rates. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.227, n.1-2, p. 157-160, 1998.
- GOLLEY, F.; ODUM, H.T. & WILSON, R.F. The structure and metabolism of a Puerto Rican Red Mangrove Forest in May. **Ecology**, v.43, p.9-19, 1962.
- GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Decreto nº24.646, 20 de janeiro de 1986. Cria a Estação Ecológica de Juréia-Itatins e dá providências correlatas. São Paulo, v.96, n.14, 21 de janeiro de 1986.
- GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Lei Estadual 12.406, de 12 de dezembro de 2006. Altera a Lei nº5.659, de 28 de abril de 1987, que criou a Estação Ecológica Juréia-Itatins, exclui, reclassifica e incorpora áreas que especifica, institui o Mosaico de Unidades de Conservação da Juréia-Itatins, regulamenta ocupações e dá outras providências.

- GRECO, L.S.L.; SÁNCHEZ, M.V.; NICOLSI, G.K.; MEDESANI, D.A. & RODRIGUEZ, E.M. Toxicity of cadmium and copper on larval and juvenile stages of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.41, p.333-338, 2001.
- HARRIS, R.R. & SANTOS, M.C.F. Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). **Marine Biology**, v.137, p.691-703, 2000.
- HATTORI, G.Y. & PINHEIRO, M.A.A. Fertilidade do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) em Iguape (São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.2, p.309-313, 2003.
- HATTORI, G.Y. **Biologia populacional do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), em Iguape (SP)**. 2002. 89f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- HATTORI, G.Y. **Densidade populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), na Região de Iguape (SP)**. 2006. 159f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- HOGARTH, P.J. **The Biology of mangroves**. Oxford: Oxford University Press, 1999, 228p.
- HUTCHINGS P. & SAENGER, P. **Ecology of Mangroves**. Queensland: University of Queensland Press, 1987, 388 p.
- HYPOLITO, R.; FERRER, L.M. & NASCIMENTO, S.C. Comportamento de espécies de mercúrio no sistema sedimento-água do mangue do

- município de Cubatão, São Paulo. **Águas Subterrâneas**, v.19, n.1, p.15-24, 2005.
- IBAMA. Portaria nº52, 2003.
 - IBAMA. Portaria nº70, 2000.
 - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). População recenseada e estimada, segundo os municípios - São Paulo - 2007. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/defaulttab.shtm>>. Acesso em 7 Out. 2008.
 - JENNERJAHN, T.C. & ITTEKKOT, V. Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins. **Naturwissenschaften**, v.89, p. 23-30, 2002.
 - KE, L.; YU, K.S.H.; WONG, Y.S. & TAM, N.F.Y. Spatial and vertical distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments. **Science of the total environment**, v.340, p. 177-187, 2005.
 - KLEKOWSKI JR., E.J., CORREDOR, J.E.; MORELL, J.M. & CASTILLO, C.A. Petroleum pollution and mutation in mangroves. **Marine Pollution Bulletin**, v.28, n.3, p. 166-169, 1994.
 - KLINBUNGA, S.; BOONYAPAKDEE, A. & PRATOOMCHAT, B. Genetic diversity and species-diagnostic markers of mud crabs (Genus *Scylla*) in Eastern Thailand determined by RAPD analysis. **Marine Biotechnology**, v.2, p.180-187, 2000.
 - KOCH, V. **Epibenthic production and energy flow in the Caeté mangrove estuary, North Brazil**. Bremen: ZMT Contribution 6, 1999, 97p.
 - LABUNSKA, I.; STRINGER, R.; SANTILLO, D. & STEPHENSON, A. **Identificação e significado ambiental de poluentes orgânicos e metais pesados encontrados as amostras relacionadas com a Rhodia S.A., Cubatão**

- e São Vicente, Brasil.** Reino Unido: Laboratório de Pesquisas do Greenpeace, Universidade de Exeter. 1999, 58p.
- LAMBOY, W.F. Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. **PCR Methods Appl.**, v.4, p.31-37, 1994.
 - LIMA, G.V. & OSHIRO, L.M.Y. Crescimento somático do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) em laboratório. **Iheringia, Sér. Zool.**, v.96, n.4, p.467-472, 2006
 - LITTLE, C. **The Biology of soft shores and estuaries.** 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2006, 252p.
 - LU, R.; QIU, T.; XIANG, C; XIE, H. & ZHANG, J. RAPD and AFLP techniques for the analysis of genetic relationships in two genera of Decapoda. **Crustaceana**, v.73, n.9, p.1027-1036, 2000.
 - LUIZ-SILVA, W.; MATOS, R.H.R. & KRISTOCH, G.C. Geoquímica e índice de geoacumulação de mercúrio em sedimentos de superfície do estuário de Santos-Cubatão (SP). **Química Nova**, v.25, p.753-756, 2002.
 - MA, X.L.; COWLES, D.L. & CARTER, R.L. Effect of pollution on genetic diversity in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* and the acorn barnacle *Balanus glandula*. **Marine Environmental Research**, v.50, p. 559-563, 2000.
 - MACFARLANE, G.R. & BURCHETT, M.D. Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Marine Environmental Research**, v.54, p.65-84, 2002.
 - MACFARLANE, G.R.; PULKOWNIK, A. & BURCHETT, M.D. Accumulation and distribution of heavy metals in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.: biological indication potential. **Environmental Pollution**, v.123, p.139-151, 2003.

- MACHADO, W.; MOSCATELLI, M.; REZENDE, L.G. & LACERDA, L.D. Mercury, zinc, and copper accumulation in mangrove sediments surrounding a large landfill in southeast Brazil. **Environmental Pollution**, v.120, p. 455-461, 2002.
- MACHADO, W.; SILVA-FILHO, E.V.; OLIVEIRA, R.R. & LACERDA, L.D. (2002). Trace metal retention in mangrove ecosystems in Guanabara Bay, SE Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.44, p.1277-1280, 2002.
- MACINTOSH, D.J. & ASHTON, E.C. Relatório Final: A Review of mangrove biodiversity conservation and management. *Centre for Tropical Ecosystems Research (Center Aarhus)*. 2002.
- MACKEY, A.P. & HODGKINSON, M. Assessment of the impact of naphthalene contamination on mangrove fauna using behavioral bioassays. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.56, p.279-286, 1996.
- MELO, G.A.S. **Manual de Identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. 1. ed. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1996, 603p.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Instrução Normativa nº5 de 21 de Maio de 2004.
- NADIG, S.G.; LEE, K.L. & ADAMS, S.M. Evaluating alterations of genetic diversity in sunfish populations exposed to contaminants using RAPD assay. **Aquatic Toxicology**, v.43, p.163-178, 1998.
- NAOUM, P.C.; MOURÃO, C.A. & RUIZ, M.A. Alterações hematológicas induzidas por poluição industrial em moradores e industriários de Cubatão, SP (Brasil). **Rev. Saúde Públ. S. Paulo**, v.18, p.271-277, 1984.
- NASA. **Imagem true-color planificada do planeta terra**. Disponível em <[http:// www.guiageografico.net/terra/mundo.htm](http://www.guiageografico.net/terra/mundo.htm)>. Acesso em 6 Out. 2008.

- NASCIMENTO, S.A. **Ecofisiologia do Manguezal**. Aracaju: Secretaria de Estado do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos, 2007, 76p.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **The American naturalist**, v. 106, n. 949, p. 283-292, Mai.-Jun. 1972.
- NEI, M.; MARUYAMA, T. & CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v.29, n.1, p.1-10, 1975.
- NGUYEN, T.T.T.; BURRIDGE, C.P. & AUSTIN, C.M. Population genetic studies on the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Crustacea: Parastacidae) using allozyme and RAPD markers. **Aquatic Living Resources**, v.18, p.55-64, 2005.
- OLIVEIRA, D.A.F. **Distribuição Espacial do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae)**. 2005. 57f. Dissertação (Bacharelado) - Campus Experimental do Litoral Paulista, Unidade São Vicente, Universidade Estadual Paulista.
- OLIVEIRA, E.R. **Populações humanas na Estação Ecológica Juréia-Itatins**. In: Série Documentos e Relatórios de Pesquisa, n.2. São Paulo: NUPAUB – Núcleo de Apoio à Pesquisa sobre Populações Humanas e Áreas Úmidas Brasileiras da Universidade de São Paulo. 2004. 50p.
- OSTRENSKI, A.; STERNHAIN, U.S.; BRUN, E.; WEGBECHER, F.X. & PESTANA, D. Análise da viabilidade técnico-econômica dos cultivos de caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) no litoral parananense. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.38, n.3, p.939-947, 1995.
- PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C. & FUERST, P.A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, n.2, p.361-382, 1998.
- PAVLICEK, A. & FLEGR, J. **Free-Tree v. 0.9.1.50**. 2001. Disponível em <http://www.natur.cuni.cz/~flegr/freetree.php>). Acesso em 15 Out. 2008.

- PINHEIRO, M.A.A. & FISCARELLI, A.G. **Manual de apoio à fiscalização do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*)**. Jaboticabal: UNESP/CEPSUL/IBAMA, 2001, 43p.
- PINHEIRO, M.A.A. & FISCARELLI, A.G. **Manual de apoio à fiscalização – caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*)**. Itajaí: UNESP/ CEPSUL/ IBAMA, 2001, 43p.
- PINHEIRO, M.A.A. & HATTORI, G.Y. Embriology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). **Journal of Crustacean Biology**, v.23, n.3, p.729-737, 2003.
- PINHEIRO, M.A.A. & HATTORI, G.Y. Relative growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) at Iguape, São Paulo, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.5, p.813-823, 2006.
- PINHEIRO, M.A.A. & TOLEDO, T.R. Malformation in the crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), in São Vicente, State of São Paulo, Brazil. **Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha**, em preparação.
- PINHEIRO, M.A.A.; BAVELONI, M.D. & TERCEIRO, O.S.L. Fecundity of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae). **Invertebrates Reproduction and Development**, v.43, n.1, p.19-26, 2003.
- PINHEIRO, M.A.A.; FISCARELLI, A.G. & HATTORI, G.Y. Growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). **Journal of Crustacean Biology**, v.25, n.2, p.293-301, 2005.
- PINHEIRO, M.A.A.; COSTA, T.M.; GADIG, O.B.F. & BUCHMANN, F.S.C. Os ecossistemas costeiros e sua biodiversidade na Baixada Santista. In: Oliveira, A.J.F.C.; Pinheiro, M.A.A.; Fontes, R.F.C. (Eds). **Panorama Ambiental da Baixada Santista**. 1. ed. São Vicente: Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista, 2008, p. 7-26.

- RAMOS, M.G.M. & GERALDO, L.P. Avaliação das espécies de plantas *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* como bioindicadoras de poluição por metais pesados em ambientes de mangues. **Eng. Sanit. Ambient.**, v.12, n.4, p.440-445, 2007.
- ROSS, K.; COOPER, N.; BIDWELL, J.R. & ELDER, J. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. **Marine Pollution Bulletin**, v.44, p.671-679, 2002.
- SAENGER, P. Mangrove use and conservation. In: Field. C.D. & Dartnall, A.J. (Eds.), **Mangrove ecosystems of Asia and the Pacific: status and management**. Townsville: Australian Institute Marine Science, 1987, p.97-103.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual – 2.Eukaryotic cells**. 2. ed. USA: Cold Springer Harbor Laboratory press, 1989.
- SANT'ANNA, B.S. (2006). **Biologia reprodutiva do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), em Iguape, SP, Brasil**. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesca do Governo do Estado de São Paulo.
- SANT'ANNA, B.S.; PINHEIRO, M.A.A.; MATAQUEIRO, M. & ZARA, F.J. Spermathecae of the mangrove crab *Ucides cordatus*: A histological and histoquimical view. **J. Mar. Biol. Ass. U.K.**, v.87, p.903-911, 2007.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON-MOLERO, G.; ADAIME, R.R. & CAMARGO, T.M. Variability of mangrove ecosystems along Brazilian coast. **Estuaries**, v.13, n.2, p.204-218, 1990.
- SCHOLANDER, P.F.; VAN DAM, L.; SCHOLANDER, S.I. Gas exchange in the roots of mangroves. **American Journal of Botany**, v.42, P.92-98, 1955.
- SILVA, C.A.; LACERDA, L.D. & REZENDE, C.E. Metals reservoir in a red mangrove forest. **Biotropica**, v.22, n.4, p.339-345, 1990.

- SISTEMA NACIONAL DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO (SNUC). Lei nº9.985, de 18 de julho de 2000.
- SOUZA, F.A.Z. **Perfil das atividades sócio-econômicas e culturais de populações não tradicionais dentro do Mosaico de Unidades de Conservação da Juréia-Itatins**. 2007. 53f. Dissertação (Bacharelado) - Campus Experimental do Litoral Paulista, Unidade São Vicente, Universidade Estadual Paulista.
- SPALDING, M. D., BLASCO, F. & FIELD, C. **World Mangrove Atlas**. Okinawa: The International Society for Mangrove Ecosystems, 1997, 178p.
- TAM, N.F.Y. & WONG, Y.S. Retention and distribution of heavy metals in mangrove soils receiving wastewater. **Environmental Pollution**, v.94, n.3, p.283-291, 1996.
- TAM, N.F.Y. & WONG, Y.S. Spatial variation of heavy metals in surface sediments of Hong Kong mangrove swamps. **Environmental Pollution**, v.110, p.195-205, 2000.
- TAM, N.F.Y.; KE, L.; WANG, X.H. & WONG, Y.S. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. **Environmental Pollution**, v.114, p.255-263, 2001.
- TAM, N.F.Y.; WONG, T.W.Y. & WONG, Y.S. A case study on fuel oil contamination in a mangrove swamp in Hong Kong. **Marine Pollution Bulletin**, v.51, n.8-12, p.1092-1100, 2005.
- THEODORAKIS, C.W. & SHUGART, L.R. Genetic ecotoxicology II: population genetic structure in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. **Ecotoxicology**, v.6, p. 335-354, 1997.
- THEODORAKIS, C.W. Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. **Ecotoxicology**, v.10, p.245-256, 2001.

- THEODORAKIS, C.W.; BICKHAM, J.W. & LAMB, T. Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada test site, USA. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.20, n.2, p. 317-326, 2001.
- UECHI L. Como Cubatão deixou o vale da morte – O processo de recuperação ambiental de Cubatão que controlou a poluição e a degradação da cidade. **Neo Mundo**, v.Especial Agosto/2008, p.26-28, 2008.
- VALDOVINOS, C. & ZUÑIGA, M. Copper acute toxicity tests with the sand crab *Emerita analoga* (Decapoda: Hippidae): a biomonitor of heavy metal pollution in Chilean coastal seawater. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.69, p.393-400, 2002.
- VANNUCCI, M. What is so special about mangroves? **Braz. J. Biol**, v.61, n.4, p.599-603, 2001.
- VANNUCI, M. **Os manguezais e nós**. 2. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, 244p.
- VON SOOSTEN, C.; SCHMIDT, H. & WESTHEIDE, W. Genetic variability and relationships among geographically widely separated populations of *Petitia amphophthalma* (Polychaeta: Syllidae). Results from RAPD-PCR investigations. **Marine Biology**, v.131, p.659-669, 1998.
- WEN-JIAOL, Z.; XIAO-YONG, C. & PENG, L. Accumulation and biological cycling of heavy metal elements in *Rhizophora stylosa* mangroves in Yingluo Bay, China. **Marine Ecology Progress Series**, v.159, p.293-301, 1997.
- YEH, F.C.; BOYLE, T.; YE, Z. & XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.31: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis**. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999, 28p.

- YOUNG, C.E.F. & LUSTOSA, M.C.J. Meio ambiente e competitividade na indústria brasileira. **Revista de Economia Contemporânea**, 2001, 29p. Disponível em <<http://www.ifm.org.br/moodle/file.php/19/20528.pdf>>. Acesso em 6 Out. 2008.

- ZANDERS, I.P. & ROJAS, W.E. Salinity effects on cadmium accumulation in various tissues of the tropical fiddler crab *Uca rapax*. **Environmental pollution**, v.94, n.3, p.293-299, 1996.