

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

DISSERTAÇÃO

**PRESSÃO AMBIENTAL SOBRE *LITTORARIA ANGULIFERA*:
ACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS E MUTAGENICIDADE
ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS**

KATARINE MIZAN BARBOSA SANTOS

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir De França

Co-Orientadora: Dra. Rebeca da Silva Cantinha

Recife, PE

Agosto, 2016

KATARINE MIZAN BARBOSA SANTOS

**PRESSÃO AMBIENTAL SOBRE *LITTORARIA ANGULIFERA*:
ACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS E MUTAGENICIDADE
ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir De França

Co-orientadora: Dra. Rebeca da Silva Cantinha

Recife, PE
Agosto, 2016

Catálogo na fonte
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

S237p Santos, Katarine Mizan Barbosa.

Pressão ambiental sobre *Littoraria angulifera*:
acumulação de elementos químicos e mutagenicidade
associadas a alterações histológicas. / Katarine Mizan
Barbosa Santos. - Recife: O Autor, 2016.

100 f. : il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.

Coorientadora: Dra. Rebeca da Silva Cantinha.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em
Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2016.

Inclui referências bibliográficas.

1. Caramujo. 2. Manguezal. 3. EDXRF. 4. FAAS.
5. Histologia. 6. Impactos ambientais. I. França, Elvis
Joacir de, orientador. II. Cantinha, Rebeca da Silva,
coorientadora. III. Título.

UFPE

CDD 621.48 (21. ed.)

BDEN/2017-17

Pressão Ambiental sobre *Littoraria Angulifera*: Acumulação de Elementos Químicos e Mutagenicidade Associadas a Alterações Histológicas

Katarine Mizan Barbosa Santos

APROVADA EM: 03.08.2016

ORIENTADOR: Prof. Dr. Elvis Joacir de França

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Rebeca da Silva Cantinha

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira – CRCN/NE

Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo – DBR/UFPE

Profa. Dra. Luanna Ribeiro Santos Silva – FAINTVISA

Visto e permitida a impressão

Coordenador(a) do PROTEN/DEN/UFPE

“...Mas não quero me meter com gente louca”, Alice observou. “Oh! É inevitável”, disse o Gato; “somos todos loucos aqui. Eu sou louco. Você é louca.” “Como sabe que sou louca?” perguntou Alice. “Só pode ser”, respondeu o Gato, “ou não teria vindo parar aqui...”

(Lewis Carrol)

AGRADECIMENTOS

Com a satisfação de poder ter conseguido chegar ao final de mais uma etapa da vida, venho agradecer a cada pessoa que participou dessa história:

Primeiramente a Deus e meu mentor espiritual, por me guiarem nessa trajetória. Em seguida, a meus pais, Lucia e Williams, principalmente minha mãe, por terem me trazido ao mundo e cuidado para que minha educação básica fosse concluída além de também terem gerado os melhores seres humanos do mundo, que fazem meus dias melhores e mais felizes, meus irmãos Caio e Caled. Aos meus irmãos, agradeço por tudo que sou e quem possa ser um dia, tanto na vida profissional quanto na pessoal, também agradeço pelas partidas de “League of Legends”, papas envenenadas, idas ao médico, doenças compartilhadas, noites assistindo canais de youtubers, conversas intermináveis, apoio incondicional e discussões estúpidas.

Ao meu marido Robson, só tenho a dizer o quanto dividir o peso da vida com você, a torna suportável e prazerosa, e o quanto amar você é fácil, exceto durante a TPM.

Da minha família, não posso esquecer nunca de agradecer as minhas tias Alba, Rosa, Mira e Sofia, e aos meus tios, Fábio “Bito”, Cledson, Jaimessom “Jeminho” e Ricardo “Rico”. Espero que a bondade e o cuidado com que tratam a mim, meu marido e meus irmãos nunca acabe. Aos meus primos Diogo, Irla, Jôse, Júlia, Monique, Ricardinho e Vinícius pelo carinho, respeito e consideração. A minhas primas irmãs, Kayllane “Kay”, por ser um doce, não comer camarão e arrasar no “Mortal Kombat”, e Isabella “Bella” por conhecer as Kardashians, assistir todos os high school musical, e sempre responder as minhas marcações nas redes sociais. Aos agregados, Lucas, Gabriel, “Biel”, Gabriel “pequeno” e a minha cachorra Aurora por serem uma parte importante da família.

Aos amigos queridos da escola, Ilma e Patrícia, por não me abandonarem na minha pior época. Também a Érica, Gilberto “Beto”, Hellysson “Da Pipoca”, Luan, Tawana, Williams “Will”, por serem especiais e “pra vida toda”. Agradeço as minhas amigas mais queridas da faculdade e da vida Isabella e Lethicia por serem tão especiais e presentes, além de Rayanne “Ray” independente do que estiver fazendo e o quanto tenha se afastado.

Aos amigos de vida feitos no espaço ciência, Aninha, Eduardo, Enatiely e a mais incrível de todas que é a Zenaide, agradeço pelo apoio incondicional e a torcida para que eu alcance meus objetivos.

Para a realização desse trabalho, durante os dois anos do curso, pessoas incríveis foram muito importantes para que esse resultado fosse alcançado.

Agradeço ao meu Orientador Dr. Elvis, por ser meu maior exemplo de profissional, por ter me aceitado sem me conhecer e ter me recebido em seu laboratório de maneira tão amigável, sem sua atuação e apoio eu não seria a pessoa que sou hoje, agradeço por tudo que tenho aprendido. A minha Co-orientadora Dra. Rebeca pela parceria e presença mesmo quando estava distante geograficamente, serei sempre muito grata pelo aprendizado e companheirismo que essa pesquisa me proporcionou.

Aos parceiros para a concretização desse estudo, a Prof^ª. Dra. Ana Mendonça da Radiobiologia da UFPE por ser presente e querida, sem mencionar o apoio e ensinamento, a Prof^ª Dra. Paloma da Histologia da UFPE que mesmo com sua agenda cheia, tirou dias para estudar sobre invertebrados e me passar todas as informações para que os resultados se concretizassem. Agradeço imensamente ao Prof. Dr. José Carlos da Malacologia da UFRPE, por dedicar um dia da sua agenda atarefada para me ensinar sobre anatomia de moluscos. Também ao laboratório de Dosimetria do CRCN-PE, por possibilitar a captura das imagens das células utilizadas nessa pesquisa e Jullyane e Laís por me ajudarem na tarefa.

Aos companheiros de jornada do laboratório de Radiobiologia, Alessandra, Douglas, Hassan, Hianna, João, Dra. Luana, Luís, Maíra, Maria Luíza e Williams, por terem sido sempre tão solícitos e amigáveis, além de proporcionarem os cafés mais divertidos. Aos técnicos do laboratório de Análise Ambiental do CRCN-PE, Ana Cláudia, Crescêncio, Gilberto e Márcia, pelo ambiente amigável e em especial a Alesxandro pelo auxílio no laboratório, pelas conversas, cafés e ensinamentos. Aos companheiros de curso Adriana, Cláudia, Daniel, Denilson, Emerson, Fernanda, Julyanne, Marcelo, Paulo, Thiago, em especial para Mariana, pelos melhores conselhos e ouvidos e Fabiano, pela amizade e companheirismo. Aos terceirizados do CRCN Margarete, Dona Ana e Bruno, por serem sempre cordiais e prestativos. Aos IC's mais simpáticos, Danielle, Jonas e Mechele, em especial a Karolayne por ter se tornado uma pessoa tão querida em pouco tempo e Thiago "Thiaguinho" por ser o rapaz mais empenhado em dar seu melhor que já conheci.

Aos membros da banca Dra. Ana Mendonça e Dra. Luana Silva, já mencionadas anteriormente, e a Dra. Mércia por se disponibilizarem a avaliar esse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia Energética e Nuclear – PROTEN, por me aceitar no seu quadro de alunos. Ao CNPq, por custear a mim e a pesquisa. Também as secretárias do Departamento de Energia Nuclear, as mais simpáticas e prestativas Nilvânia e Kalidja, por sempre nos ajudarem com prazos e informações. A todos, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Manguezais são ecossistemas costeiros sujeitos a grandes impactos antropogênicos, porém pouco se conhece a respeito da pressão ambiental exercida sobre a biota. Nesses ambientes, os agentes estressores podem intensificar a acumulação de substâncias químicas, induzir a mutagenicidade e causar alterações histológicas nos tecidos. Dentre os organismos, os moluscos terrestres como é o caso de *Littoraria angulifera* merecem atenção especial devido à possibilidade de emprego em estudos de monitoração da qualidade ambiental. Por isso, foi avaliada a distribuição de Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, P, S, Sr e Zn nas glândulas digestivas, gônadas e demais tecidos moles dos moluscos coletados em manguezal impactado do Espaço Ciência, em Olinda, a partir da Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) e de Absorção Atômica com Chama (FAAS). Desenvolvida neste trabalho, a técnica inovadora de extração da hemolinfa de *L. angulifera* permitiu a verificação de frequência de micronúcleos, binucleação e apoptose por meio da observação dos hemócitos. O estudo das principais alterações histológicas nos tecidos desses animais também foi realizado, comparando-se os resultados com os animais de manguezal menos impactado localizado no Município de Rio Formoso, Estado de Pernambuco. No manguezal do Espaço Ciência, Cu, Fe e Zn foram acumulados nas gônadas, glândulas digestivas e demais órgãos e tecidos em quantidades até 20 vezes superiores quando comparadas com os resultados dos animais de Rio Formoso. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias das frequências de micronúcleos e binucleação em nível de 95% de confiança nos hemócitos dos animais de ambos os manguezais. Contudo, maior frequência de células apoptóticas foi encontrada nos animais do manguezal do Espaço Ciência. Por meio dos estudos histológicos, detectou-se número elevado de parasitas nesses animais, sugerindo que a grande quantidade de Cu e Zn encontrada nos órgãos pode estar associada aos mecanismos de desinfestação. Todos os resultados obtidos demonstraram a aplicabilidade da espécie *Littoraria angulifera* para uma avaliação mais detalhada da qualidade ambiental de manguezais.

Palavras-chave: CARAMUJO; MANGUEZAL; EDXRF; FAAS; HISTOLOGIA; IMPACTOS AMBIENTAIS.

ABSTRACT

Mangroves are coastal ecosystems subjected to huge anthropogenic impacts, although little is known about the environmental pressure on the biota. In these environments, the stressor agents may intensify the chemical element accumulation, induce the mutagenicity and cause histological changes in tissues. Among the organisms, terrestrial mollusks such as *Littoraria angulifera* deserve a special attention due to its applicability in environmental quality monitoring studies. Therefore, the distribution of Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, P, S, Sr e Zn in the digestive glands, gonads and other soft tissues of mollusks collected in the impacted mangrove from the Espaço Ciência located in Olinda, Pernambuco State, Brazil, was assessed by means of the Dispersive Energy X-ray Fluorescence (EDXRF) and Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). Here, the novel hemolymph extraction technique for *L. angulifera* allowed verifying the micronuclei, binucleation and apoptosis frequencies through the hemocyte observation. The study of main histological changes on the animal tissues was also carried out, comparing the results to the animals from a more preserved mangrove, located in the Municipality of Rio Formoso, Pernambuco State, Brazil. In the Espaço Ciência mangrove, accumulation of Cu, Fe and Zn was found in the gonads, digestive glands and other soft tissues in quantities up to 20 times higher when compared to the results from Rio Formoso animals. No significant differences at the 95% confidence level between the average frequencies of micronuclei and binucleation were observed for the hemocytes of animals from both mangroves. However, a high frequency of apoptotic cells was found for animals from the Espaço Ciência mangrove. By means of histological studies, a high number of parasites was detected in these animals, suggesting that the high quantities of Cu and Zn found in the organs may be associated to the disinfestation mechanisms. All results demonstrated the applicability of *Littoraria angulifera* species for a more detailed evaluation of mangrove environmental quality.

Keywords: SNAIL; MANGROVE; EDXRF; FAAS; HISTOLOGY; ENVIRONMENTAL IMPACTS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | - Áreas originais dos biomas do brasileiros..... | 19 |
| Figura 2 | - Manguezais distribuídos mundialmente..... | 20 |
| Figura 3 | - Manguezais urbanos presentes no Complexo de Salgadoinho, Olinda, destacados em vermelho. A. Detalhe do Manguezal Chico Science. Em amarelo, o Parque Memorial Arcoverde..... | 22 |
| Figura 4 | - Estuário no Rio Ariquindá, em vermelho área de coleta ao lado da Ponte Rosalvo Ramos Rocha na porção pertencente ao município de Rio Formoso..... | 23 |
| Figura 5 | - Fauna bentônica de manguezais..... | 24 |
| Figura 6 | - Ilustração anatômica de molusco gastrópode..... | 26 |
| Figura 7 | - Divisões da concha do gastrópode <i>Achatina fulica</i> | 28 |
| Figura 8 | - Concha de <i>Littoraria angulifera</i> | 29 |
| Figura 9 | - Representação anatômica frontal de <i>Littoraria</i> sp..... | 29 |
| Figura 10 | - Sistema Biológico dos Elementos (SBE)..... | 32 |
| Figura 11 | - Excitação de átomo a partir de Raios-X..... | 36 |
| Figura 12 | - Funcionamento de um equipamento de FAAS..... | 37 |
| Figura 13 | - Fotomicrografia de células micronucleadas de <i>Mytilus galloprovincialis</i> | 38 |
| Figura 14 | - Fotomicrografia de tecido digestivo de <i>Crassostrea rhyzophorae</i> com setas indicando parasita da espécie <i>Nematopsi</i> sp..... | 40 |
| Figura 15 | - Localização geográfica dos manguezais de estudo..... | 42 |
| Figura 16 | - Procedimentos para preparação dos moluscos/ amostras..... | 43 |
| Figura 17 | - Remoção da concha de <i>L. angulifera</i> do Rio Formoso..... | 44 |
| Figura 18 | Equipamento EDX-720 para análise química por Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia..... | 46 |
| Figura 19 | - Cápsula de polipropileno específica para análise química por EDXRF..... | 47 |
| Figura 20 | - Tubos com amostra no equipamento de ultrassom..... | 48 |
| Figura 21 | Forno digestor Mars Xpress 5 CEM..... | 49 |
| Figura 22 | - Procedimentos de filtragem da amostra tratada quimicamente em forno digestor..... | 50 |
| Figura 23 | - Equipamento SpectrAA 220 da Varian/Agilent..... | 51 |
| Figura 24 | - Punção no molusco <i>L. angulifera</i> (A), com agulha de 25 mm (B), pelo sinus bucal para extração da hemolinfa..... | 52 |

| | |
|--|----|
| Figura 25 - Representação das metodologias do preparo da hemolinfa para deposição na lâmina..... | 53 |
| Figura 26 - Cortes histológicos de peças de moluscos. Peças emblocadas (A), micrótomo (B) e lâminas histológicas (C)..... | 54 |
| Figura 27 - Critérios de identificação de MN..... | 57 |
| Figura 28 - Gráfico de impressão digital dos órgãos dos animais coletados no Rio Formoso..... | 64 |
| Figura 29 - Impressão digital dos órgãos dos animais coletados no Espaço Ciência quanto à distribuição dos elementos químicos..... | 65 |
| Figura 30 - Impressão digital das gônadas de <i>L. angulifera</i> dos manguezais Espaço Ciência (EC) e do Rio Formoso (RF)..... | 66 |
| Figura 31 - Impressão digital de glândula digestiva das amostras do Espaço Ciência (EC) e Rio Formoso (RF)..... | 66 |
| Figura 32 - Impressão digital de elementos químicos nos demais órgãos e tecidos das amostras do Espaço Ciência (EC) e Rio Formoso (RF)..... | 67 |
| Figura 33 - Fotomicrografia de tipos de hemócitos encontrados em hemolinfa de <i>L. angulifera</i> | 69 |
| Figura 34 - Fotomicrografia de alterações celulares observadas durante ensaio de micronúcleo realizado em hemolinfa de <i>L. angulifera</i> | 69 |
| Figura 35 - Comparação entre a morfologia dos hemócitos de <i>L. angulifera</i> coletados nos manguezais do Rio Formoso (A) e do Espaço Ciência (B)..... | 70 |
| Figura 36 - Intervalo de confiança de Wald em nível de 95% de confiança..... | 73 |
| Figura 37 - Intervalo de confiança de Wilson em nível de 95% de confiança..... | 74 |
| Figura 38 - Fotomicrografia da gônada feminina de <i>L. angulifera</i> coletado em manguezal do Rio Formoso (A) e Espaço Ciência (B)..... | 75 |
| Figura 39 - Fotomicrografia do compartimento gametogênico de <i>L. angulifera</i> coletado em manguezal do Rio Formoso (A) e Espaço Ciência (B)..... | 76 |
| Figura 40 - Fotomicrografia do sistema digestivo de <i>L. angulifera</i> coletado em manguezal do Rio Formoso (A, B) e Espaço Ciência (C, D)..... | 77 |
| Figura 41 - Comparação entre a acumulação de Cu, Fe e Zn nos compartimentos biológicos de <i>Littoraria angulifera</i> do Espaço Comparação..... | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | - Acumulação de elementos químicos em órgãos/tecidos de invertebrados empregados como biomonitores..... | 34 |
| Tabela 2 | - Total de indivíduos por amostra, total de amostras e amostras compostas analisadas para a quantificação de elementos químicos em <i>L. angulifera</i> . RF = manguezal do Rio Formoso. EC = manguezal do Espaço Ciência..... | 45 |
| Tabela 3 | - Valores obtidos e certificados (mg kg^{-1}), incertezas analíticas expandidas para 95% de confiança e valores de Número E_n para os materiais de referência analisados por EDXRF e FAAS..... | 61 |
| Tabela 4 | - Concentrações médias (M) dos elementos químicos em mg kg^{-1} , desvio padrão (DP), número de amostras (n) e incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança para as amostras de gônada – G, glândula digestiva – GD e demais órgãos e tecidos – DOT dos animais dos manguezais do Rio Formoso – RF e do Espaço Ciência – EC..... | 62 |
| Tabela 5 | - Frequência de alterações encontradas nos hemócitos de <i>L. angulifera</i> dos espécimes do Rio Formoso (RF) e do Espaço Ciência (EC)..... | 71 |
| Tabela 6 | - Resultados do intervalo de confiança em nível de 95% de confiança (IC95%) coeficiente de variação (CV%) e tamanho mínimo de amostra (n^*) para as variáveis micronúcleo - MN, binucleação - BN e apoptose – AP..... | 72 |
| Tabela 7 | - Concentrações máximas de elementos químicos (mg kg^{-1}) em manguezais..... | 78 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- AP** - apoptose
- BN** - binucleação
- c** - citoplasma
- cdg** - célula digestiva
- cei** - célula do epitélio intestinal
- Cg** - compartimento gametogênico
- CLGM** - Células da Linhagem Gametogênica Masculina
- DOT** - Demais Órgãos e Tecidos
- EC** - Espaço Ciência
- EDXRF** - Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia
- FAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
- G** - gônada
- gr** - grânulo
- GD** - glândula digestiva
- L** - lúmen
- MN** - micronúcleo
- n** - núcleo
- Ovo** - ovócito
- p** - parasita
- ps** - pseudópodes
- sp** - esperma
- RF** - Rio Formoso
- Seta F** - folículo
- Seta M** - paraesperma
- TGD** - Túbulo de Glândula Digestiva
- v** - vacúolo
- Vs** - vesícula seminal

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 18 |
| 2.1 | Biomassas brasileiros..... | 18 |
| 2.2 | Manguezais..... | 19 |
| 2.2.1 | Manguezais pernambucanos..... | 21 |
| 2.3 | Fauna de invertebrados do manguezal..... | 23 |
| 2.3.1 | Moluscos..... | 24 |
| 2.3.1.1 | Gastrópodes..... | 27 |
| 2.3.1.2 | <i>Littoraria angulifera</i> (Lamarck,1822)..... | 28 |
| 2.4 | Estudos ambientais utilizando moluscos gastrópodes..... | 30 |
| 2.4.1 | Acumulação de elementos químicos: biomonitoração..... | 30 |
| 2.4.1.1 | Definições..... | 30 |
| 2.4.1.2 | Uso de elementos químicos por organismos..... | 31 |
| 2.4.1.3 | Moluscos como bioindicadores/biomonitores de qualidade ambiental..... | 32 |
| 2.4.1.4 | Bioacumulação de elementos químicos em órgãos de invertebrados..... | 33 |
| 2.4.2 | Técnicas analíticas em matrizes biológicas..... | 35 |
| 2.4.2.1 | Espectrometria de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF)..... | 35 |
| 2.4.2.2 | Espectrômetro de absorção atômica por Chama (FAAS)..... | 36 |
| 2.4.3 | Avaliação da mutagenicidade pelo teste do micronúcleo..... | 38 |
| 2.4.4 | Alterações histológicas e morfológicas..... | 39 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 41 |
| 3.1 | Descrição das áreas de estudo..... | 41 |
| 3.1.1 | Manguezal Espaço Ciência..... | 41 |
| 3.1.2 | Manguezal Rio Formoso..... | 41 |
| 3.2 | Amostragem..... | 42 |
| 3.3 | Procedimentos de laboratório para preparação das amostras..... | 43 |
| 3.3.1 | Dissecação dos animais..... | 43 |
| 3.4 | Análise química..... | 44 |
| 3.4.1 | Preparação das amostras..... | 44 |
| 3.4.2 | Análise química por EDXRF..... | 45 |
| 3.4.3 | Tratamentos químicos..... | 47 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.4.3.1 | Banho de ultrassom..... | 47 |
| 3.4.3.2 | Forno digestor..... | 49 |
| 3.4.4 | Análise química por FAAS..... | 50 |
| 3.5 | Extração da hemolinfa para teste do micronúcleo..... | 51 |
| 3.6 | Preparo das lâminas histológicas..... | 54 |
| 3.7 | Análise dos resultados..... | 55 |
| 3.7.1 | Análises químicas..... | 55 |
| 3.7.1.1 | Incerteza analítica..... | 55 |
| 3.7.1.2 | Qualidade do Procedimento analítico..... | 55 |
| 3.7.2 | Análise de hemócitos..... | 56 |
| 3.7.2.1 | Critérios para identificação de células micronucleadas..... | 56 |
| 3.7.2.2 | Intervalos de confiança para a frequência de variáveis relacionadas com a mutagenicidade em <i>L. angulifera</i> | 57 |
| 3.7.2.3 | Tamanho mínimo de amostra ou suficiência amostral..... | 58 |
| 3.7.3 | Alterações histológicas..... | 59 |
| 4 | RESULTADOS DISCUSSÃO..... | 60 |
| 4.1 | Elementos químicos em órgãos de <i>L. angulifera</i>..... | 60 |
| 4.1.1 | Demonstração da qualidade dos procedimentos analíticos..... | 60 |
| 4.1.2 | Variabilidade das concentrações de elementos químicos determinados nos órgãos de <i>L. angulifera</i>..... | 61 |
| 4.1.3 | Impressões digitais (<i>fingerprints</i>) dos órgãos estudados de <i>L. angulifera</i>..... | 64 |
| 4.2 | Mutagenicidade em <i>L. angulifera</i> de diferentes manguezais..... | 67 |
| 4.2.1 | Otimização na obtenção das lâminas de hemócitos..... | 68 |
| 4.2.2 | Resultados de mutagenicidade..... | 70 |
| 4.3 | Resultado da análise histológica..... | 75 |
| 4.4 | Comparação entre as concentrações dos elementos químicos quantificados em <i>L. angulifera</i> de manguezais de Pernambuco..... | 78 |
| 4.5 | Efeitos biológicos da acumulação de Cu, Fe e Zn sobre <i>L. angulifera</i>..... | 80 |
| 5. | CONCLUSÕES..... | 83 |
| 6. | PERSPECTIVAS..... | 84 |
| 7. | REFERÊNCIAS..... | 85 |

1. INTRODUÇÃO

Em ambientes impactados, devido às alterações na disponibilidade de recursos, moluscos tendem a absorver altas concentrações de elementos químicos, a partir do fenômeno denominado de bioacumulação (AL-SUBIAI et al., 2011). Estudos investigando a bioacumulação de substâncias químicas são capazes de relacionar os impactos sofridos pelo ambiente às respostas biológicas a partir de estudos de biomonitoração da qualidade ambiental (MARKERT, 1991; PHILLIPS; RAINBOW, 2013). Os organismos biomonitores, permitem quantificar a qualidade ambiental, além de associar a alteração da composição química no seu organismo às principais fontes antropogênicas de elementos químicos (MARTIN; COUGHTREY, 1982; MARKERT, 1991; MARKERT, 2000). Assim, para a biomonitoração são utilizadas espécies de moluscos com maior resistência à toxicidade das substâncias químicas.

As consequências da exposição dos animais a compostos químicos presentes no ambiente podem ser também estudadas por meio de alterações em funções biológicas básicas como sobrevivência e reprodução. Dentre os diversos marcadores biológicos possíveis de avaliação em organismos coletados de ambientes impactados, a presença de alterações no material genético dos organismos tem sido utilizada para moluscos, avaliando-se os impactos ambientais sofridos pelas espécies (FENECH; MORLEY, 1985; DEPLEDGE, 1998; NAKANO et al., 2003; REGOLI et al., 2006; TALLARICO et al., 2014).

Dentre os ensaios biológicos mais utilizados em estudos desse tipo, encontra-se o teste do micronúcleo, caracterizado por sua fácil execução e rapidez de análise, quando comparado a outras técnicas empregadas para avaliação de mutações genéticas (SILVA, 2010; PINHEIRO et al., 2013). Esse teste consiste na análise de células de organismos e quantificação da frequência de alterações como a micronucleação, binucleação e apoptose (FLORES; YAMAGUSHI, 2008). Os protocolos adaptados para estudos mutagênicos, como o teste do micronúcleo, para moluscos ainda são escassos, considerando-se a alta diversidade de espécies.

Outra forma de observar os impactos ambientais nos organismos está na análise de lâminas histológicas para a avaliação de danos nos tecidos dos animais. Essa técnica não é bastante difundida em moluscos terrestres, sendo escassos estudos tanto naqueles de áreas impactadas quanto não impactadas. Alterações na glândula digestiva foram observadas em moluscos marinhos, indicando esse órgão como sensível a poluentes nesse ambiente (USHEVA et al. 2006). Dessa forma devido a escassez de trabalhos com moluscos terrestres

abordando testes mutagênicos e histológicos, torna-se altamente relevante os estudos envolvendo esses organismos em estudos ambientais.

Os moluscos em sua riqueza de espécies e características anatômicas e fisiológicas, estão sendo utilizados em estudos ambientais como biomonitores passivos (CAETANO; ABRASÃO, 2002; OEHLMANN; OEHLMANN, 2003; FERREIRA-JR et al., 2014). O gastrópode prosobrânquio *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822), da família Littorinidae, que habita manguezais de continentes americanos (WORMS, 2014), tem sido utilizados para a monitoração ambiental (MELO et al., 2012; MÉLO, 2014; RIBEIRO, 2013) a partir de sua capacidade de acumulação de elementos químicos relacionada com a presença de impacto antropogênico em manguezais (MÉLO, 2014).

Para corroborar a aplicação de *L. angulifera* como biomonitora de qualidade ambiental de manguezais, o presente trabalho tem como objetivos:

- ✓ Comparar as concentrações de Cl, Cu, Fe, K, Mg, P, S, Sr e Zn determinadas por Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia - EDXRF e por Espectrometria de Absorção Atômica – AAS nos órgãos glândula digestiva e ovoteste, assim como nos demais órgãos e tecidos de animais coletados nos manguezais do Espaço Ciência e do Rio Formoso,
- ✓ Otimizar técnica de extração de hemolinfa para a realização de ensaios de biomarcadores em moluscos terrestres;
- ✓ Quantificar a mutagenicidade sofrida pelos animais coletados no manguezal do Espaço Ciência, em Olinda, comparado com os exemplares do manguezal de Rio Formoso, em Rio Formoso,
- ✓ Comparar danos histológicos em mesmo tecido de diferentes exemplares de *L. angulifera* coletados em Rio Formoso e Espaço Ciência.

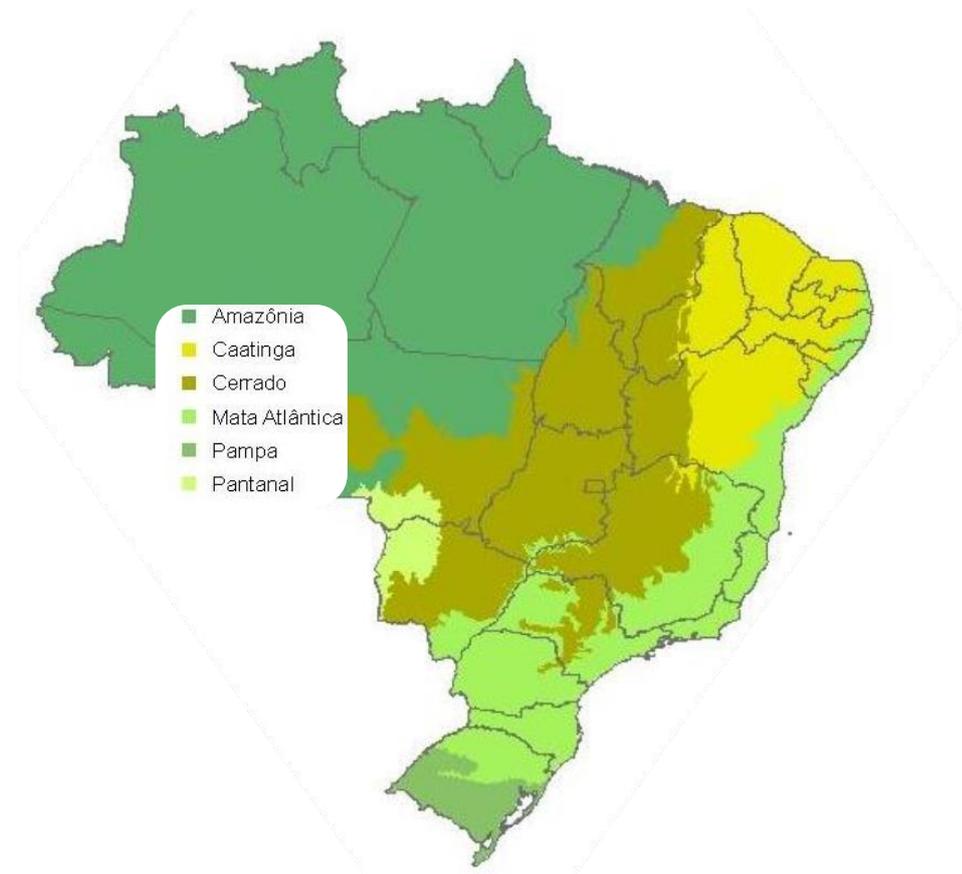
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomas brasileiros

Segundo Ricklefs (2009), Bioma é definido como uma forma de agrupar semelhantes fitofisionomias com o objetivo de facilitar a comparação entre os mais características ecossistemas e comunidades. No Brasil, os biomas são Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pampa, Pantanal e Mata Atlântica como mostra a Figura 1 (BALBINO et al., 2012). Em todos esses, os impactos são impulsionados principalmente pelo desenvolvimento da civilização, resultando em atividades como a monocultura, a pecuária e a expansão imobiliária (DEAN, 1996). Com isso, a supressão e a fragmentação de habitat, eutrofização e extinção de espécies continuamente afeta todos os níveis tróficos (ODUM, 2012).

A Mata Atlântica é um dos biomas de maior biodiversidade, com apenas 15% de sua cobertura vegetal original remanescentes (HIROTA, 2015). Estando inseridos em seu território, de acordo com o Decreto Federal nº 750 de 10-02-93, art. 3º, a Floresta Ombrófila Densa Atlântica, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, Manguezais, Restingas, Campos de Altitude, Brejos Interioranos e Encravos Florestais do Nordeste (BRASIL, 1993). Dentre esses, o manguezal apresenta maior impacto antropogênico, com maior necessidade de cuidados quanto a sua conservação (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

Figura 1- Áreas originais dos biomas brasileiros



Fonte: Adaptado de Serviço Florestal Brasileiro (2004).

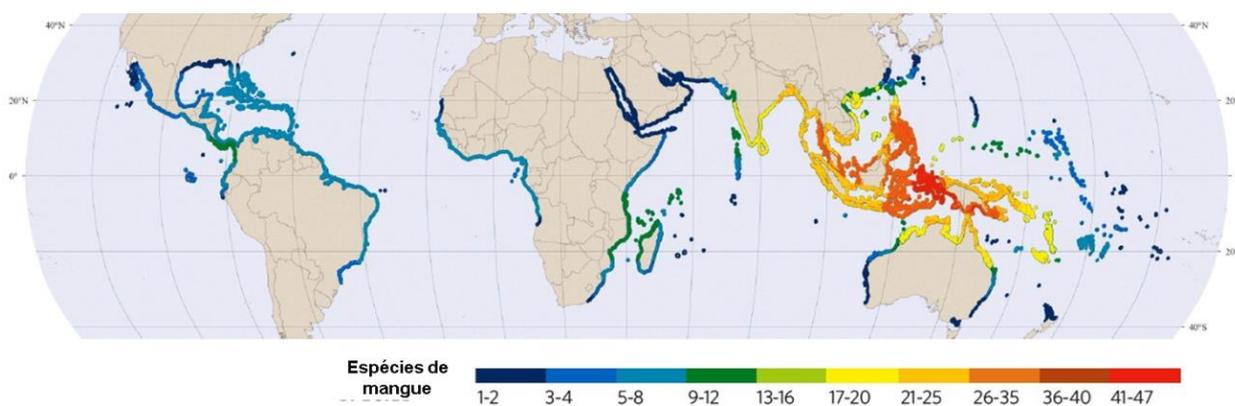
2.2 Manguezais

Segundo Vanucci (2002), o nome manguezal é originário na língua Wolof, nativa do Senegal. A atribuição à língua latina só aconteceu pelo contato desses povos com os portugueses durante a colonização. Segundo registros paleontológicos, as espécies de fauna e flora desse ecossistema são originárias da região Indo-Malasiana, datando dos períodos Terciário e Quaternário (SPALDIN et al., 1997). Atualmente, os manguezais são característicos de regiões próximas aos trópicos, presentes em áreas de transição entre rios e oceanos (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

É classificado como ecossistema, devido à interação de seus componentes bióticos e abióticos em um determinado espaço temporal como um sistema aberto dotado de fontes de entradas e saídas para ciclagem de nutrientes, sendo apto a harmonizar-se diante desequilíbrios numa busca pela homeostasia (ODUM, 2012). Esse ecossistema encontra-se

globalmente distribuído em 15,2 milhões de hectares em 123 territórios (SANDILYAN; KATHIRESAN, 2012), como é ilustrado na Figura 2. Na Costa Brasileira, percorrem aproximadamente 6.800 km (KJERVE; LACERDA, 1993), ou seja, desde Santa Catarina (Laguna, 28°53'S) até o Amapá (Rio Oiapoque, 04°20'N) (SCHAEFFER-NOVELLI, 1989). Esses ecossistemas são exportadores de matéria orgânica para estuários, desempenhando um importante papel para a produtividade primária da zona costeira, assim como para manutenção da biodiversidade marinha (JENNERJAHN, ITTEKKOT, 2002).

Figura 2- Manguezais distribuídos mundialmente.



Fonte: Adaptado de Spalding et al (1997).

Embora reconhecidamente importantes, os ecossistemas de mangues encontram-se poluídos e com área reduzida na maior parte dos estados brasileiros (SILVA, 2011; ALONGI, 2015). Um ecossistema de manguezal localizado em áreas fortemente impactadas é denominado por alguns autores como manguezal urbano (BRANDÃO et al., 2009). Segundo Schaeffer-Novelli (1995), a urbanização do ecossistema manguezal foi facilitada por sua localização, disponibilidade para deposição de resíduos sanitários, agrícolas e industriais e expansão imobiliária, além da proximidade de portos.

É um ecossistema distinto, com flora adaptada a condições de estresse constantes como a ausência de suporte rígido devido ao substrato lamoso, a alta concentração de sais e a baixa oxigenação (ONG; GONG, 2013). Como consequência desses fatores, é possível ser observado, em todo o mundo, 73 espécies de árvores e arbustos de mangue; dessas, apenas 8 ocorrem no Brasil (SANDILYAN; KATHIRESAN, 2012).

A fauna é composta de espécies nativas e migratórias que utilizam os manguezais como área reprodutiva (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). Os fungos estão presentes no solo e auxiliam na decomposição da matéria orgânica (CHENG et al., 2009). A fauna zooplanctônica é diversificada, enquanto os invertebrados compreendem espécies de potencial econômico como alguns moluscos, crustáceos e peixes, além de ser uma área utilizada para carcinicultura e maricultura (SANTOS et al., 2006).

2.2.1 Manguezais pernambucanos

Por despertarem o interesse da comunidade científica, devido à localização próxima a áreas metropolitanas e agrícolas, alguns estudos relacionados a impactos ambientais vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos nos manguezais do complexo de Salgadinho (CUNHA; GUIMARÃES, 2000; FIGUEIREDO et al., 2003; MÉLO, 2014) e Rio Formoso (CPRH, 1998; VASCONCELOS et al., 2004; SILVA et al., 2009; MÉLO, 2014). Entretanto, dada à situação atual dos manguezais pernambucanos, a quantidade de estudos ainda é incipiente.

De acordo com Brandão et al. (2009), em 2002, o complexo de Salgadinho, localizado entre os municípios de Olinda e Recife, possuía área de vegetação de mangue correspondente a 46.526,7 m² com área de espelho d'água medindo 24.626,2 m². Nessa região, atualmente, encontram-se distribuídos quatro ilhas de manguezais urbanos (Figura 3), formadas por terraplenagem realizado na região nos anos 70 pela construção do Complexo Viário de Salgadinho (CUNHA; GUIMARÃES, 2000). Nessa área, destaca-se o manguezal Chico Science (A), influenciado indiretamente pelo canal do Derby – Tacaruna e classificado atualmente como a maior da ilha de manguezais urbanos do Parque Memorial Arcoverde (FIGUEIREDO et al., 2003).

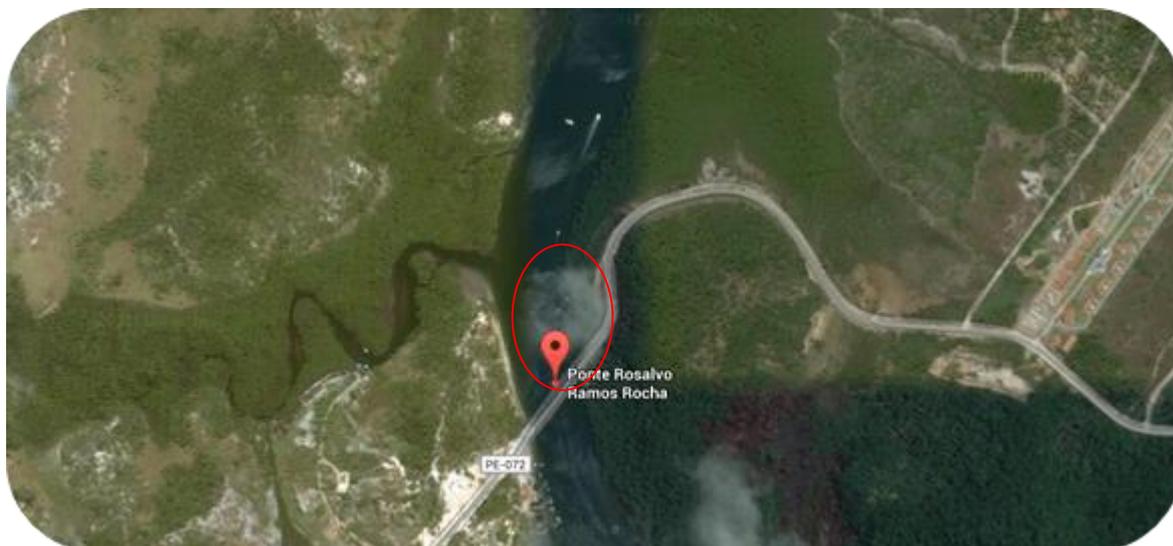
Figura 3 - Manguezais urbanos presentes no Complexo de Salgadinho, Olinda, destacados em vermelho. A, Detalhe do Manguezal Chico Science. Em amarelo, o parque Memorial Arcoverde.



Fonte: Brandão et al. (2009).

O estuário do Rio Formoso, se comparado com o manguezal Chico Science, possui características ambientais contrastantes em termos da acumulação de substâncias químicas em solos (PAIVA et al., 2015) e na vegetação (PAIVA, 2014). Situado na microrregião geográfica da Mata Meridional de Pernambuco, possui área aproximada de 2.724 hectares com 12 km de extensão (SILVA et al., 2009). O sistema fluvial do Município de Rio Formoso é composto pelos rios: Ariquindá (Figura 4), dos Passos, Formoso e Lemenho, no qual 80% do estuário compreende o manguezal em questão (VASCONCELOS et al., 2004). O Município de Rio Formoso possui parte de seu território incluído na Área de Proteção Ambiental (APA) de Guadalupe, que além de regulamentar a exploração, incentiva o ecoturismo e a conservação da biodiversidade (CPRH, 1998).

Figura 4 - Estuário no Rio Ariquindá, em vermelho área de coleta ao lado da Ponte Rosalvo Ramos Rocha na porção pertencente ao município de Rio Formoso.

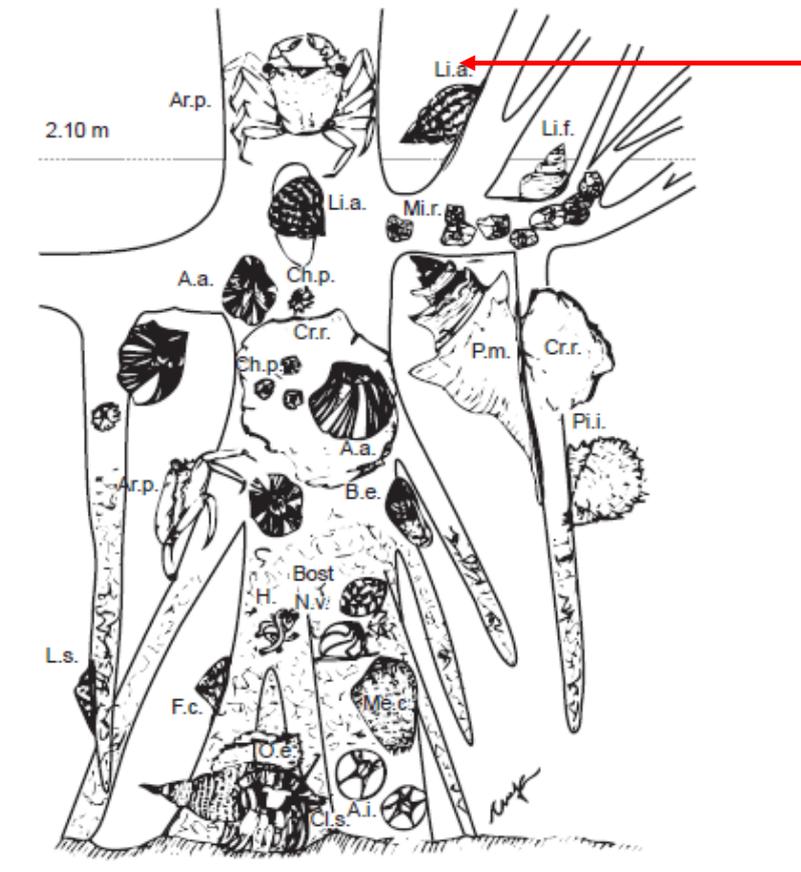


Fonte: Adaptado de Google Maps (2016)

2.3 Fauna de invertebrados do manguezal

De acordo com Levinton (2001), os manguezais são habitados por vários invertebrados constituintes da macrofauna bentônica, ou seja, organismos retidos em malha de coleta com 0,5 mm de abertura. Na Figura 5 são mostradas algumas espécies de invertebrados, presentes em grande abundância nos manguezais (ADAMS, 2000).

Figura 5 - Fauna bentônica de manguezais. A.a. = *Amphibalanus amphitrite*. A.i. = *Amphibalanus improvisus*. Ar.p. = *Aratus pisoniie*. B.e. = *Brachidontes exustus*. Bost = *Bostrychietum*. Ch.p. = *Chthamalus proteus*. Cl.s. = *Clibanarius sclopetarius* na concha de *Cerithium atratum*. Cr.r. = *Crassostrea rizophorae*. F.c. = *Fissurella clenchi*. H. = Tubos de poliquetus *Hydroides* sp. L.s. = *Lottia subrugosa*. Li.a. = *Littoraria angulifera*. Li.f. = *Littoraria flava*. Me.c. = *Melampus coffea*. Mi.r. = *Microeuraphia rizophorea*. N.v. = *Neritina virginea*. O.e. = *Ostrea equestris*. P. i. = *Pinctada imbricata*. P.m. = *Pugilina morio*.



Fonte: Farrapeira et al. (2009).

Estudos realizados com a fauna de manguezais qualificam entre os seres bentônicos mais abundantes nesse ecossistema os filos Mollusca e Crustacea, em que Mollusca possui a maior riqueza de espécies (OEHLMANN; OEHLMANN, 2003; FARRAPEIRA et al., 2009, FERREIRA-JR et al., 2014).

2.3.1 Moluscos

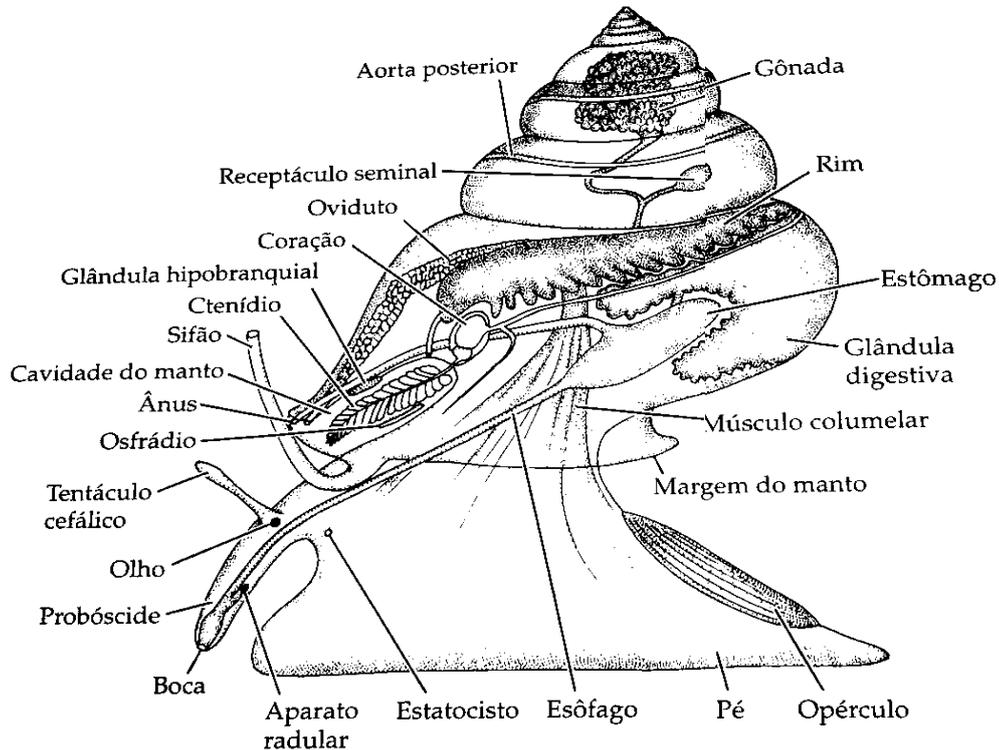
Moluscos são o segundo maior filo de invertebrados, com primeiro registro fóssil datado do Período Cambriano (entre 542 e 488 milhões de anos atrás). Estão divididos em sete

principais classes, sendo as mais representativas os Bivalvia, Cephalopoda e Gastropoda. Bivalves são necessariamente aquáticos de água doce e salgada; a classe dos Cefalópodes é formada por espécimes marinhos, enquanto a dos Gastrópodes é a mais diversificada com espécimes que habitam os mais variados tipos de ambiente. Esta classe merece destaque no filo Mollusca por possuir a maior quantidade de espécies não extintas. As cinco classes com menor riqueza, isto é, Aplacophora, Monoplacophora, Poliplacophora e Scaphopoda, são exclusivamente de habitat marinho (LEME, 1995; RUPERT et al., 2005).

Como característica anatômica geral, os representantes do filo possuem circulação aberta (exceção: cefalópodes), são bilateralmente simétricos, protostômios e celomados restritos ao coração, gônadas, intestino e rim. Apresentam conchas externas ou internas e genericamente, são compostos por pé, massa visceral, manto ou pálio e concha (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Quanto à funcionalidade de seus órgãos e tecidos, podem ser observados nos moluscos pares de músculos retratores podais inseridos em cada lado do pé, que são utilizados para movimentar a concha para baixo, posicionando-a acima do animal. A cavidade do manto é a região entre a concha e o manto, onde se alojam as brânquias (ctenídios). Alimentam-se a partir da raspagem pela rádula e a digestão do alimento ocorre no meio intracelular das células dos tubos distais e extracelular na região gástrica. Contudo, a digestão intracelular é o principal mecanismo dos moluscos menos evoluídos. De forma generalizada, são dioicos com a gônada inserida ao lado do pericárdio. O pericárdio, ou cavidade celômica, é pequeno e localizado na região meio-dorsal do corpo. Os órgãos sensoriais comuns são os tentáculos, os olhos, os estatocistos (órgãos de equilíbrio) e os osfrádios órgãos quimiorreceptores (RUPERT; et al., 2005). Na Figura 6 são ilustrados os principais órgãos de um gastrópode típico.

Figura 6 – Ilustração anatômica de molusco gastrópode.



Fonte: Brusca e Brusca (2007).

Os moluscos utilizam a hemolinfa como principal meio de transporte de substâncias no corpo, cuja coloração depende da associação dos elementos químicos Fe ou Cu ao oxigênio. Ficando vermelha quando associado ao Fe, o pigmento respiratório é denominado hemoglobina e azul quando associado ao cobre, sendo chamado de hemocianina (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). Devido à anatomia celomática, além de realizar as funções de sangue e linfa, a hemolinfa também é componente principal no mecanismo de locomoção “músculo-hidráulico”, o movimento do animal acontece por expansão e retração a partir do aumento da pressão hidráulica e contração muscular (LEME, 1995). Ainda, a hemolinfa possui em sua composição células denominadas hemócitos, que diferem quanto à sua morfologia e funções. Quando os hemócitos apresentam baixo número de lisossomos e pseudópodes poucos ou ausentes, são denominados hialinócitos, responsáveis pela fagocitose de material estranho ao corpo dos gastrópodes. Todavia, quando essas células apresentam número mais elevado de

lisossomos e presença de pseudópodes, esses, são classificados como granulócitos (VAN DER KNAAP; LOKER 1990), associados ao estresse ambiental (ROHR; AMATO, 2014).

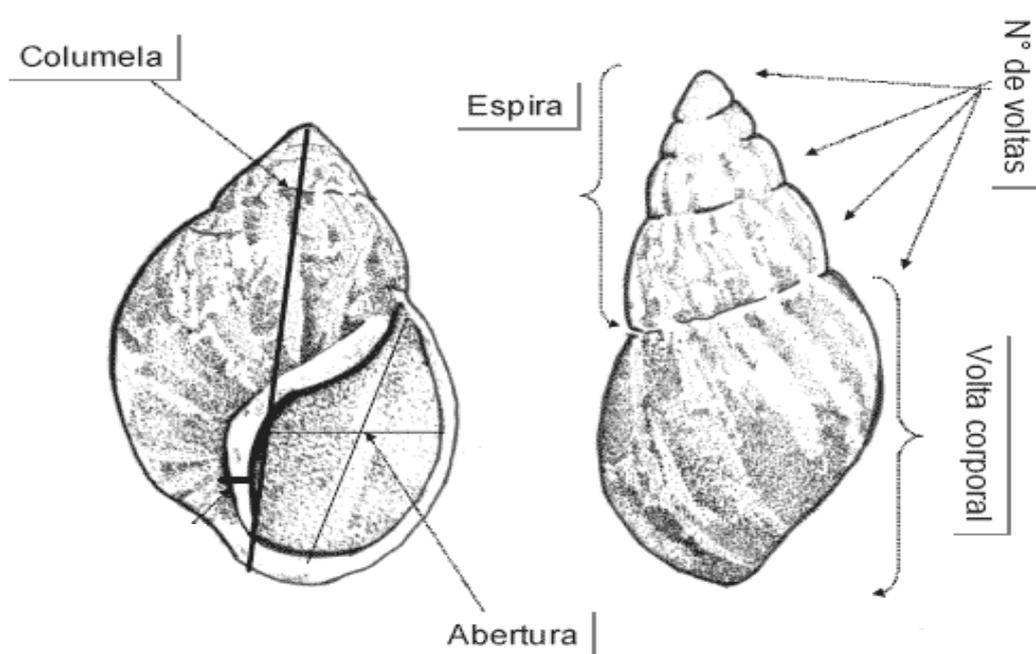
2.3.1.1 Gastrópodes

Os gastrópodes compõem a classe com maior diversidade de espécies descritas do filo Mollusca. Além disso, é a classe de maior sucesso evolutivo por terem ocupado os mais diversos habitats. Morfologicamente, apresentam o corpo torcido composto por uma concha espiralada “encaixada” tubularmente ou em forma de capuz com funções de proteção contra predadores e abrigo (RUPERT et al., 2005). Seus representantes são popularmente descritos como lesmas, caracóis, e caramujos, dependendo da sua interação com a água (NAVARRO; DOMINGUEZ, 2009).

As diferentes características de seu aparelho respiratório, permite que os gastrópodes sejam classificados em prosobrânquios, opistobrânquios e pulmonados (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Os opistobrânquios respiram por meio de uma única brânquia localizada atrás do coração e são, em sua maioria, marinhos. Já os pulmonados, se aquáticos, precisam emergir para respirar, pois sua respiração acontece pela cavidade pulmonar, que é uma modificação evolutiva da cavidade do manto. Por outro lado, os prosobrânquios respiram por meio de brânquias e apresentam um opérculo calcário ou córneo, com a função de fechar a cavidade da concha quando o seu corpo se retrai, auxiliando nas trocas gasosas (LEME, 1995).

As conchas desses animais podem ser espiraladas para direita ou para esquerda, com estruturas internas em formato laminar, denominadas lamelas (lâminas), resultantes da deposição de carbonatos dentro da concha. Os gastrópodes se fixam às suas conchas por meio do músculo columelar, resultado da evolução do par de músculos retratores, com função de unir a parte mole do animal à estrutura interna centralizada às voltas da concha, denominada columela. Isto possibilita a retração da cabeça e do pé para o interior da concha (RUPERT et al., 2005). Na Figura 7 são mostradas as principais divisões da concha de um gastrópode.

Figura 7 - Divisões da concha do gastrópode *Achatina fulica*.



Fonte: Adaptado de Fischer e Colley (2005)

2.3.1.2 *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822)

A espécie *L. angulifera* pertence à família Littorinidae. O primeiro fóssil associado a manguezais foi datado do baixo e médio Eoceno, entre 34 a 40 milhões de anos atrás (REID, 1989). Esse gênero, *Littoraria*, antes denominado *Litorinopsis* tem como habitat o Atlântico Oriental e Ocidental (REID, 1989). Filogeneticamente foi descrito por Reid et al. (2010) e o ancestral comum, mais próximo da espécie *L. angulifera*, data do período Oligoceno, isto é, cerca de 23 a 34 milhões de anos atrás.

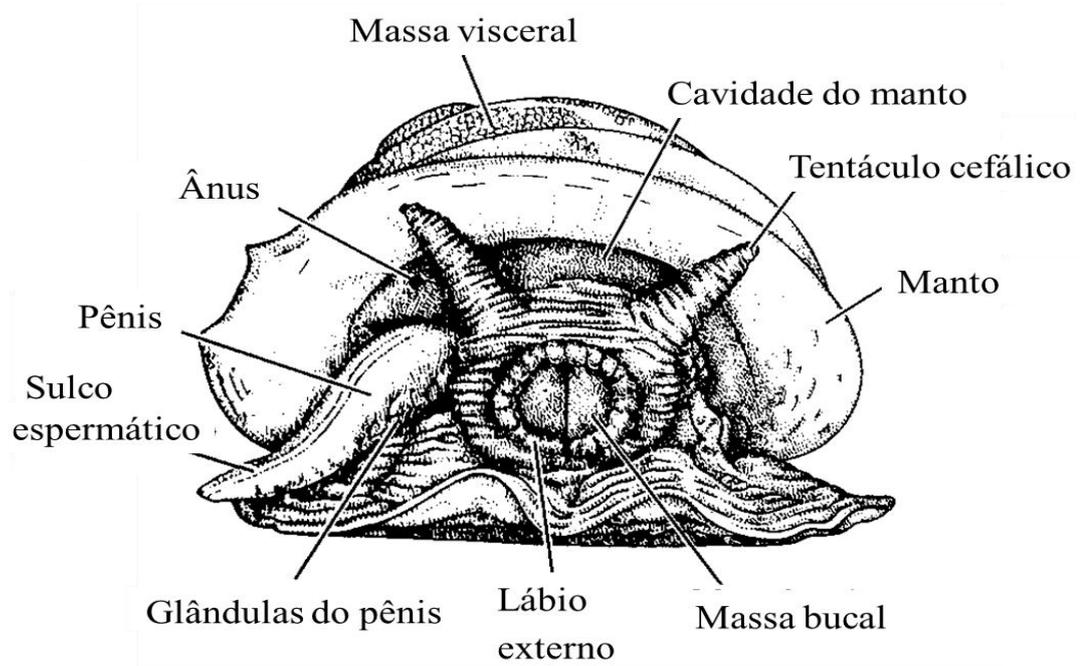
Anatomicamente, os indivíduos possuem concha em espiral cônica, com seis a oito voltas e abertura em formato oval. De acordo com Mathews-Cascon e Lotufo (2006), a concha mede aproximadamente 30 mm em adultos, com coloração variando de marrom a laranja (Figura 8). Possui lábios interno liso e externo fino, seus olhos estão na base dos tentáculos e apresenta dimorfismo sexual, em que o pênis do macho está alocado do lado direito da cabeça, próximo ao tentáculo, posicionado anteriormente ao ânus. Nas fêmeas, na mesma região, que se apresenta o pênis do macho, está o poro genital conforme mostrado na Figura 9 (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Figura 8 - Concha de *Littoraria angulifera*



Fonte: A autora

Figura 9 - Representação anatômica frontal de *Littoraria sp.*



Fonte: Brusca e Brusca (2007).

Quanto à reprodução, *L. angulifera* se assemelha aos demais representantes da família Littorinidae, com fecundação interna e desenvolvimento larval completo. Porém, como característica marcante do gênero, possui a condição de ser ovovivípara incompleta. Assim, retém os ovos até o estágio larval veliger ou de vida livre e os libera durante a maré alta (GALLAGHER; REID, 1974; GUTIERREZ, 1988).

Os adultos são encontrados principalmente em manguezais, nas raízes, galhos e folhas das espécies arbóreas *Rhizophora mangle* L., *Avicenia sp.* e *Laguncularia racemosa* L. (REID, 1985). Segundo Gutierrez (1988), a brânquia pouco desenvolvida de *L. angulifera* e o epitélio vascularizado para maior absorção de oxigênio do ar proporcionam baixa resistência à submersão. Quanto aos predadores dessa espécie, os principais são as aves, os crustáceos, as moscas parasitas e os peixes (REID, 1985).

Seu comportamento é aparentemente arborícola, alimentando-se de fungos livres ou infestantes de plantas (KOHLMEYER; BEBOUT, 1986). Silva (2005) observou uma alteração na rádula, justificando como uma possível consequência da mudança na dieta influenciada pelo habitat do animal. Seu hábito alimentar é a principal via de absorção das várias substâncias em seu organismo.

2.4 Estudos ambientais utilizando moluscos gastrópodes

2.4.1 Acumulação de elementos químicos: Biomonitoração

2.4.1.1 Definições

Seres vivos inseridos em ambientes poluídos tendem a acumular elementos químicos em seu organismo como reflexo da disponibilidade de substâncias químicas em sedimentos, água ou atmosfera (MARKERT, 1991; OEHLMANN; OEHLMANN, 2003). Assim, as espécies são denominadas bioacumuladoras e podem ser utilizadas para fins de biomonitoração ambiental (PHILLIPS; RAINBOW, 2013). No entanto, os bioindicadores são os seres vivos, nos quais a abundância, riqueza e distribuição, entre outros aspectos populacionais qualitativos e quantitativos são influenciados por mudanças nas condições ambientais. Assim, alterações no seu comportamento ou mesmo sua extinção local são utilizados para identificação de áreas impactadas (MARTIN; COUGHTREY, 1982; DALLINGER, 1994). Essas espécies possuem um padrão de distribuição ambiental de acordo com seu nível de

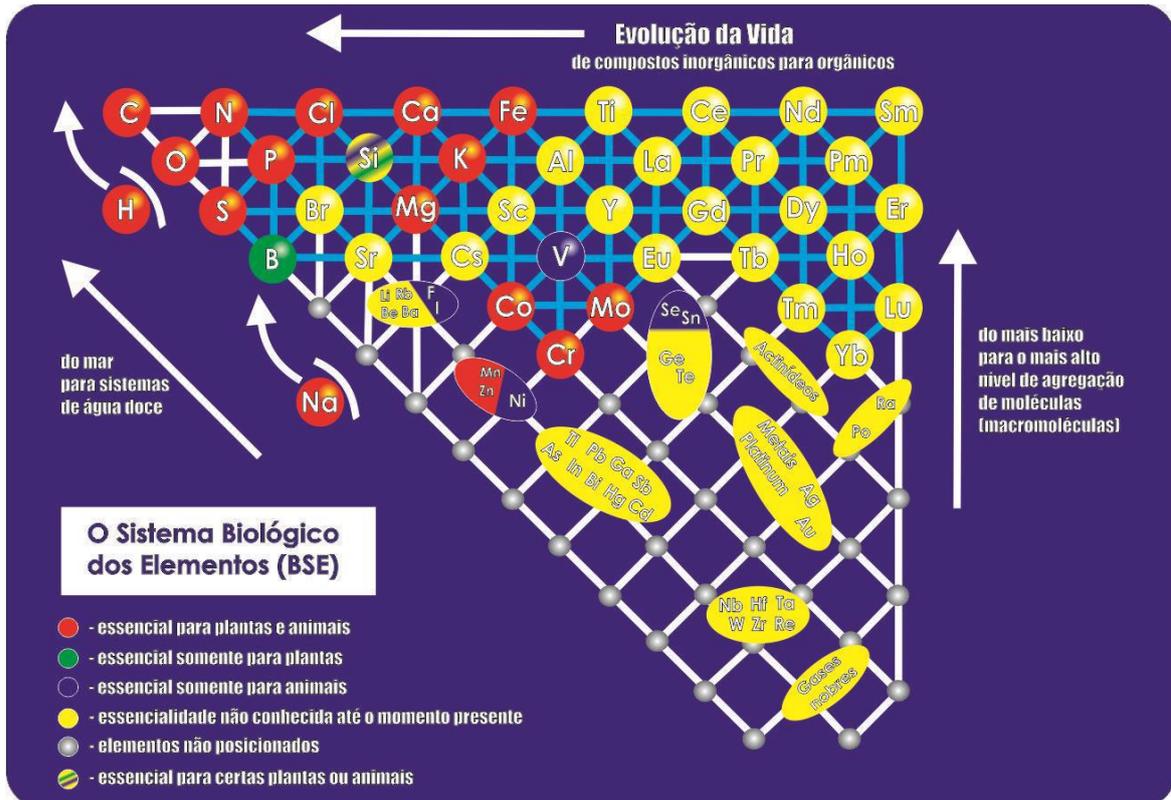
tolerância à contaminação. É dessa forma, para os estudos de bioindicação são utilizadas espécies mais sensíveis a fatores de estresse.

Para biomonitoração, são utilizadas espécies para obter os resultados quantitativos sobre a qualidade do ambiente, podendo ser realizada de forma passiva e ativa. A ativa acontece por meio da exposição de indivíduos criados em cativeiro a ambientes contaminados, enquanto a biomonitoração passiva emprega espécimes “in situ”. O processo de biomonitoração é iniciado e, por meio de medidas temporais, substâncias químicas e poluentes, podem ser monitoradas diretamente no tecido do organismo biomonitor. Estas técnicas tornam-se bastante atrativas por terem baixo custo e por utilizar a própria informação contida na biodiversidade para a preservação da qualidade ambiental, principalmente no caso da biomonitoração passiva (FRANÇA, 2006).

2.4.1.2 Uso de elementos químicos por organismos

O sucesso das técnicas de bioindicação e biomonitoração depende de como os elementos químicos são utilizados pelos organismos. Para compreender melhor a interação desses com os seres vivos, Fränzle e Markert (2000) criaram o Sistema Biológico dos Elementos (SBE) como mostrado na Figura 11. Nele, foram consideradas as correlações entre os elementos químicos e fatores evolutivos para construir o padrão de utilização dos elementos químicos, pelos organismos. Contudo, elementos químicos como Na e H não foram considerados fixos no sistema devido às características eletrolíticas (Figura 10). Além disso, grande parte dos elementos químicos nutrientes como Cu, Mn, Zn, Ni, F, I, Se e Sn, tóxicos como As, Hg, Cd, Pb e Sb, além de actinóides, também não foram posicionados no SBE (Figura 10).

Figura 10 - Sistema biológico dos elementos (SBE).



Fonte: Adaptado de Fränzle; Markert (2000)

A variedade de elementos químicos essenciais utilizados por animais e plantas concomitantemente é limitada a 17, sendo menores ainda aqueles essenciais apenas para animais (estanho, flúor, iodo, níquel, selênio e vanádio) e plantas (Boro) separadamente (FRÄNZLE; MARKERT, 2002).

Dada a quantidade dos elementos químicos nos seres vivos, são classificados em macro e micro nutrientes. Os macronutrientes, são elementos como cálcio, potássio e magnésio, cuja quantidade nos organismos está na ordem de miligramas, enquanto os micronutrientes como cobre, ferro, manganês, molibdênio, selênio e zinco tendem a ser encontrados na ordem de microgramas (FRÄNZLE; MARKERT, 2000).

2.4.1.3 Moluscos bioindicadores/biomonitores de qualidade ambiental

Os gastrópodes, principalmente os marinhos, estão entre os grupos de animais mais utilizados em estudos sobre a acumulação de elementos químicos. Pesquisadores utilizam as espécies desse grupo (DALLINGER, 1994; ARELLANO et al., 1999; KANG et al., 1999; BUSTAMANTE et al., 2000; KAVUN et al., 2002; GOMOT DE VAUFLEURY; PIHAN, 2000; SANTOS et al., 2009; BORDEAN et al., 2014; MÉLO, 2014), devido às suas

especificidades morfológicas e fisiológicas (DALLINGER et al., 2001). Desse modo, esforços analíticos para a quantificação de elementos químicos em moluscos terrestres para fins de biomonitoração (ambientes impactados, como manguezais, são de grande valia para as ciências ambientais).

Gomot De Vlaufleury e Pihan (2000) utilizaram *Helix aspersa* para a avaliação de áreas contaminadas com Cd, Cu, Pb e Zn. Indivíduos da espécie de solos contaminados foram analisados para estudar as consequências da exposição a diversas concentrações desses elementos químicos para o desenvolvimento dos espécimes. Os autores observaram alterações no crescimento e sobrevivência dos indivíduos pela presença dos poluentes.

Kang et al. (1999) estudaram a acumulação de Cd, Cu, Pb e Zn em espécimes de *Littoraria brevicula*, coletados em locais sob influência de efluentes industriais na região de Onsan, Coréia do Sul. Os resultados mostraram altas concentrações dos elementos químicos Cd e Pb nos animais coletados próximos ao complexo industrial.

Kavun et al. (2002) compararam as concentrações de Cd, Cu, Fe, Pb, Mg, Ni, Zn nas espécies de mexilhões *Mytilus trossulus* e *Crenomytilus grayanus* coletadas nas Ilhas Curilas, Rússia. Os autores obtiveram altas concentrações de Fe e Zn para ambas as espécies em região com fonte hidrotermal. Cádmio foi acumulado principalmente na espécie *C. grayanus*, o que foi justificado pela longevidade da espécie.

Mélo (2014) utilizou os caramujos *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* para detecção de impactos ambientais em manguezais de Pernambuco, propondo as espécies como biomonitores de qualidade ambiental. Como resultado, foram observadas altas concentrações de Cu (259 mg kg^{-1}) e Zn (10300 mg kg^{-1}) no Parque Memorial Arcoverde, Olinda, quando comparadas com aquelas obtidas nos indivíduos de outros manguezais de Pernambuco. Nesse trabalho, a autora também observou maior sensibilidade da espécie *L. angulifera* à disponibilidade de elementos químicos proveniente de impactos antropogênicos.

2.4.1.4 Bioacumulação de elementos químicos em órgãos de invertebrados

A quantificação de elementos químicos em órgãos específicos pode facilitar a identificação das principais vias de acumulação para a espécie biomonitora, assim como permite explicitar a principal fonte de contaminação no ambiente estudado (Tabela 1). Bordean et al. (2014), por exemplo, identificou absorção via contato ao estudar a espécie *Cantareus aspersus* em florestas próximas a regiões industriais. Baseado nesses estudos, pode-se inferir que o hepatopâncreas/glândula digestiva é o órgão que se destaca na

acumulação de elementos químicos. Alterações celulares neste órgão após exposição a poluentes orgânicos e inorgânicos também foram observadas na literatura (DALLINGER et al., 2001).

Tabela 1 – Acumulação de elementos químicos em órgãos/tecidos de invertebrados empregados como biomonitores

| Animal | Elemento | Órgão/ Tecido | Referência |
|---|---------------------------|--|--------------------------|
|  <i>Cantareus aspersus</i> | Mn | Concha Hepatopâncreas* Pé | Bordean et al. (2014) |
|  <i>Sinopotamon henanense</i> | Cd | Hepatopâncreas* Ovário | Yang et al. (2013) |
|  <i>Crenomytilus grayanus</i> | Cd | Glândula digestiva* Guelras | Kavun et al. (2002) |
|  <i>Nassarius Reticulatus</i> | Cu Zn | Glândula digestiva* Glândula epitelial Manto Rim Trato reprodutivo | Santos et al. (2009) |
|  <i>Nautilus macromphalus</i> | Cd Co Fe V Zn | Glândula digestiva* Sistema pericardial Sistema renal | Bustamante et al. (2000) |

(*) maior bioacumulação

Fonte: A Autora.

Para quantificação das concentrações de elementos químicos nos tecidos, diversas técnicas analíticas podem ser empregadas, dependendo da matriz e do volume da amostra. Algumas técnicas analíticas são pormenorizadas a seguir.

2.4.2 Técnicas analíticas em matrizes biológicas

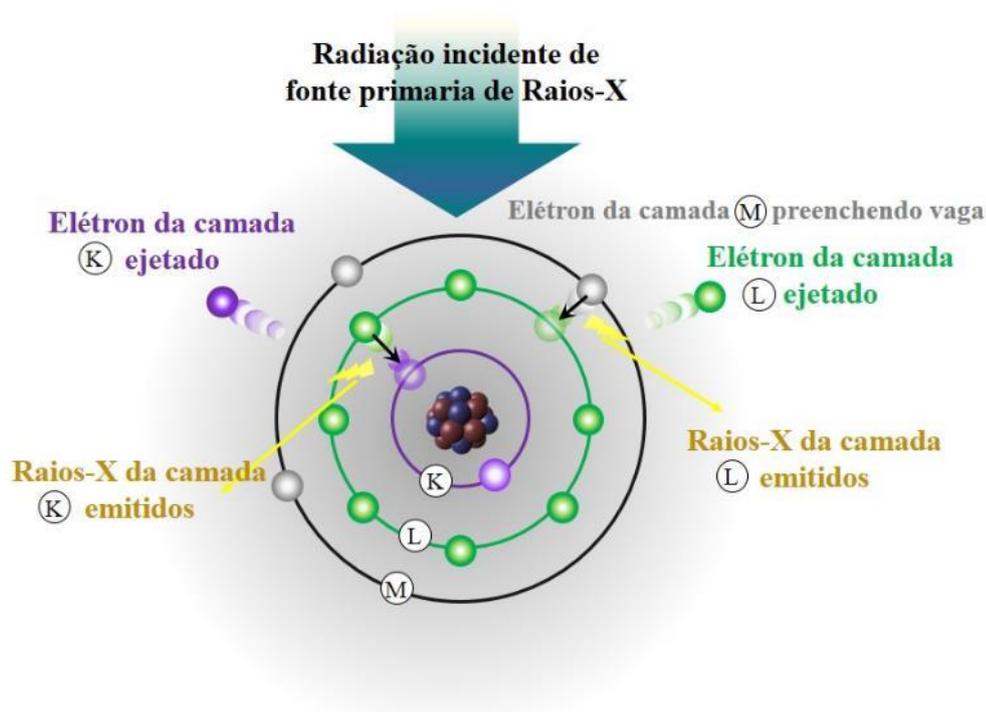
As técnicas analíticas de Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) e de Espectrometria por Absorção Atômica com Chama (FAAS) têm sido bastante empregadas para quantificar elementos químicos em diferentes tipos de amostras de origem biológica. A primeira apresenta ampla faixa de elementos químicos identificáveis em uma mesma análise, sendo assim denominada multielementar. É uma técnica não destrutiva, considerando que a amostra não necessita de tratamento químico prévio para ser analisada (MELQUIADES et al., 2008). A segunda, por sua vez, realiza a quantificação monoelementar e as amostras, para serem lidas, devem estar na forma de solução, sendo previamente tratadas quimicamente por ácidos (BUSTAMANTE et al., 2000; BORDEAN et al., 2014; YANG et al., 2013)

2.4.2.1 Espectrometria de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF)

É uma técnica analítica utilizada para a quantificação de elementos químicos em estudos com matrizes biológicas e geológicas (MARGUÍ et al., 2005; SOUSA et al., 2013). Possui facilidades que vão desde a automação da leitura, de troca da amostra e de auto vácuo. Os limites de detecção alcançam concentrações da ordem de mg kg^{-1} , que pode ser empregado para quantificar a maioria dos elementos químicos presentes nessas matrizes (BOUMANS; KLOCKENKÄMPER, 1989; MARGUÍ et al., 2005).

A análise química é possível a partir da geração de raios-X por uma fonte externa, cuja radiação é absorvida pelos átomos da amostra. Os átomos produzem elétrons excitados que, ao retornarem ao estado fundamental, pela passagem dos elétrons da camada de valência superior, resultam na perda de energia na forma de fóton de raios-X como mostrado na Figura 11 (LEDERER et al., 1967). A energia dos raios-X é característica ao elemento químico que a originou, permitindo assim, a identificação dos elementos químicos presentes na amostra (LEDERER, 1967; BOUMANS; KLOCKENKÄMPER, 1989).

Figura 11- Excitação de átomo a partir de raios-X



Fonte: Adaptado de Thermo Scientific (2015)

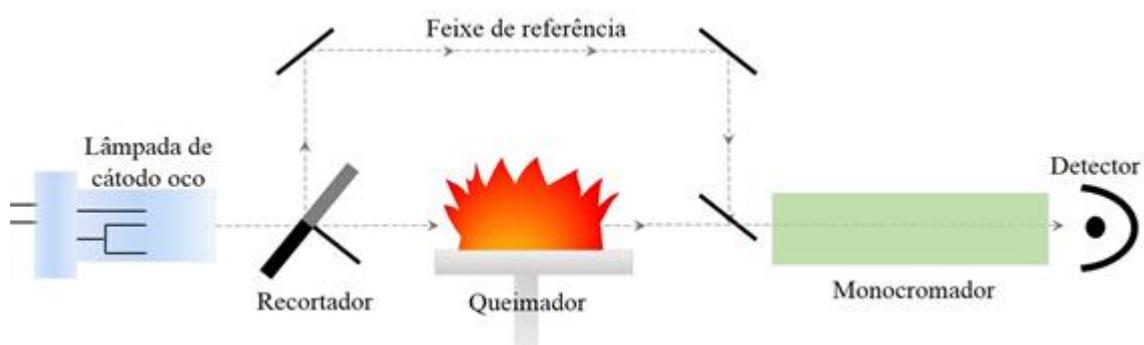
A quantificação dos elementos químicos nas amostras pode ser realizada a partir da construção de curvas analíticas previamente obtidas pelas leituras das intensidades dos raios-X característicos dos elementos químicos presentes em materiais de referência certificados com matriz semelhante às amostras (SOUSA et al., 2013). Ainda, o equipamento de EDXRF possui diversos colimadores que podem ser ajustados à quantidade disponível de amostras finamente depositadas em filme de polipropileno (KLEIN; DUTROW, 2012). Essa característica é bastante interessante para a análise de órgãos de pequenos invertebrados como *Littoraria angulifera*, em que massas menores que 0,1 mg podem ser analisadas (MAGALHÃES, 2015).

2.4.2.2 Espectrômetro de Absorção Atômica por Chama (FAAS)

A Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) determina a concentração de elementos químicos em matrizes biológicas e ambientais a partir da medição de absorvância nos comprimentos de ondas de cada faixa de concentração de cada analito. Para serem analisadas, as amostras devem passar por tratamento químico por meio de solubilização ácida dos elementos químicos presentes na amostra (LAJUNEN, 1992; WELZ; SPERLING, 1999).

A Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) utiliza a atomização por chama para produzir micropartículas que são irradiadas com comprimentos de ondas conhecidos e específicos para cada um dos elementos químicos a serem quantificados na solução (Figura 12). Essa técnica é indicada para a análise de elementos químicos presentes na amostra em níveis da ordem de mg kg^{-1} (KRUG et al., 2004).

Figura 12- Funcionamento do FAAS



Fonte: Adaptado de Skoog et al (2002).

No equipamento de FAAS, as medições são realizadas após a obtenção de curvas analíticas a partir de soluções-padrão dos analitos. O controle da qualidade do procedimento analítico é realizado por meio de soluções de materiais de referência certificados, solubilizadas a partir da mesma metodologia aplicada às amostras. Nesse equipamento, as fontes de radiação responsáveis pela detecção dos elementos químicos nas amostras são capazes de emitir radiação nas regiões visível e ultravioleta do espectro. Essas fontes de radiação são constituídas por lâmpadas de cátodo confeccionadas ou revestidas com o próprio elemento químico de interesse (WELZ; SPERLING, 1999).

As técnicas são capazes de quantificar as diferentes concentrações de elementos químicos em várias matrizes, porém, em matrizes biológicas, mensurar essas concentrações no organismo pode ser somente o primeiro passo em compreender as consequências de uma acumulação. Dessa forma, trabalhos sobre a comparação com testes biológicos devem ser estimulado.

2.4.3 Avaliação da mutagenicidade pelo teste do micronúcleo

A mutagenicidade ocorre por meio da ação de agentes estressores, que alteraram o ácido desoxirribonucleico - DNA, modificando sua função ou estrutura e transferindo essa alteração para a geração seguinte de células. Testes citogenéticos são empregados com a finalidade de determinar nas células as consequências da mutagenicidade. Dentre os testes, tem-se o ensaio do micronúcleo (MN), que consiste na contagem das células de organismos previamente expostos a agentes estressores e registro da frequência de micronúcleos gerados durante o processo mitótico (Figura 13) (HEDDLE et al., 1983; FLORES; YAMAGUSHI, 2009).

Figura 13 – Fotomicrografia de células micronucleadas de *Mytilus galloprovincialis*.



Fonte: Adaptado de Bolognesi e Fenech, 2012

Por se tratar de uma análise rápida e de baixo custo (SANTOS, 2004; SILVA, 2010; PINHEIRO et al., 2013), o ensaio do micronúcleo é frequentemente utilizado para análise da mutagenicidade “in situ” ou “ex situ” em diversos organismos, incluindo moluscos (FENECH; MORLEY, 1985; DEPLEDGE, 1998).

Silva (2010) expôs espécimes de *Biomphalaria glabrata* à radiação gama de ^{60}Co a doses de 25 Gy, 35 Gy, 45 Gy e 55 Gy, observando um aumento no número de micronúcleos produzidos nos hemócitos, para as doses de até 45 Gy (frequência relativa de 0,04% de MN), quando comparados ao grupo controle (0 Gy). Alterações celulares foram observadas nas doses acima de 35 Gy, porém a apoptose (morte celular) ocorreu apenas nas células dos espécimes expostos a 55 Gy, podendo justificar a menor frequência de micronúcleo encontrada neste grupo (0,023%).

Pinheiro et al. (2013) coletou indivíduos da espécie *Ucides cordatus* de manguezais de Cubatão e Juréia em São Paulo. Os autores observaram 59 células micronucleadas das 30.000 células lidas nas lâminas confeccionadas com hemolinfa extraída dos 10 indivíduos coletados em Juréia (frequência de 0,03% a 0,37% de MN) e 156 células micronucleadas das 30.000 células lidas nas lâminas confeccionadas dos espécimes coletados em Cubatão (frequência de 0,23 a 0,87% de MN). Nesse trabalho também foi observado caranguejo com o dedo fixo da própoda semelhante a uma mão, indicando que em ambientes muito impactados também podem ser observados alterações histológicas e morfológicas.

2.4.4 Alterações histológicas e morfológicas

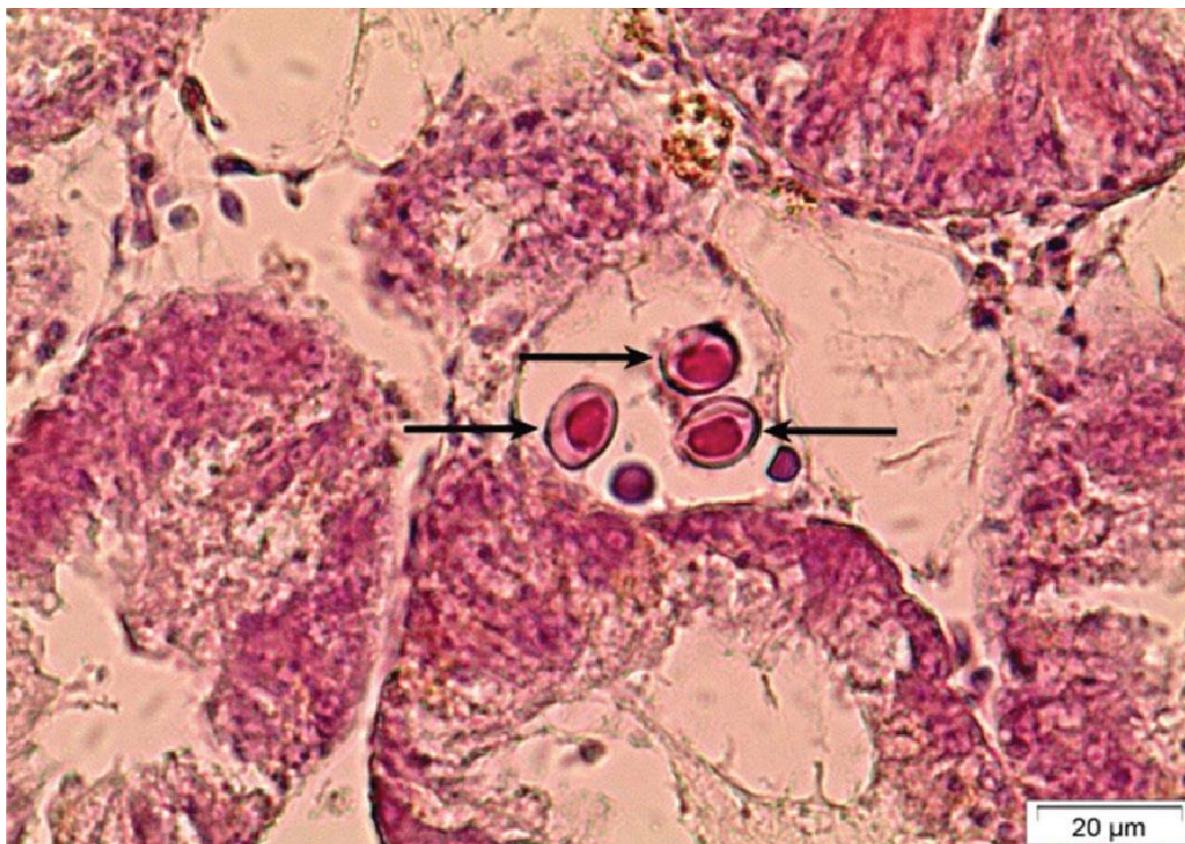
O excesso de elementos químicos em ambientes pode influenciar na função de alguns tecidos/órgãos de seres vivos (OEHLMANN; OEHLMANN, 2003; LEVINTON, 2001). A acumulação de substâncias químicas nos tecidos, modificações na sua estrutura e funcionalidade podem acarretar, em alguns casos, anomalias irreversíveis (MERTZ, 2012). A partir de estudos de alterações histológicas e morfológicas de órgãos, obtém-se resultados da observação das consequências da exposição das espécies a esses elementos químicos (MINCHIN et al., 1996; ARELLANO et al., 1999; CASTRO et al., 2000; CAETANO; ABSALÃO, 2002; CASTRO et al., 2005; GARCIA-SANTOS et al., 2007; COSTA et al., 2013; SANTOS et al., 2015).

O contato de moluscos com compostos orgânicos de estanho (COEs) podem causar uma anomalia morfológica observada em várias espécies utilizadas para estudos ambientais chamado de imposex ou pseudo-hermafroditismo. Esse fenômeno é caracterizado pelo aparecimento de órgãos do aparelho reprodutor masculino em fêmeas, na maioria dos casos não funcional, resultando na sua infertilidade (SMITH; BLAKEMAN, 1971; GIBBS et al., 1987). Semelhante a anomalia supracitada, também causada pela exposição aos COEs, está o intersex. Contudo, nessa alteração histológica, a presença dos caracteres sexuais masculinos em fêmeas ocorre em fases tão iniciais, que não impedem a reprodução das fêmeas (BAUER et al., 1997).

Outro fator relevante quanto à análise de alterações histológicas é a observação de parasitas. Na análise histológica de bivalves de manguezais, Zeidan et al. (2012) observaram baixa infestação de parasitas, mesmo assim, anomalias foram observadas nos tecidos, causadas por uma espécie de trematódeo. Por outro lado, Cova et al. (2015) observaram que

apenas uma alta incidência de grupos de parasitos em bivalves ocasionaria alterações histológicas como mostrado na Figura 14.

Figura 14 – Fotomicrografia de tecido digestivo de *Crassostrea rhizophorae* com setas indicando parasita da espécie *Nematopsis* sp.



Fonte: Adaptado de Cova et al. (2015)

Como os danos nos tecidos dos animais estão relacionados a sobrevivência no ambiente, são extremamente importantes as pesquisas envolvendo avaliações histológicas, uma vez que há escassez de dados na literatura sobre a histologia de moluscos terrestres como *L. angulifera*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental da presente pesquisa científica envolveu diferentes metodologias de diversas áreas, que foram realizadas para obter a separação dos órgãos para análises químicas, a extração da hemolinfa, a coloração dos hemócitos para o ensaio de micronúcleo e a preparação das lâminas histológicas. A amostragem ocorreu nos manguezais do Espaço Ciência e do Rio Formoso, distintos quanto à influência antropogênica.

3.1 Descrição das áreas de estudo

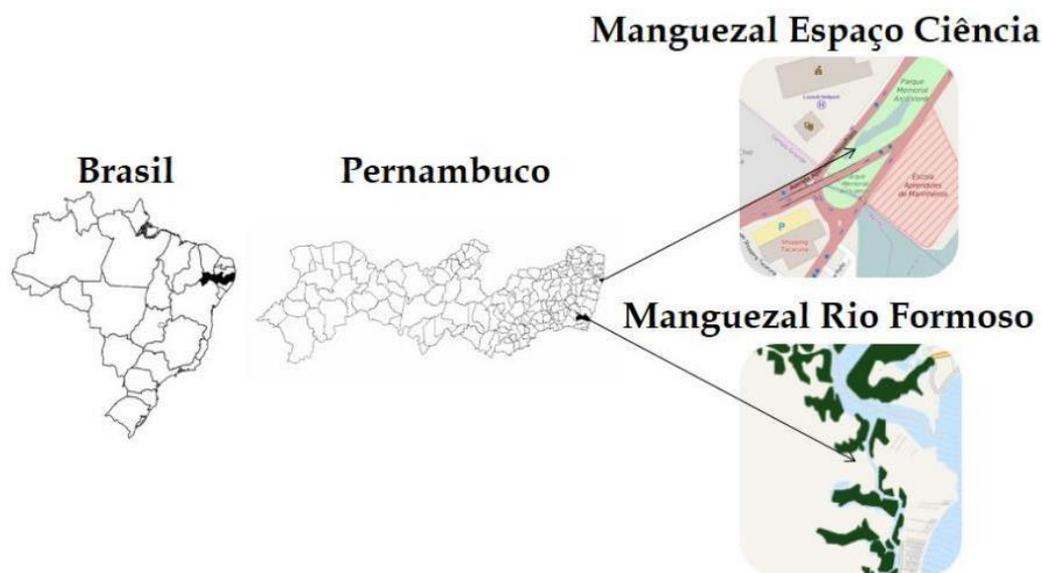
3.1.1 Manguezal Espaço Ciência

Situado nas coordenadas geográficas de latitude $8^{\circ}01'33.6''S$ e longitude $34^{\circ}51'50.5''W$, o manguezal do Espaço Ciência - EC, chamado de Chico Science (Figura 15), inserido no Museu Espaço Ciência (FIGUEIREDO et al., 2003), é a maior ilha de manguezal do Parque Memorial Arcoverde. Nessa área, o clima na escala Köppen caracteriza-se predominantemente tropical com estação seca no verão, classificado como As (CUNHA; GUIMARÃES, 2000).

3.1.2 Manguezal Rio Formoso

A porção do manguezal do Rio Formoso - RF (Figura 15) a ser estudada, tem sua localização às margens do Rio Ariquindá entre as coordenadas de latitude $8^{\circ}40'05''S$ e longitude $35^{\circ}06'40''W$, situado na microrregião geográfica da Mata Meridional de Pernambuco. O clima também é do tipo As, de acordo com a escala climática de Köppen (SILVA et al., 2009).

Figura 15 – Localização geográfica dos manguezais de estudo



Fonte: Adaptado de SISCOM/IBAMA (2015).

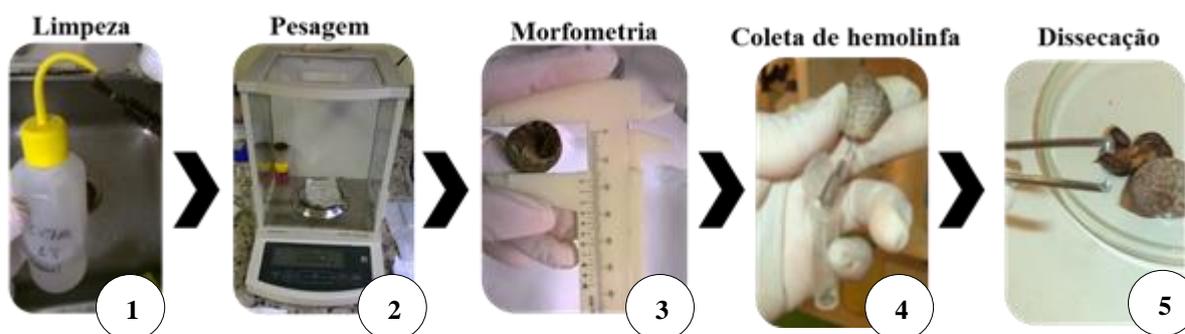
3.2 Amostragem

A amostragem aconteceu entre os meses de agosto e outubro de 2015 durante a maré baixa, por busca ativa com duração de uma hora, no médio estuário, em árvores de manguezais, principalmente nas raízes aéreas de *R. mangle* (KOHLMEYER; BEBOUT, 1986, MELO et al., 2012). Os animais coletados foram armazenados em recipientes de polietileno e deixados em repouso para o esvaziamento do trato digestivo e posteriores análises. No manguezal do Rio Formoso, 10 amostras compostas foram coletadas contendo de nove a 12 espécimes cada. No manguezal do Espaço Ciência, foram coletadas quatro amostras compostas com cinco a sete indivíduos cada. Vale ressaltar que ambas as coletas possuíram o mesmo esforço amostral, contudo, no Espaço Ciência, um menor número de espécimes foi coletado, indicando uma população de *L. angulifera* já reduzida nessa área.

3.3 Procedimentos de laboratório para preparação de amostras

Os indivíduos foram lavados com Extran a 0,1 % (v/v), conforme ilustrado na Figura 16-1 para remoção de possíveis contaminantes. Posteriormente, os animais foram pesados em balança analítica (Figura 16-2), com a conseguinte realização da biometria da concha (Figura 16-3). Os animais foram mantidos em recipientes de polietileno até limpeza intestinal durante 4 dias e após esse intervalo, 10 indivíduos do manguezal do Rio Formoso (RF) e 5 do manguezal do Espaço Ciência (EC) seguiram para extração da hemolinfa (H) (Figura 16-4). Os demais animais coletados (89 do RF e 17 do EC) foram dissecados (Figura 16-5) para a retirada da glândula digestiva (GD) e gônada (G). Junto às amostras dos órgãos, os demais órgãos e tecidos (DOT) de cada animal também foram encaminhados para a análise química (Seção 3.4).

Figura 16 – Procedimentos para a preparação dos moluscos/amostras



Fonte: A autora

3.3.1 Dissecação dos animais

A concha e a massa visceral dos moluscos foram separadas (Figura 17) por rompimento do músculo columelar. Para se atingir o músculo fez-se uma pequena incisão na concha próxima ao lábio interno com uma pinça “dente de rato”. Para o rompimento, utilizou-se de uma pinça de ponta curva. Após toda a massa visceral ser removida da concha, os espécimes foram dissecados para separação dos órgãos e submetidos às demais etapas referentes às análises químicas.

Figura 17 – Remoção da concha de um animal do manguezal do Rio Formoso.



Fonte: O autor

3.4 Análise química

3.4.1 Preparação das amostras

Com a dissecação, a glândula digestiva - GD, a gônada - G e demais órgãos e tecidos - DOT foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram secas a frio até peso constante (diferença entre pesagens sucessivas inferior a 1 mg). Os órgãos foram cominuídos e homogeneizados em almofariz de vidro até tamanho de partículas menores que 0,5 mm. Primeiramente, as amostras homogeneizadas foram analisadas no Espectrômetro de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia – EDXRF, seguido pelo tratamento químico necessário para a análise de cobre por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama - FAAS. O número das amostras simples, incluindo sua junção para a criação das amostras compostas, está detalhado na Tabela 2. O arranjo experimental foi modificado de modo a atender as condições analíticas para cada técnica empregada. Neste caso, para a análise por EDXRF dos espécimes de Rio Formoso, foram coletados 89 indivíduos, dissecados em G, GD e DOT, totalizando 8-9 indivíduos para cada amostra simples. Enquanto para os exemplares de *L. angulifera* do Espaço Ciência, foram coletados 17 indivíduos, também dissecados em G, GD e DOT. As amostras simples também foram reunidas para formar as amostras compostas como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2- Total de indivíduos por amostra, total de amostras e amostras compostas analisadas para a quantificação de elementos químicos em *L. angulifera*. RF = Manguezal do Rio Formoso. EC = Manguezal do Espaço Ciência.

| Técnica / analito | Estrutura | RF | | | EC | | |
|--|-----------|------------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| | | Total de indivíduos/ amostra | Amostras simples | Amostras compostas | Total de indivíduos/ amostra | Amostras simples | Amostras compostas |
| EDXRF / Ca, Cl, Fe, K, Mg, P, S, Sr, Zn | G | 8-9 | 10 | - | 4-7 | 3 | - |
| | GD | 8-9 | 10 | - | 4-7 | 3 | - |
| | DOT | 8-9 | 10 | - | 4-7 | 3 | - |
| FAAS / Cu | G | 8-9 | 10 | 1 | 17 | 3 | 1 |
| | GD | 16-18 | 10 | 5 | 17 | 3 | 1 |
| | DOT | 8-9 | 10 | 10 | 4-7 | 3 | 3 |

Fonte: A autora

Em consequência do cobre estar relacionado no transporte de substâncias na hemolinfa, houve a necessidade de análise deste elemento químico por FAAS, uma vez que os limites de detecção de EDXRF com o colimador de 3 mm seriam elevados (maiores que 100 mg kg^{-1}). Como algumas estruturas analisadas tinham pouca massa, fez-se necessário o rearranjo amostral para obter massa suficiente das estruturas de G e GD de ambos locais de coleta. Aquelas amostras contendo 8-9 indivíduos do Rio Formoso, foram agrupados em 1 e em 5 amostras compostas para G e GD, respectivamente (Tabela 2). Enquanto para o Espaço Ciência, todas as amostras simples das estruturas G e GD perfizeram uma amostra composta. Assim, a técnica de EDXRF possibilitou a quantificação de Ca, Cl, Fe, K, Mg, P, S, Sr e Zn e a técnica de FAAS a quantificação de cobre, conforme mostrado na Tabela 2.

3.4.2 Análise química por EDXRF

Previamente, realizou-se a calibração do equipamento EDX-720 da Shimadzu (Figura 19), a partir dos padrões A-750 (calibração em energia e resolução) e SUS (verificação da calibração realizada anteriormente). As amostras foram transferidas para cápsulas de polietileno específicas para a análise por EDXRF e vedadas com filme de polipropileno na base e no topo (Figura 19). Como as análises aconteceram no vácuo ($<30 \text{ Pa}$), pequenos respiradores foram feitos no polipropileno do topo das cápsulas com o auxílio

de agulha para evitar o rompimento do filme de polipropileno durante as análises químicas na atmosfera com pressão do ar menor que 30 Pa.

Figura 18 – Equipamento EDX-720 para análise química por Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia.



Fonte: A autora

As medições da radioatividade induzida ocorreram em triplicata com tensão de 15 kV para a determinação dos elementos químicos de número atômico menor que 22 e tensão de 50 kV para os demais elementos químicos. A determinação dos elementos químicos nas amostras foi realizada a partir de curvas analíticas obtidas por diversos materiais de referência conforme procedimento realizado por Sousa et al. (2013). Para o controle da qualidade do procedimento analítico, porções dos materiais de referência certificados SRM 2976 *Mussel Tissue (Trace Elements & Methylmercury)*, SRM 1547 *Peach Leaves* e RM 8415 *Whole Egg Powder* do National Institute of Standard and Technology (NIST) foram analisados junto às amostras. Detalhes sobre as condições analíticas para as determinações de Ca, Cl, Fe, K, Mg, P, S, Sr e Zn em amostras biológicas podem ser consultados em Mélo (2014), Magalhães (2015) e Santos et al. (2015).

Figura 19-Cápsula de polipropileno específicos para análise química por EDXRF.



Fonte: A autora

Após as análises por EDXRF, as amostras de gônada e glândula digestiva formaram amostras compostas (Tabela 2) para possibilitar a determinação de cobre por FAAS após tratamento químico com ácidos para a solubilização dos analitos das amostras.

3.4.3 Tratamentos químicos

As amostras foram submetidas a dois diferentes tipos de tratamentos químicos para serem analisadas por FAAS. O primeiro tratamento químico foi aplicado para glândula digestiva - GD e gônada - G, enquanto o segundo foi empregado para a digestão dos demais órgãos e tecidos - DOT. O procedimento em forno digestor facilitou a solubilização dos analitos em material de composição mais complexa como é o caso dos demais órgãos e tecidos - DOT.

3.4.3.1 Banho de ultrassom

Aproximadamente 0,5 g das amostras do Rio Formoso foram obtidos após o agrupamento de 10 amostras de gônadas e 5 de glândulas digestivas (Tabela 2). De acordo com o número de espécimes coletados no manguezal do Espaço Ciência, foram agrupadas três amostras individuais de cada estrutura para a obtenção de uma amostra composta de gônada e uma de glândula digestiva (Tabela 2). As amostras compostas, junto às três amostras de 0,5 g do material de referência RM 8414 produzido pelo National Institute of Standards and

Technology – NIST e do branco analítico foram tratados quimicamente seguindo a metodologia proposta por Magalhães (2015):

- Para cada 50 mg de amostra, 1 mL de HNO₃ (ácido nítrico) concentrado (p.a ~65%); foi depositado em tubos de ensaio;
- A mistura foi deixada em repouso na capela de fluxo laminar por 24 horas;
- Agitou-se manualmente para evitar a adesão do material nas paredes do tubo;
- Após a temperatura da água do banho de ultrassom atingir aproximadamente 80 °C, os tubos foram dispostos nesse banho como mostrado na Figura 20 por cerca de 1 hora;
- Os tubos seguiram para capela de fluxo laminar e permaneceram em repouso até atingir a temperatura ambiente;
- 0,1 mL de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) foi adicionado para cada 50 mg de amostra;
- A mistura foi devolvida para o banho de ultrassom (80 °C) por mais 1 h;
- Após repouso em capela de fluxo laminar até atingir a temperatura ambiente, as soluções foram filtradas (quantitativo) e acondicionadas em frascos de polietileno devidamente lavados seguindo o procedimento-padrão do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE.
- O volume final foi completado até 30 mL para obtenção das amostras e dos materiais de referência digeridos e diluídos.

Figura 20- Tubos com amostra no equipamento de ultrassom.



Fonte: A autora

3.4.3.2 Forno digestor

O segundo tratamento químico, também aplicado às porções do material de referência NIST RM 8414 e ao branco analítico, foi utilizado para a digestão das amostras referentes aos demais órgãos e tecidos – DOT, que contém as partes mais fibrosas dos caramujos, como o pé e o músculo columelar. Nessa metodologia, porções-teste de 0,5 g das amostras foram transferidas para tubos de Teflon com capacidade para 30 ml. As etapas do procedimento químico por forno digestor (MÉLO, 2014) foram:

- Adição de 6,0 ml de HNO_3 (ácido nítrico) concentrado p.a. (~65%);
- A mistura permaneceu em repouso na capela de fluxo laminar por 24hs;
- Agitou-se manualmente para evitar a adesão do material nas paredes do tubo;
- Adicionou-se 1,0 ml de HClO_4 (ácido perclórico) concentrado;
- Aqueceu-se a solução em forno digestor (Figura 21), conforme programa de ciclos previamente estabelecidos em Mélo (2014).
- Finalmente, as soluções foram filtradas, como mostrado na Figura 22, e acondicionados em potes de polietileno.
- O volume da solução foi completado até 30 ml com água ultra-pura.

Figura 21 - Forno digestor MarsXpress 5 CEM.



Fonte: O Autor.

Figura 22 – Procedimento de filtragem da amostra tratada quimicamente em capela de fluxo laminar.



Fonte: O autor

3.4.4 Análise química por FAAS

As soluções de amostras, branco analítico e de materiais de referência foram analisadas por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama no equipamento AA da Agilent (Figura 23). A curva analítica foi obtida a partir da análise de soluções com alto grau metrológico (Merk). O comprimento de onda utilizado foi 324,8 nm com abertura de 0,5 nm (*slit*). O tipo de chama foi ar/acetileno com os respectivos fluxos de 13,50 l min⁻¹ e 2,00 l min⁻¹. As análises foram realizadas em triplicatas. Os cálculos das concentrações foram realizados em planilha Microsoft Excel ®.

Figura 23 – Equipamento SpectrAA 220 da Varian/Agilent.

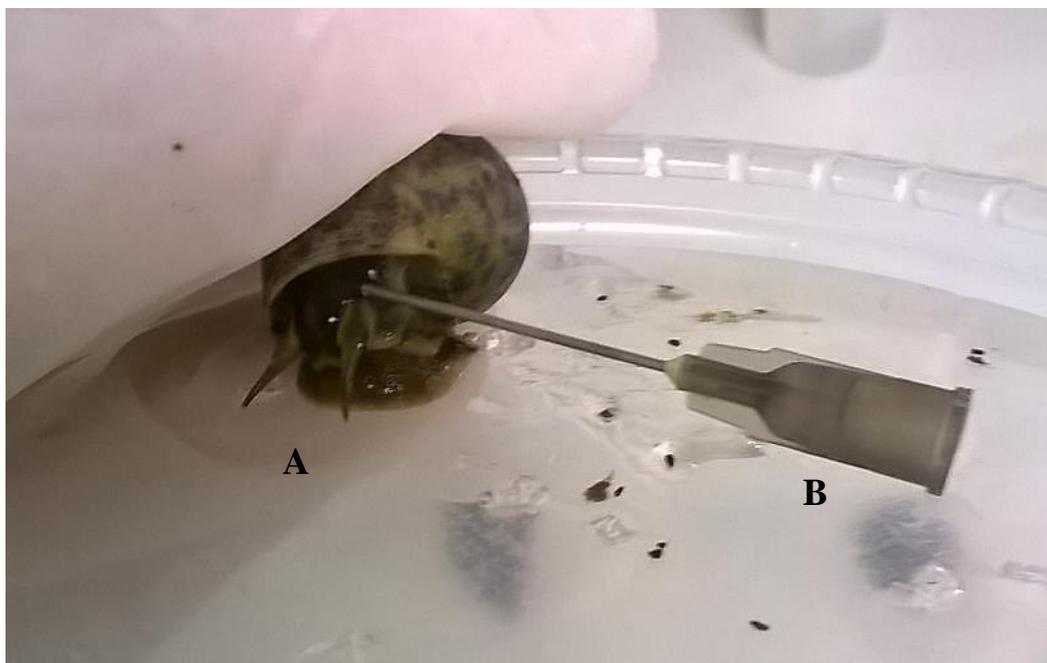


Fonte: O autor

3.5 Extração da hemolinfa para teste do micronúcleo

A extração da hemolinfa para teste do micronúcleo foi realizada no Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. A metodologia utilizada foi uma adaptação da técnica de Gorbushin e Iakovleva (2007). Nessa técnica, o material foi coletado no laboratório com o animal *in vivo*, os materiais utilizados na extração foram siliconizados com Sigmacote®, solução que reduz a fixação dos hemócitos as paredes do material durante sua manipulação. Foi procedida a punção para coleta de hemolinfa na região denominada sinus bucal utilizando uma agulha siliconizada de 25 mm de diâmetro (Figura 24).

Figura 24 – Punção no molusco *L. angulifera* (A), com agulha de 25 mm (B), pelo sinus bucal para extração de hemolinfa.



Fonte: O autor

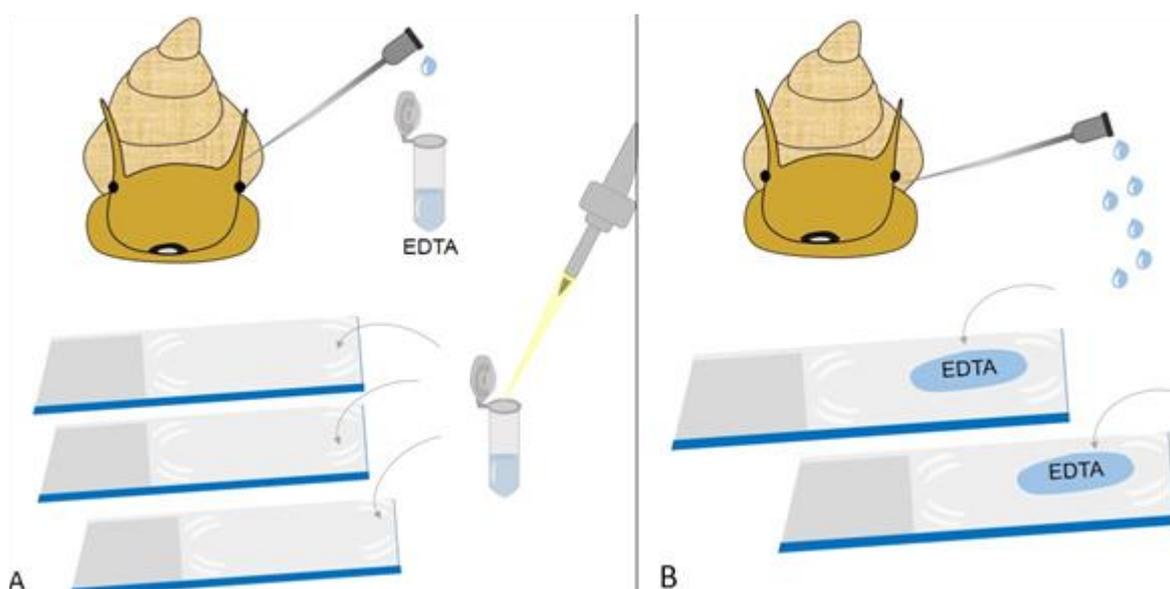
Para deposição da hemolinfa utilizou-se de duas metodologias (Figura 25), ambas testadas previamente nos animais do manguezal do Rio Formoso para padronização da técnica.

A metodologia representada na Figura 25-A seguiu à proposta por Gorbushin e Iakovleva (2007). Nessa, a hemolinfa foi extraída de cinco animais do manguezal do Rio Formoso, sendo depositada em tubos de microcentrífuga (ependorfs) de 2 mL, previamente siliconizados, contendo 100 μ L de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10 mM com Solução de Ringer na proporção 1:1. A mistura hemolinfa e EDTA foi homogeneizada e alíquotas de 100 μ L transferidas com auxílio de micropipeta variável entre 20 μ L e 200 μ L e ponteira siliconizada para a lâmina microscópica.

Para a metodologia ilustrada na Figura 25-B, o volume de EDTA nas lâminas variou de 45 a 50 μ L, depositados diretamente na lâmina, seguindo do gotejamento da hemolinfa para homogeneização com o EDTA na própria lâmina de microscopia. O processo de montagem das lâminas foi igual para ambas as metodologias, em que, as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida por 30 minutos para a fixação das células por EDTA (SILVA, 2010). Em

seguida, foram adicionados 90 μ L a 100 μ L da solução de Gluteraldeído com Ringer a 1% com tempo de repouso de 10 minutos. Ao final dessa etapa, as lâminas foram lavadas com água destilada, para retirar o excesso de solução e seguiram para a etapa de coloração. As lâminas foram imersas em solução do corante Giemsa a 10%, durante 7 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com Ringer, e posicionadas inclinadas, na bancada, para secarem em temperatura ambiente (25°C). As lâminas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de 40x para a verificação da presença de hemócitos nas duas metodologias empregadas. A metodologia mais eficiente, para o teste do micronúcleo, foi aquela que permitiu a contagem de 1000 células. A contagem aconteceu por meio de microscópio óptico com objetiva de 100x e, com isso, registraram-se as frequências das diferentes morfologias dos hemócitos analisados. As imagens das células foram capturadas em microscópio óptico Leica DM1000, acoplado com uma câmera DMC 2900, e analisadas por meio do software LAS Core.

Figura 25 - Representação das metodologias do preparo da hemolinfa para deposição na lâmina. A. Metodologia adaptada por Gorbushin e Iakovleva (2007). B. Hemolinfa depositada diretamente na lâmina contendo a solução de EDTA.



Fonte: O autor

3.7 Análise dos resultados

A análise dos resultados compreendeu técnicas estatísticas para a expressão dos resultados das concentrações dos elementos químicos determinadas por EDXRF e FAAS e para a comparação dos dados de frequência de micronúcleos, binucleação e apoptose. Análise comparativa e descritiva foi utilizada para os estudos histológicos, baseada principalmente em dados de outros moluscos, uma vez que não foram encontrados resultados de histologia para *L. angulifera*.

3.7.1 Análises químicas

A garantia da comparabilidade dos resultados das análises químicas realizadas por EDXRF e FAAS foi baseada na análise de materiais de referências certificados, cujas porções-teste foram analisadas concomitantemente às amostras. A incerteza analítica foi estimada (Seção 3.5.1.1), permitindo os cálculos do Número E_n para a avaliação da qualidade do procedimento analítico (Seção 3.5.1.2).

3.7.1.1 Incerteza Analítica

A estimativa de incerteza analítica das técnicas espectrométricas, EDXRF e FAAS, foi obtida a partir da soma quadrática das incertezas individuais referentes à precisão e à exatidão segundo o EURACHEM/CITAC Guide CG (ELLISON; WILLIAMS, 2012). Esses valores de incertezas foram expandidos em nível de 95% de confiança.

3.7.1.2 Qualidade do procedimento analítico

Para validação do procedimento analítico, foi utilizado o Número E_n (Equação 1). Para alcançar o nível de confiança de 95%, a faixa adequada para os resultados do Número E_n é entre -1 e 1, conforme recomendação da ISO 13528/2005.

$$E_n = \frac{X_{obs} - X_{ref}}{\sqrt{U_{obs}^2 + U_{ref}^2}} \quad (1)$$

na qual,

X_{obs} = valor observado na análise do material de referência;

X_{ref} = valor do certificado de análise para o material de referência;

U_{obs} = incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança do valor obtido do material de referência;

U_{ref} = incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança do valor certificado para o material de referência.

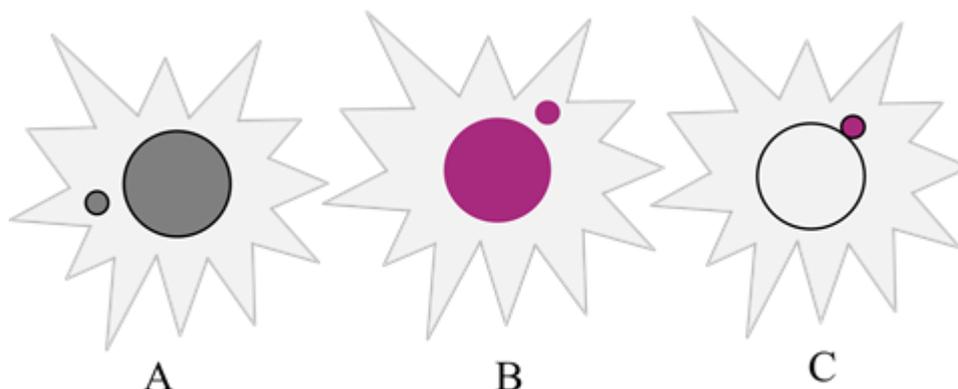
3.7.2 Análise de hemócitos

O procedimento adotado para a análise dos hemócitos envolveu os critérios para a identificação das células micronucleadas e a obtenção dos intervalos de confiança das frequências de micronúcleos, binucleação e apoptose dos hemócitos de *L. angulifera* coletados nos manguezais do Espaço Ciência e Rio Formoso.

3.7.2.1. Critérios para identificação de células micronucleadas

As células foram contadas individualmente utilizando-se de um contador de células manual. De cada lâmina escolhida aleatoriamente, o mesmo número de células foi quantificado e classificado quanto à presença de micronúcleos, resultando na frequência de células afetadas do total de células contadas. Desse modo, realizou-se a verificação de possíveis riscos de malformação celulares nos animais (FLORES; YAMAGUCHI, 2009). As células micronucleadas obedeceram ao critério estabelecido por Chequer (2008), no qual micronúcleos - MN tiveram, no mínimo, 1/16 e, no máximo, 1/3 do tamanho dos núcleos (Figura 27-A). Também foram considerados micronúcleos aqueles com a mesma coloração e formato oval (Figura 27-B). Não foram consideradas como micronucleadas as células em que os micronúcleos estiveram em contato direto com o núcleo, sobreposto e sem limite distinguível (Figura 27-C).

Figura 27 – Critérios de identificação de MN. A = Núcleo e micronúcleo bem definidos. B = Núcleo e micronúcleo com a mesma coloração. C = Célula não micronucleada.



Fonte: Adaptado de Silva (2010).

3.7.2.2 Intervalos de confiança para a frequência de variáveis relacionadas com a mutagenicidade em *L. angulifera*

Para a determinação do intervalo de confiança dos resultados das variáveis relacionadas com a mutagenicidade, assumindo-se distribuição de Poisson com proporção p para n amostras com estimativa de desvio-padrão $s = p(1 - p)/n^{1/2}$, optou-se pelos cálculos dos intervalos de confiança de Wald e Wilson em nível de 95% de confiança ($z_{\frac{\alpha}{2}} = 1,96$).

Para o método de Wald, assumiu-se a aproximação da distribuição de p como sendo distribuição normal (WALD, 1943) segundo a Equação 2.

$$(e^-e^+) \equiv \left(p - \frac{z_{\frac{\alpha}{2}} \cdot s}{2}, p + \frac{z_{\frac{\alpha}{2}} \cdot s}{2} \right) \quad (2)$$

No caso do intervalo de confiança de Wilson, aplicou-se uma correção para a obtenção dos limites superiores e inferiores em nível de 95% de confiança, uma vez que a suposição de distribuição normal pode não ser realista para a proporção p (WILSON, 1927). Para isso, aplicou-se a seguinte equação (3):

$$(w^-, w^+) \equiv \frac{\left(p + \frac{z_{\alpha}^2}{2n} \pm \sqrt{\frac{p(1-p)}{n} + \frac{z_{\alpha}^2}{4n^2}} \right)}{\left(1 + \frac{z_{\alpha}^2}{n} \right)} \quad (3)$$

Os resultados de intervalo de confiança foram comparados diretamente para as variáveis Proporção de Micronúcleo – MN, Proporção de Células Binucleadas e Proporção de Apoptose para os animais coletados nos Manguezais de Rio Formoso e do Espaço Ciência.

3.7.2.3 Tamanho mínimo de amostra ou suficiência amostral

A partir da estimativa da proporção média p e do desvio-padrão s , testou-se a quantidade mínima de lâminas necessárias para garantir um erro de 20% ou 40% para as variáveis medidas (Proporção de Micronúcleo – MN, Proporção de Células Binucleadas e Proporção de Apoptose) de acordo com a Equação 4:

$$n = \left(\frac{Z_{\alpha} \times s}{E} \right)^2 \quad (4)$$

na qual,

n = número de amostras

$Z_{\frac{\alpha}{2}}$ = valor crítico de 95% de confiança = 1,96

s = desvio padrão da variável em questão

E = margem de erro considerada aceitável para os ensaios de micronúcleo

3.7.3 Alterações histológicas

A avaliação das alterações histológicas foi realizada em microscópio óptico com aumento de 10x e 40x para descrição da diferenciação sexual e das alterações celulares nos tecidos dos diferentes animais analisados com relação a:

- Células em estágios degenerativos, que apresentam como característica principal a vacuolização e a atrofia;
- Células em estágio destrutivo, caracterizado pela redução da camada epitelial, necroses e descamação de células digestivas basófilas;
- Células em estágios inflamatórios, ocorrendo à infiltração de hemócitos no tecido conjuntivo, encapsulação e formação de granulócitos (USHEVA et al., 2006),
- Células infestadas com parasitas (ZEIDAN et al., 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A acumulação de elementos químicos foi diferenciada para os órgãos de *L. angulifera* dos manguezais estudados em que os resultados tiveram de nível metrológico garantido e com comparabilidade demonstrada. De acordo com o ensaio de mutagenicidade, a principal diferença encontrada foi com relação às células apoptóticas. Os resultados do estudo histológico foram expressivos, indicando grande pressão ambiental para os espécimes de *L. angulifera* do manguezal do Espaço Ciência.

4.1 Elementos químicos em órgãos de *L. angulifera*

A aplicação das técnicas EDXRF e FAAS permitiu a quantificação dos elementos químicos essenciais Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, P, S, Zn e o elemento traço Sr na glândula digestiva – GD, na gônada – G e nos demais órgãos e tecidos – DOT. Inicialmente, garantiu-se a qualidade do procedimento analítico, seguida pela quantificação dos elementos químicos para a comparação entre os órgãos dos animais coletados nos manguezais do Espaço Ciência e do Rio Formoso. A obtenção das impressões digitais (*fingerprints*) facilitou o entendimento da acumulação dos elementos químicos pelos organismos, identificando as principais vias de circulação de Ca, Cu, Fe e Zn nos animais sujeitos a impactos antropogênicos.

4.1.1 Qualidade dos procedimentos analíticos

Os resultados dos materiais de referências analisados por EDXRF e FAAS estão apresentados na Tabela 5. As concentrações dos elementos químicos estiveram em concordância com os valores certificados, principalmente ao considerarem-se as incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança. A qualidade dos procedimentos analíticos foi comprovada a partir dos valores do Número E_n , que estiveram entre -1 e 1, para os elementos químicos quantificados nos materiais de referência (Tabela 3). Com isso, assume-se que os procedimentos analíticos empregados corroboraram para a determinação de Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, P, S, Sr e Zn nos órgãos de *L. angulifera*.

Tabela 3 - Valores obtidos e certificados (mg kg^{-1}), incertezas analíticas expandidas para 95% de confiança e valores de Número E_n para os materiais de referência analisados por EDXRF e FAAS.

| Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia | | | | | |
|--|---------------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------------|
| SRM 2976 <i>Mussel tissue</i> | | | | | |
| Analito | Valor Obtido | | Valor Certificado | | Número E_n |
| | M | Inc. | M | Inc. | |
| Cl | 58000 ± 1800 | | 57000 ± 5000 | | 0,1 |
| Fe | 169 ± 54 | | 171 ± 4,9 | | -0,0 |
| K | 9500 ± 1000 | | 9700 ± 500 | | -0,2 |
| Mg | 4700 ± 1200 | | 5300 ± 500 | | -0,3 |
| P | 9600 ± 500 | | 8300 ± 1700 | | 0,7 |
| Sr | 101 ± 10 | | 93 ± 2 | | 0,7 |
| Zn | 157 ± 25 | | 137 ± 13 | | 0,6 |
| SRM 1547 <i>Peach leaves</i> | | | | | |
| Ca | 14800 ± 800 | | 15600 ± 2000 | | -0,3 |
| RM 8415 <i>Whole egg powder</i> | | | | | |
| S | 4570 ± 530 | | 5120 ± 500 | | -0,7 |
| Espectrometria de Absorção Atômica com Chama | | | | | |
| RM 8414 <i>Bovine muscle powder</i> | | | | | |
| Cu¹ | 2,59 ± 0,6 | | 2,84 ± 0,45 | | -0,3 |
| Cu² | 2,65 ± 0,6 | | 2,84 ± 0,45 | | -0,3 |

M = média

Inc. = incerteza expandida em nível de 95% de confiança

¹tratamento químico com banho de ultrassom

²tratamento químico com forno digestor

Fonte: O autor

4.1.2 Variabilidade das concentrações de elementos químicos determinados nos órgãos de *L. angulifera*

As concentrações médias (M) dos elementos químicos em mg kg^{-1} , desvio padrão (DP), número de amostras (n) e incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança para as amostras de gônada - G, glândula digestiva - GD e demais órgãos e tecidos - DOT dos animais dos manguezais do Rio Formoso - RF e do Espaço Ciência - EC estão na Tabela 4. Para os resultados de Cu das amostras compostas, optou-se em mostrar a incerteza analítica

para possibilitar alguma inferência sobre a “variabilidade esperada” para os resultados de gônada de RF e de EC, assim como para GD de EC. As concentrações foram bastante variáveis para Ca nos demais órgãos e tecidos – DOT, assim como Cl para a glândula digestiva dos animais do manguezal de Rio Formoso. Altíssimos valores de concentração de Cu e Zn foram observados na gônada e na glândula digestiva (Zn 12.300 mg kg⁻¹ e 20.600 mg kg⁻¹ e Cu 1.200 mg kg⁻¹ e 393 mg kg⁻¹, respectivamente), nos animais do Espaço Ciência.

Tabela 4 – Concentrações médias (M) dos elementos químicos em mg kg⁻¹, desvio padrão (DP), número de amostras (n) e incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança (em %) para as amostras de gônada - G, glândula digestiva – GD e demais órgãos e tecidos – DOT dos animais dos manguezais do Rio Formoso – RF e do Espaço Ciência – EC.

| Local | Amostra | Ca | Cl | Cu** | Fe | K | Mg | P | S | Sr | Zn | |
|-------|---------|----|--------|-------|------|------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|
| RF | G | M | <1400* | 14100 | 97 | 1830 | 7951 | 21600 | 8520 | 8520 | 200 | 1710 |
| | | DP | | 1924 | 22 | 440 | 423 | 4163 | 798 | 904 | 27 | 371 |
| | | n | 10 | 10 | 1 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | GD | M | <1400* | 1700 | 70 | 1940 | 6940 | 19200 | 6940 | 8110 | 220 | 1000 |
| | | DP | | 2427 | 15 | 292 | 198 | 3638 | 435 | 726 | 27 | 243 |
| | | n | 10 | 10 | 5 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | DOT | M | 15100 | 33500 | 75 | 243 | 10700 | 8740 | 6270 | 10400 | 186 | 134 |
| | | DP | 10900 | 2690 | 6 | 55 | 657 | 852 | 532 | 1130 | 17 | 25 |
| | | n | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| EC | G | M | <1400* | 21600 | 1200 | 3780 | 5890 | 10100 | 15800 | 8620 | 118 | 12300 |
| | | DP | | 6422 | 270 | 1902 | 202 | 1377 | 1329 | 935 | 61 | 4482 |
| | | n | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | GD | M | <1400* | 20000 | 393 | 5920 | 6250 | 9600 | 13400 | 8560 | 211 | 20600 |
| | | DP | | 4189 | 89 | 885 | 325 | 1765 | 158 | 665 | 22 | 3126 |
| | | n | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | DOT | M | 8130 | 35700 | 161 | 940 | 11200 | 7650 | 6800 | 9620 | 179 | 850 |
| | | DP | 1760 | 8700 | 71 | 200 | 1650 | 405 | 1010 | 620 | 14 | 310 |
| | | n | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

*valores menores que a concentração mínima detectável.

**análise realizada em FAAS com amostras compostas para G e GD

Fonte: O autor

A glândula digestiva é conhecida como órgão responsável por acumular elementos químicos tóxicos (BUSTAMANTE et al., 2000; KAVUN et al., 2002; SANTOS et al., 2009; YANG et al., 2013; BORDEAN et al., 2014). Com relação à gônada, deve ser levado em consideração o papel desse órgão na perpetuação da espécie. Estudos ressaltam a importância desse órgão devido à reserva energética, possivelmente associada à produção de gametas. Deste modo, destaca-se a sensibilidade desse órgão para estudos de contaminação ambiental (ANSALDO et al., 2006).

Os resultados médios de Cu (70 mg kg^{-1}) para as glândulas digestivas dos animais do manguezal do Rio Formoso foram compatíveis com os resultados do cefalópode *Nautilus macromphalus* (106 mg kg^{-1}). Já para os animais do Espaço Ciência, os valores médios atingiram cerca de 390 mg kg^{-1} , o que provavelmente está relacionado com o impacto antropogênico. Contudo, moluscos destacam-se pela alta variabilidade na concentração desse elemento químico na glândula digestiva, atingindo até 8.400 mg kg^{-1} no cefalópode *Loligo opalescens* (MARTIN; FLEGAL, 1975; BUSTAMANTE et al., 2000). Dessa maneira, as demais avaliações relacionadas à mutagenicidade e às alterações histológicas podem fundamentar a pressão ambiental sofrida por *L. angulifera* no Espaço Ciência.

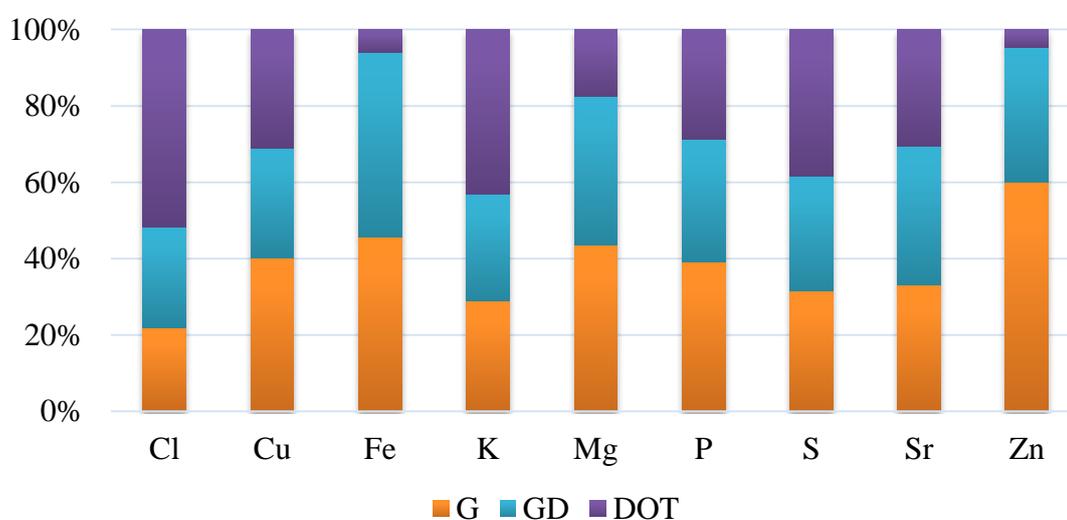
As concentrações médias de Fe para as glândulas digestivas de *L. angulifera* do manguezal Rio Formoso (1.940 mg kg^{-1}) e do Espaço Ciência (5.920 mg kg^{-1}) foram muito mais elevadas do que aquelas observadas (cerca de 670 mg kg^{-1}) em *N. macromphalus* (BUSTAMANTE et al., 2000). Concentrações de Fe de até 2.330 mg kg^{-1} foram encontradas em ambientes impactados para o gastrópode *Patella vulgata* (BRYAN; HUMMERSTONE, 1977). Nesse caso, provavelmente a análise da glândula digestiva resultaria em valores mais elevados do que aqueles encontrados nos organismos.

Para Zn, a concentração média (1.000 mg kg^{-1}) das glândulas digestivas dos animais do manguezal do Rio Formoso foi similar quando comparada com aquela encontrada (valores médios de 560 mg kg^{-1}) para cefalópodes (BUSTAMANTE et al., 2000). Todavia, relato sobre a concentração altíssima de Zn ($20.600 \text{ mg kg}^{-1}$) da glândula digestiva dos animais do Espaço Ciência não foi encontrada na literatura, sendo o valor máximo obtido de $830 \text{ mg kg}^{-1} \pm 355 \text{ mg kg}^{-1}$ por Bryan e Hummerstone (1977) na glândula digestiva do cefalópode *Nototodarus gouldi*. Valor máximo de 2.940 mg kg^{-1} foi encontrado nos tecidos do bivalve *Scrobicularia plana*, o que poderia levar à mais alta concentração desse elemento químico na glândula digestiva, porém possivelmente menor que $20.600 \text{ mg kg}^{-1}$ (BRYAN; HUMMERSTONE, 1977).

4.1.3 Impressões digitais (*fingerprints*) dos órgãos estudados de *L. angulifera*

Para melhor observação da relação de acumulação dos elementos químicos com os órgãos dos espécimes e dos manguezais estudados, os resultados das concentrações químicas foram utilizados para a obtenção de impressões digitais dos órgãos dos animais (*fingerprints*). Na Figura 28, é possível observar a tendência dos animais em concentrar Cu, P, Mg e Zn na gônada – G. Apenas Cl foi acumulado nos demais órgãos e tecidos – DOT. Desse modo, foi possível confirmar que a glândula digestiva e a gônada não apresentaram tendência de acumulação de elementos químicos ao menos para os elementos químicos avaliados nos animais do manguezal do Rio Formoso.

Figura 28 – Gráfico de impressão digital dos órgãos dos animais coletados no Rio Formoso



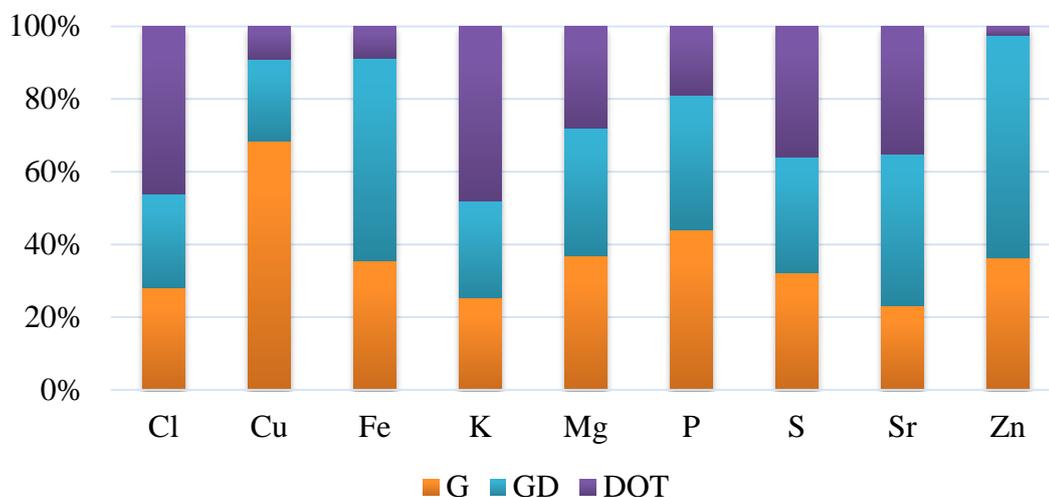
Fonte: O autor

Técnica semelhante à utilizada para quantificar elementos químicos nesses espécimes foi aplicado a órgãos do cefalópode *Nautilus macromphalus* encontraram resultados um pouco discrepantes aos obtidos para *L. angulifera*, uma vez que a glândula digestiva do cefalópode apresentou a maior acumulação de elementos químicos (BUSTAMANTE et al., 2000). Segundo Martin e Flegal (1975), essa espécie de cefalópode pode acumular substâncias químicas devido as suas características fisiológicas mais primitivas.

A distribuição dos elementos químicos nos órgãos de *L. angulifera* do manguezal do Espaço Ciência pode ser observada no gráfico de impressão digital apresentada na Figura 29. Nesse ambiente, diferentes composições químicas foram identificadas para os elementos

químicos nos órgãos analisados, em que Cu foi principalmente acumulado na gônada – G; Fe e Zn na glândula digestiva, Ca, Cl e K nos demais órgãos e tecidos - DOT.

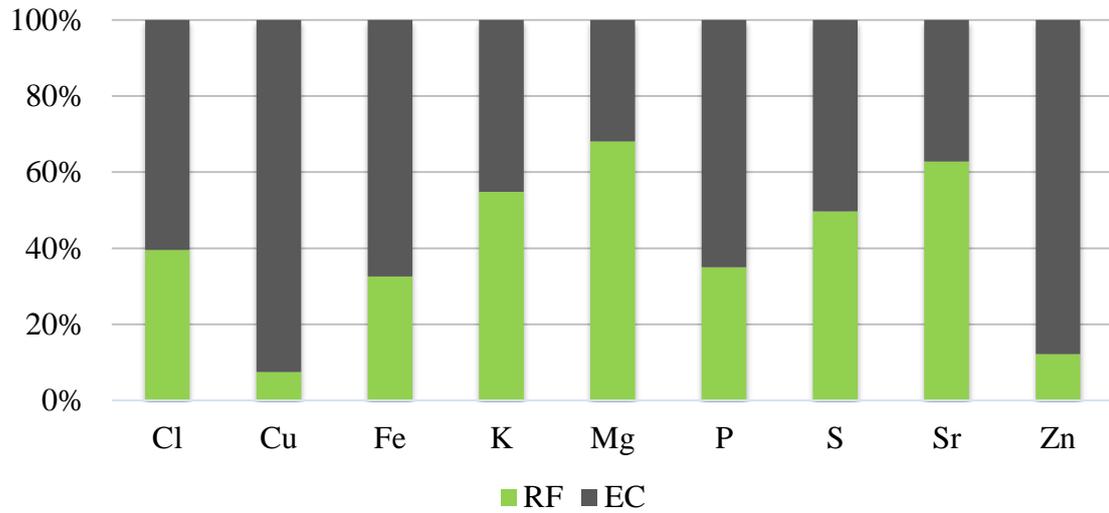
Figura 29 – Gráfico de impressão digital dos órgãos dos animais coletados no Espaço Ciência quanto à distribuição dos elementos químicos



Fonte: O autor

Para uma melhor visualização das diferenças entre os animais quanto às concentrações de elementos químicos determinados nos órgãos, foram propostas impressões digitais comparando os resultados para os manguezais estudados. Na Figura 30, foram apresentadas as impressões digitais das gônadas, em que as concentrações de Cu, Fe, P e Zn foram maiores no manguezal do Espaço Ciência. Em ambos os ecossistemas não houve grande variação quanto ao acúmulo dos elementos químicos Cl e Sr nas gônadas. Para K, Mg e S, as concentrações foram levemente superiores para os animais do Rio Formoso. É evidente que, considerando o aspecto nutricional, os indivíduos do Rio Formoso possuem maiores concentrações de nutrientes nesse órgão do que os animais do Espaço Ciência (Figura 30).

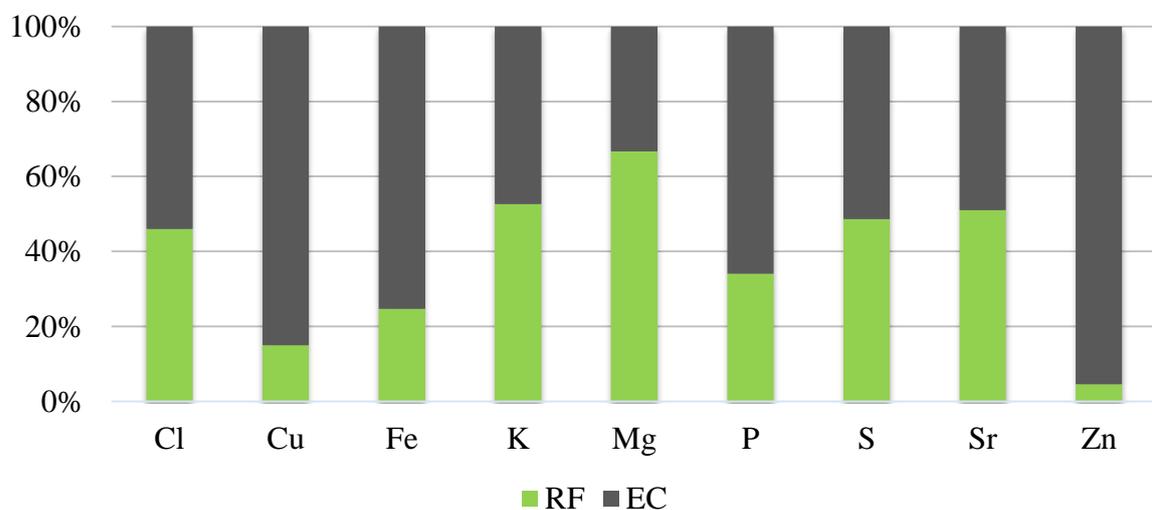
Figura 30 – Gráfico de impressões digitais dos resultados de gônadas de *L. angulifera* dos manguezais do Espaço Ciência (EC) e do Rio Formoso (RF)



Fonte: O autor

Comportamento semelhante foi notado para a acumulação dos elementos químicos nas glândulas digestivas dos animais do Espaço Ciência (EC) e do Rio Formoso (RF) conforme mostra a Figura 31. Vale ressaltar que as impressões digitais são bastante interessantes para a comparação entre locais e podem ser bastante características dos processos a serem monitorados como mostrado por Ricardo et al. (2015).

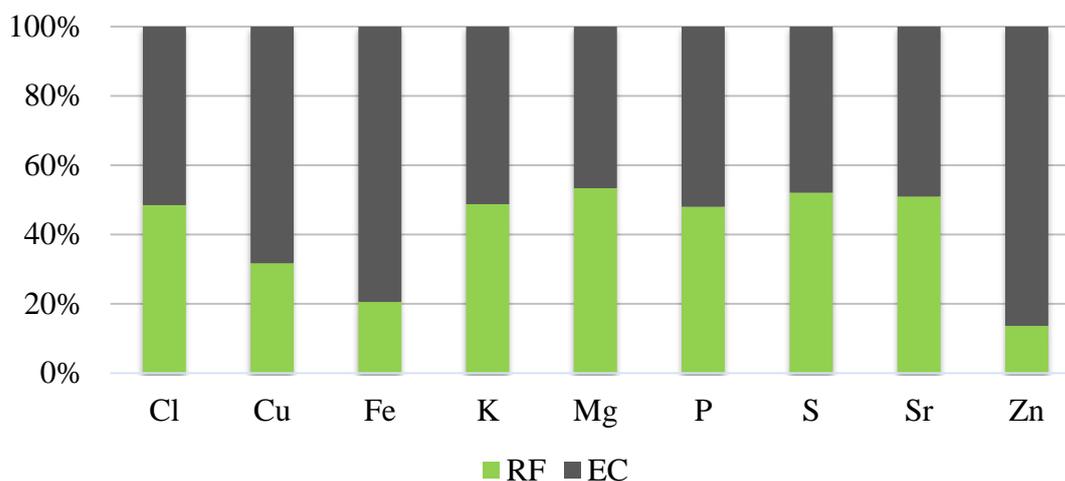
Figura 31 – Gráfico de impressões digitais de glândulas digestivas das amostras do Espaço Ciência (EC) e Rio Formoso (RF)



Fonte: O autor

O reflexo da acumulação nos órgãos gônada e glândula digestiva nos animais do manguezal do Espaço Ciência resultou em um gráfico de impressão digital muito semelhante para os demais órgãos e tecidos – DOT da Figura 32, em que Cu, Fe e Zn foram acumulados nos animais do Espaço Ciência.

Figura 32-Gráfico de impressões digitais de elementos químicos nos demais órgãos e tecidos das amostras do Espaço Ciência (EC) e Rio Formoso (RF)



Fonte: O autor

A acumulação diferenciada de Cu, Fe e Zn nos órgãos de *L. angulifera* do Espaço Ciência pode estar associada (1) à disponibilidade ambiental desses elementos químicos no ecossistema devido a fontes antropogênicas, (2) ao mecanismo de defesa do animal, uma vez que, principalmente, alguns elementos químicos nutrientes podem auxiliar nos processos de desintoxicação, (3) à característica genética da população, que estão habituadas às altas concentrações dos elementos químicos, (4) a outras fontes poluidoras, que indiretamente afetam a acumulação desses elementos químicos e (5) à presença de parasitas que alteram a distribuição e demandam mais elementos químicos aos hospedeiros. Esses distúrbios poderiam proporcionar alterações drásticas em biomarcadores como aqueles de ensaios de mutagenicidade nos hemócitos.

4.2 Mutagenicidade em *L. angulifera* de diferentes manguezais

Os resultados dos ensaios de mutagenicidade aplicados aos hemócitos de *L. angulifera* permitiram otimizar a obtenção das lâminas com hemócitos, além de possibilitar a

comparação pareada, utilizando-se de estatística descritiva, das frequências de micronúcleos, binucleação e apoptose para os animais coletados nos manguezais do Espaço Ciência e do Rio Formoso.

4.2.1 Otimização da obtenção das lâminas com hemócitos

Comparando as duas metodologias testadas para a extração de hemolinfa e obtenção das lâminas com hemócitos, observaram-se diferenças na obtenção de células para a análise da frequência de micronúcleos. A metodologia sugerida por Gorbushin e Yakovleva (2007), na qual a hemolinfa é homogeneizada em tubo de microcentrífuga (ependorff) com EDTA, seguida da disposição da solução na lâmina de microscopia, não permitiu a realização da contagem das células, uma vez que dificultou a observação dos hemócitos após coloração. No entanto, a metodologia adaptada, na qual a hemolinfa e o EDTA foram depositados diretamente na lâmina de microscopia, possibilitou a visualização de quantidade suficiente de células para a realização dos ensaios de micronúcleos.

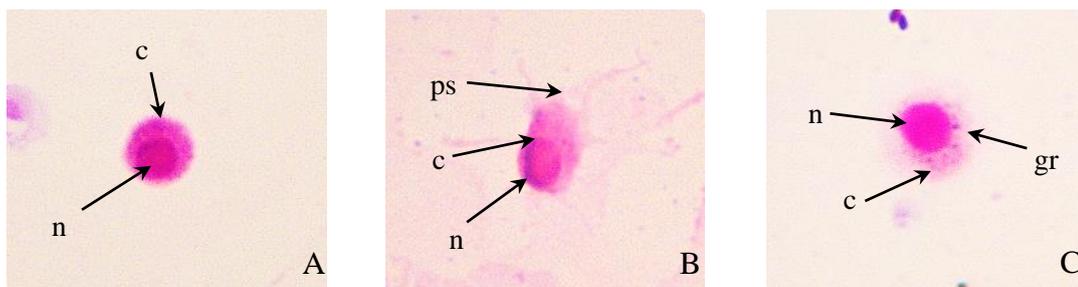
Avaliando os possíveis interferentes físicos envolvidos na manipulação do experimentador para realização das duas metodologias, pôde-se inferir que a técnica de deposição da hemolinfa na lâmina, previamente acrescida da solução de EDTA, evitou a perda de células para as paredes do tubo de microcentrífuga (PAMPANIN, et al., 2012). Essa explicação justificaria a ausência de células nas lâminas confeccionadas após prévia homogeneização de hemolinfa com EDTA no tubo ependorff.

Comparando com trabalhos disponíveis na literatura para avaliação da frequência de micronúcleos em espécimes coletados diretamente do ambiente, observou-se que, em muitas das metodologias empregadas, a disposição direta do sangue/hemolinfa na lâmina de microscopia proporcionou um quantitativo de células adequado para contagem de micronúcleos (SILVA, 2010; SILVA; NEPOMUCENO, 2010; ARAUJO-FILHO, 2013).

Por outro lado, Villela et al. (2006) e Geremia (2015) utilizaram a fixação dos micronúcleos em seringa durante um curto período de tempo (não superior a 7 minutos), também obtendo bom rendimento celular para contagem de micronúcleos. Villela et al. (2006) centrifugou a solução contendo as células, enquanto Geremia (2015) previamente injetou no tecido do molusco solução de Carnoy [ácido metílico e ácido acético glacial (1:1 v/v)], utilizada para fixação e removeu a hemolinfa, deixando-a em repouso na seringa por 7 minutos antes de depositá-la na lâmina.

A frequência das variáveis obtida pela metodologia de deposição da hemolinfa na lâmina, previamente acrescida da solução de EDTA, foi contabilizada em 1000 células. Na hemolinfa de *L. angulifera*, observou-se células redondas (Figura 33-A), hialinócitos (Figura 33-B) e granulócitos (Figura 33-C), demonstrando, inclusive, o grande potencial da técnica para outros estudos de mutagenicidade.

Figura 33 – Fotomicrografia de tipos de hemócitos encontrados em hemolinfa de *L. angulifera*. A = célula redonda; B= hialinócito; C= Granulócito (c = citoplasma; n = núcleo; ps = pseudópode; gr = grânulos). Coloração: Giemsa. Magnitude: 1000x.

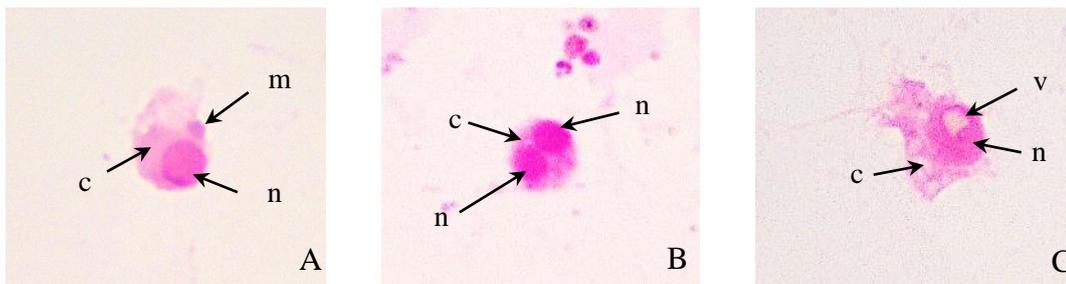


Fonte: O autor

A metodologia adotada possibilitou a observações de diversas alterações celulares como micronúcleos (Figura 34-A), binucleação (Figura 34-B) e apoptose (Figura 34-C), dependendo do local de coleta do animal. Todas essas alterações morfológicas observadas nos hemócitos são recorrentes em moluscos que sofrem alguma pressão ambiental (SILVA, 2010; ARAÚJO-FILHO, 2013).

Figura 34 – Fotomicrografia de alterações celulares observadas durante ensaio de micronúcleo realizado em hemolinfa de *L. angulifera*. A = Micronúcleo; B= Binucleação; C= Apoptose (c = citoplasma; n = núcleo; m = micronúcleo; v = vacúolo).

Coloração: Giemsa. Magnitude: 1000x.

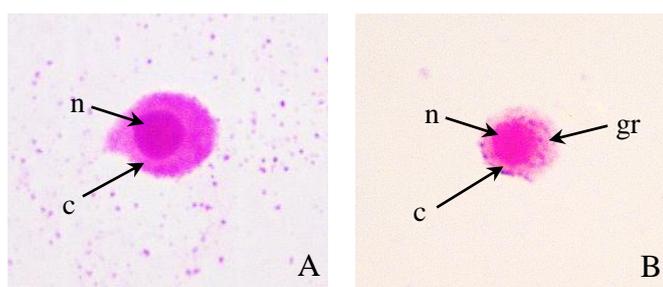


Fonte: O autor

Todos os moluscos coletados no Espaço Ciência, em Olinda, apresentaram granulações (Figura 35-B) semelhantes aquelas encontradas em granulócitos (Figura 33-C), porém com

grânulos muito mais evidentes. Os hemócitos dos espécimes do Espaço Ciência puderam ser facilmente identificados ao serem comparados com as preparações confeccionadas dos animais do manguezal do Rio Formoso (Figura 35-A). A diferente relação de hialinócitos/granulócitos em hemolinfa de moluscos é indicativo de pressão ambiental, afinal essas células são responsáveis por fagocitar o que é estranho ao corpo (ATAEV et al., 2016).

Figura 35 – Comparação entre a morfologia dos hemócitos de *L. angulifera* coletados nos manguezais do Rio Formoso (A) e do Espaço Ciência (B). c = citoplasma; n = núcleo; gr = grânulos. Coloração: Giemsa. Magnitude: 1000x.



Fonte: O autor

Como a padronização da quantidade de células escolhidas para realização desse trabalho está de acordo com a metodologia executada por outros autores, foram avaliadas as frequências de micronúcleos, binucleação e apoptose nos hemócitos dos animais dos manguezais do Espaço Ciência e do Rio Formoso (VILLELA et al., 2006; ARAUJO-FILHO, 2013; GEREMIA, 2015).

4.2.2. Resultados de mutagenicidade

As diferentes alterações celulares encontradas nos animais dos manguezais do Rio Formoso (RF) e do Espaço Ciência (EC) estão descritas na Tabela 5, em que é possível observar a frequência das variáveis, micronúcleo, binucleação e apoptose celular, bem como o número de lâminas analisadas para cada local de coleta. Cinco lâminas foram confeccionadas da hemolinfa coletada dos espécimes presentes em RF e 4 lâminas confeccionadas dos espécimes do EC. O número menor de lâminas atribuído ao EC ocorreu em razão da quinta lâmina preparada não possuir número suficiente de células para contabilização da frequência de micronúcleos.

Tabela 5 - Frequência de alterações encontradas nos hemócitos de *L. angulifera* dos espécimes do Rio Formoso (RF) e do Espaço Ciência (EC)

| Local | Amostra | Total de hemócitos | Frequência (%) | | |
|-------|---------|--------------------|----------------|-------------|----------|
| | | | Micronúcleo | Binucleação | Apoptose |
| RF | 1 | 1000 | 0,5 | 0,2 | 0 |
| | 2 | 1000 | 0,3 | 0 | 0 |
| | 3 | 1000 | 0,2 | 0 | 0 |
| | 4 | 1000 | 0,3 | 0 | 0 |
| | 5 | 1000 | 0 | 0 | 0 |
| EC | 1 | 1000 | 0,3 | 0,2 | 0,1 |
| | 2 | 1000 | 0 | 0 | 1 |
| | 3 | 1000 | 0,4 | 0,1 | 0,2 |
| | 4 | 1000 | 0,7 | 0,6 | 0,1 |

Fonte: O autor

Os resultados apresentados na Tabela 5 revelaram frequência de micronúcleos maior em alguns animais coletados no manguezal do Espaço Ciência, principalmente considerando os resultados da lâmina 4, com relação àqueles coletado em Rio Formoso. Também a binucleação foi maior para esse grupo, embora também tenha sido observada binucleação em células dos indivíduos do Rio Formoso. A apoptose ocorreu apenas nas células dos indivíduos do manguezal do Espaço Ciência.

Um resultado interessante desse trabalho foi a frequência elevada para micronúcleos nos espécimes de *L. angulifera* coletados em ambos os manguezais, mesmo o manguezal do Rio Formoso sendo considerado uma área de baixo impacto antropogênico. A frequência de micronúcleos encontrada por outros autores em moluscos coletados em diversos ecossistemas também foram mais elevadas com média de 4,5 micronúcleos em 1000 células (VILLELA et al., 2006; GERIMA, 2015). Estudos futuros, ampliando as áreas de amostragem e o número de espécies, podem elucidar o real impacto antropogênico à que os animais estão sendo submetidos.

A estatística descritiva dos resultados de micronúcleo, binucleação e apoptose são encontrados na Tabela 6, referente às proporções médias, desvios-padrão e número de células analisadas. Foram também apresentados os intervalos de confiança (IC95%) de Wald e

Wilson em nível de 5% de significância, os coeficientes de variação em porcentagem (CV%) e o tamanho mínimo de amostra para margens de erro de 40% e 20% (Tabela 4).

Tabela 6 – Resultados do intervalo de confiança em nível de 95% de confiança (IC95%), coeficiente de variação (CV%) e tamanho mínimo de amostra (n*) para as variáveis micronúcleo – MN, binucleação – BN e apoptose – AP.

| Variável | Local | Estatística descritiva | | | IC95% Wald | | | | IC95%Wilson | CV% | n* | |
|----------|-------|------------------------|--------|--------|------------|--------|--------|--------|-------------|-------|----------|----------|
| | | n | p | s | e- | e+ | w- | w+ | | | Erro 40% | Erro 20% |
| MN | RF | 5000 | 0,0026 | 0,0016 | -0,0005 | 0,0057 | 0,0016 | 0,0044 | 62 | 9093 | 36370 | |
| | EC | 4000 | 0,0035 | 0,0019 | -0,0002 | 0,0072 | 0,0021 | 0,0058 | 53 | 6854 | 27416 | |
| BN | RF | 5000 | 0,0004 | 0,0006 | -0,0008 | 0,0016 | 0,0002 | 0,0013 | 150 | 54023 | 216090 | |
| | EC | 4000 | 0,0025 | 0,0015 | -0,0004 | 0,0054 | 0,0014 | 0,0045 | 60 | 8644 | 34574 | |
| AP | RF | 5000 | 0,0000 | 0,0000 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | EC | 4000 | 0,0035 | 0,0019 | -0,0002 | 0,0072 | 0,0021 | 0,0058 | 53 | 6854 | 27416 | |

n = tamanho da amostra

p = proporção média

s = desvio padrão da proporção p

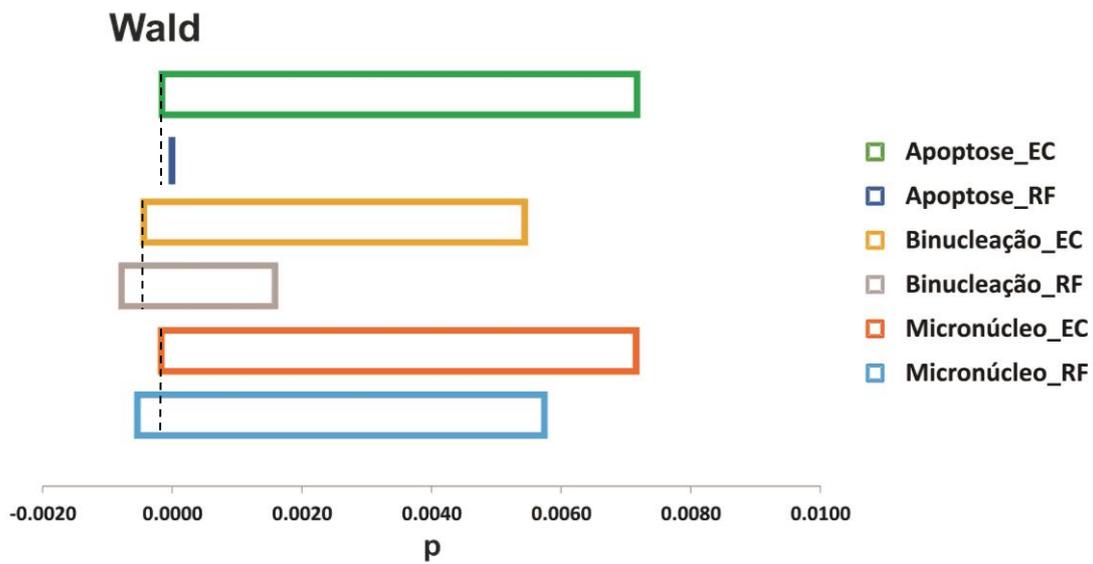
Fonte: O autor

Para o elevado valor de CV de 150% da variável binucleação dos animais de Rio Formoso, observou-se claramente a necessidade de aumento no número de células avaliadas para garantir margem de erro de 40% nos ensaios de micronúcleo. Nesse caso, o número mínimo de células avaliadas deveria ser 54.000, o que parece bastante elevado para trabalhos dessa categoria. Tipicamente, estudos envolvendo micronúcleos apontam para coeficientes de variação de cerca de 40% (KISSLING et al., 2007), indicando que os ensaios realizados neste trabalho foram adequados quanto à esse parâmetro. Para a margem de erro de 20%, o número de cerca de 36.000 células seria necessário, o que poderia inviabilizar a análise devido ao tempo necessário e quantidade de hemolinfa para a obtenção das lâminas.

Os resultados de intervalo de confiança de Wald da Tabela 6 são representados na Figura 36. Não houve indícios estatísticos de que as proporções de micronúcleo, binucleação e apoptose diferissem entre si em nível de 95% de confiança para os animais analisados nos manguezais do Espaço Ciência e do Rio Formoso. Todavia, o intervalo de confiança de

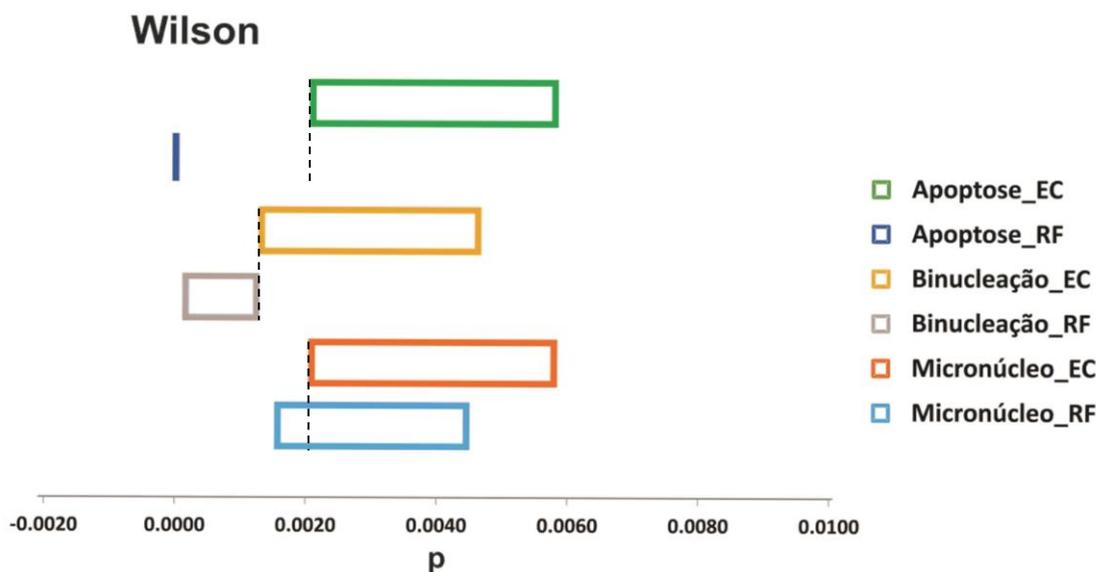
Wilson permitiu comprovar que, ao menos, para células apoptóticas, houve indícios estatísticos de diferenças entre os animais dos manguezais estudados em nível de 95% de confiança (Figura 37). De fato, dentre todas as variáveis estudadas, apenas a frequência de apoptose dos animais de Rio Formoso foi igual a zero. Como os limites inferiores dos intervalos de Wald são negativos (Tabela 6; Figura 36), as médias das variáveis poderiam ser nulas, tornando os resultados não significativamente diferentes em nível de 95% de confiança.

Figura 36 - Intervalos de confiança de Wald em nível de 95% de confiança



Fonte: O autor

Figura 37 - Intervalo de confiança de Wilson em nível de 95% de confiança



Fonte: O autor

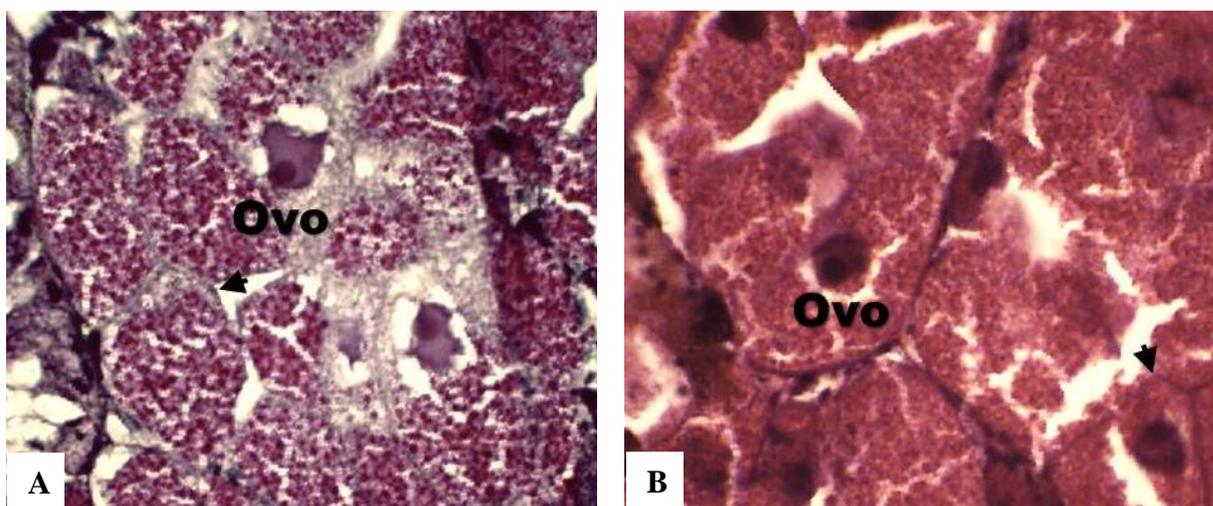
A apoptose é um fenômeno natural de morte celular programada, porém o número elevado de apoptose, presente na hemolinfa dos espécimes do Espaço Ciência, pode estar relacionado com a remoção de células danificadas por parasitas como sugere Romero et al. (2011). Segundo o autor, a apoptose de hemócitos em bivalves pode estar relacionada com o mecanismo de defesas contra parasitas e patógenos virais e bacterianos. Por outro lado, poluentes também possuem os mais variados efeitos sobre o sistema imunológico de moluscos, induzindo imunossupressão e ativando diferentes mecanismos celulares como a apoptose (GAGNAIRE et al., 2004; ROMERO et al., 2011). No caso do trabalho desenvolvido por Gagnaire et al. (2004), cloreto de mercúrio na concentração de $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ em exposição crônica (24 horas) foi capaz de aumentar em praticamente 40% a mortalidade dos hemócitos de *Crassostrea gigas*.

Considerando que os resultados de frequência das células apoptóticas estejam alteradas para a hemolinfa dos animais do manguezal do Espaço Ciência, houve necessidade de avaliação das alterações histológicas nos tecidos dos animais.

4.3 Resultados da análise histológica

Quanto às alterações morfológicas observadas entre os animais dos diferentes locais estuados, é possível identificar na Figura 38–A a estrutura da gônada feminina de um indivíduo do Rio Formoso, comparada com a gônada de um indivíduo do Espaço Ciência (Figura 38 – B). Ambas as estruturas apresentam ovócitos morfológicamente semelhantes e inseridos em folículos com paredes bem definidas. Contudo, é possível observar uma menor espessura na membrana do folículo, em que estão inseridos os óvulos maduros do espécime do manguezal do Espaço Ciência. A disposição dos ovócitos no lúmen dos folículos acontece de acordo com o grau de maturação, sendo que aqueles não fecundados são reabsorvidos pelo organismo (SILVA et al., 2012).

Figura 38 – Fotomicrografia da gônada feminina de *L. angulifera* coletado em manguezal do Rio Formoso (A) e Espaço Ciência (B). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Magnitude de 400x (Ovo = ovócito; Seta f.= membrana do folículo).

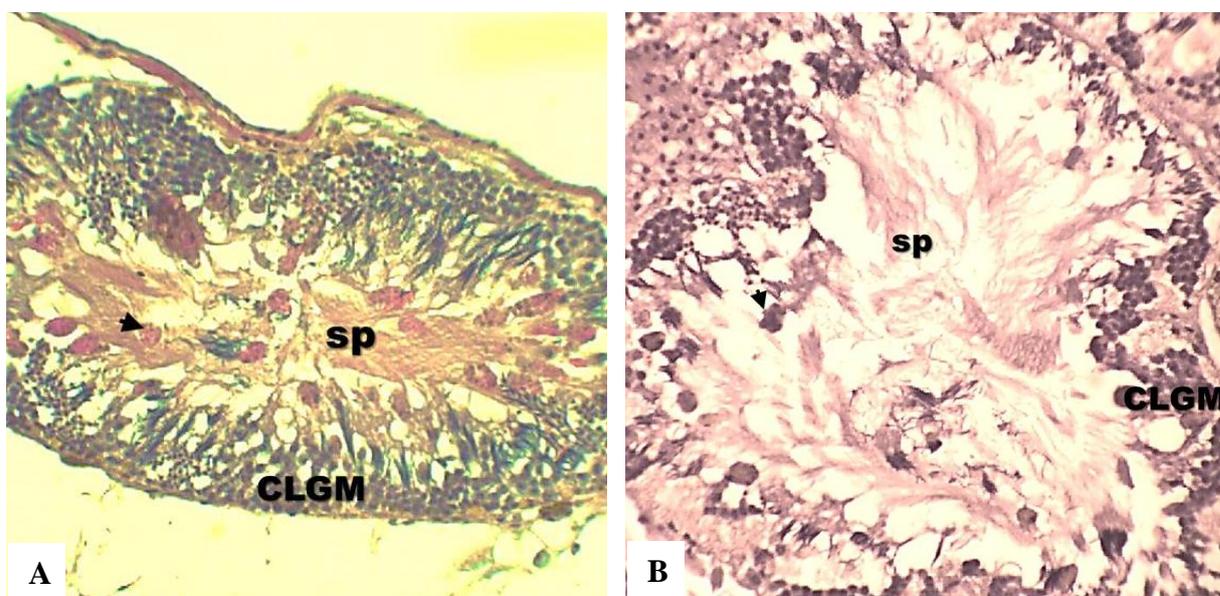


Fonte: O autor

Diferentemente do observado para gônada feminina, o compartimento gametogênico de indivíduo do Espaço Ciência (Figura 39–B) apresentou morfologia distinta com epitélio pouco denso e mal estruturado, quando comparado à mesma estrutura do Rio Formoso (Figura 39–A), principalmente quanto ao número de células da linhagem gametogênica masculina. Os efeitos de contaminantes ambientais sobre o potencial reprodutivo de invertebrados já foi demonstrado por meio da diminuição na contagem de esperma do anfípoda *Echinogammarus marinus* (YANG et al., 2008). Embora os autores não tenham

elucidado as consequências desta diminuição de gametas para a fertilidade dos animais, correlacionaram este fato ao impacto ambiental sofrido pelos animais na área de estudo. Observaram, ainda, o aparecimento de intersexualidade nos machos da espécie, o que foi comprovado por Costa et al (2013) em moluscos da família Littorinadae a partir da contaminação ambiental com derivados do estanho utilizados na indústria de tintas anti-incrustantes.

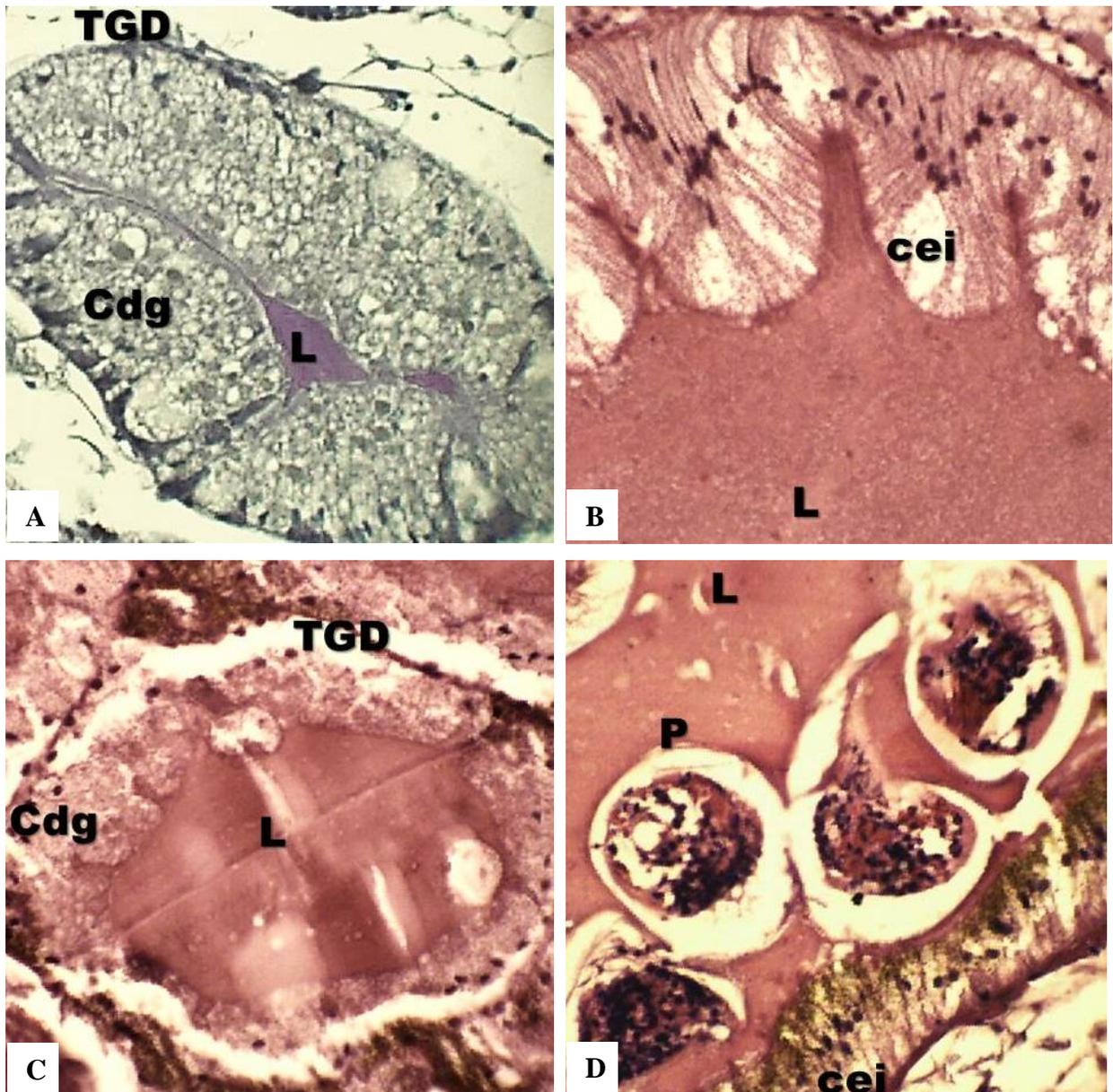
Figura 39 – Fotomicrografia do compartimento gametogênico de *L. angulifera* coletado em manguezal do Rio Formoso (A) e Espaço Ciência (B). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Magnitude de 400x (sp = Esperma; CLMG = Células da linhagem gametogênica masculina; Seta m.= Paraesperma).



Fonte: O autor

Os tecidos com maior diferenciação morfológica e estrutural foram aqueles do sistema digestivo. Quando comparados os mesmos tecidos nos espécimes do Espaço Ciência (Figuras 40–A e 40-B) e do Rio Formoso (Figuras 40–C e 40-D), foram observadas alterações nos tecidos da glândula digestiva e células digestivas degeneradas nos animais do Espaço Ciência. Malformações semelhantes foram observadas por Hemed et al. (2007) ao expor a espécie *Eobania vermiculata* a moluscicida a base de carbamato. Nesses mesmos animais, foi observado número excessivo de parasitas alojados no intestino. Segundo Zeidan et al. (2012), esses parasitas são comuns a organismos de manguezais, contudo, somente em baixas quantidades, diferentemente do encontrado nesse trabalho.

Figura 40 – Fotomicrografia do sistema digestivo de *L. angulifera* coletado em manguezal do Rio Formoso (Imagens A e B) e Espaço Ciência (Imagens C e D). A = Glândula digestiva não parasitada. B = Intestino não parasitado. C = Glândula digestiva de macho com excesso de parasitas. D = Intestino de fêmea com colônia de parasita. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Magnitude de 400x (TDG = Túbulo da glândula digestiva; Cdg = Célula digestiva; L = Lúmen; P = Conjunto de parasitas; cei = Célula do epitélio intestinal).



Fonte: O autor

Por apresentarem excesso de parasitas, é esperado aumento dos basófilos para a defesa do organismo. Rudell e Rains (1975) obtiveram relação diretamente proporcional entre número

de basófilos e o aumento nos níveis de cobre e zinco nos tecidos de ostras *Crassostrea gigas* e *Crassostrea virginica* (RUDELL; RAINS, 1975). Esses autores sugeriram correlação significativa entre a resposta fisiológica dos moluscos relativa ao número de basófilos e os níveis de cobre e zinco no ambiente, indicando que alterações histológicas podem ser provenientes de processos de combate aos parasitas. De acordo com esses autores, os basófilos estão relacionados com o processo de defesa dos moluscos às agressões físicas e químicas.

4.4 Comparação entre as concentrações dos elementos químicos quantificados em *L. angulifera* de manguezais de Pernambuco

Dados de concentração dos elementos químicos Cu, K, P e Zn quantificados em *L. angulifera* obtidos do Espaço Ciência e Rio Formoso foram comparados com os resultados encontrados nos manguezais do Espaço Ciência, do Parque Memorial Arcoverde e do Rio Formoso para a mesma espécie de gastrópode. O estudo realizado por Mélo (2014) foi baseado na composição dos animais sem a dessecação dos órgãos. Assim, para a composição do valor para o organismo inteiro, como utilizado por Mélo (2014), foi atribuído o percentual de cada órgão em peso seco para obter-se o valor da concentração dos elementos químicos, cujas concentrações máximas podem ser vistas na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentrações máximas de elementos químicos (mg kg⁻¹) em manguezais de Pernambuco.

| Local | Cu | K | P | Zn | Referência |
|---------------------------|-----|-------|-------|-------|-------------|
| Espaço Ciência | 537 | 8100 | 11500 | 10500 | Este estudo |
| Rio Formoso | 80 | 8500 | 7139 | 867 | |
| Memorial Arcoverde | 259 | 10500 | 15300 | 10300 | Mélo (2014) |
| Rio Formoso | 60 | 10000 | 7400 | 534 | |

Fonte: O autor

O manguezal descrito como Memorial Arcoverde está no mesmo complexo de ilhas de manguezal que o do Espaço Ciência, ambos localizados no Complexo de Salgadinho, o que permitir inferir que a semelhança nas concentrações de Zn para os animais desses manguezais pode estar relacionada com a disponibilidade de elementos químicos ou com a predisposição de indivíduos de *L. angulifera* em acumular esses elementos químicos. A pressão ambiental

sofrida pelo molusco torna-se evidente com base nos resultados de Zn, uma vez que se trata de manguezais urbanos com grande influência de atividades antropogênicas. Zn, em concentrações fisiológicas (abaixo de 1.000 mg kg^{-1}), demonstra propriedades protetoras e antioxidativas em moluscos, entretanto, essas funções não são desempenhadas em moderadas e altas concentrações (TREVISAN et al., 2014). Desse modo, as altas concentrações de Zn podem estar relacionadas com a maior frequência de morte celular encontradas para os animais do manguezal do Espaço Ciência.

Para as concentrações de P, os resultados entre Espaço Ciência e Memorial Arcoverde também foram semelhantes, contudo foram apenas duas vezes superiores aos valores encontrados em Rio Formoso, em ambos os estudos. Por ser um nutriente e também alterador da dinâmica populacional de microalgas, estando relacionado com a eutrofização (CARPENTER, 2008), indicou-se um limiar bastante estreito entre ambientes poluídos e não poluídos. Esse tipo de comportamento pode ser bastante interessante para o uso da espécie como biomonitora de elementos químicos.

De acordo com os resultados de K, não foram observadas grandes diferenças entre os manguezais, indicando que, de certo modo, os indivíduos do Espaço Ciência e do Parque Memorial Arcoverde estão mantendo as concentrações de alguns nutrientes nos tecidos, refletindo pouco impacto antropogênico para os animais.

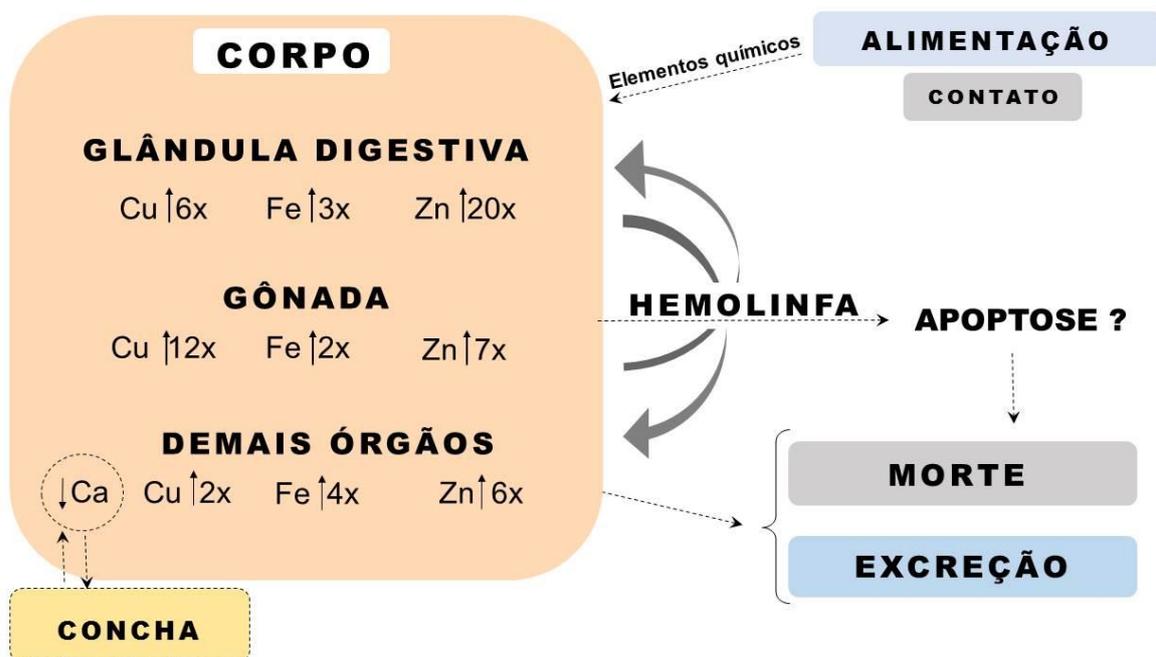
Para Cu, os animais do Espaço Ciência apresentaram o dobro da concentração observada nos animais do Memorial Arcoverde. O alto valor de Cu quantificado nesse manguezal pode ser explicado devido às diferentes épocas de coleta dos estudos ou, ainda, ser consequência da influência direta do canal da Rodovia Agamenon Magalhães. Por ser o principal componente da hemocianina, esse elemento químico é bastante importante para os animais, porém, sua toxicidade também é considerada elevada, causando diversos danos celulares (XIAO et al., 2016).

Indivíduos de *L. angulifera* coletados em mesmo manguezal de Rio Formoso foram utilizados como valor de base em ambos os trabalhos. De acordo com Mélo (2014), para P é possível observar as mesmas concentrações entre os estudos, enquanto para Cu e Zn, as concentrações maiores foram obtidas no presente estudo. O nutriente K foi quantificado em maior valor para as amostras de Rio Formoso no trabalho de Mélo (2014). Mesmo considerando a variação temporal das concentrações entre os estudos, é possível observar a clara tendência da espécie *L. angulifera* em acumular Cu e Zn.

4.5 Efeitos biológicos da acumulação de Cu, Fe e Zn sobre *L. angulifera*

Por meio das técnicas analíticas EDXRF e FAAS foram quantificadas concentrações elevadas dos elementos químicos Cu, Fe e Zn na espécie *L. angulifera*. A Figura 41 ilustra a acumulação de Cu, Fe e Zn nos compartimentos biológicos de *L. angulifera* a partir da análise de órgãos importantes para alimentação e reprodução. O esquema indica o caminho preferencial da acumulação desses elementos químicos, quando comparados com os resultados obtidos para os animais do manguezal do Rio Formoso. As setas seguidas pelos números representam o número de vezes que as concentrações foram superiores àquelas dos espécimes do Rio Formoso, considerado valor de base para o estudo. Como a glândula digestiva apresentou as maiores concentrações de Fe e Zn, a ingestão de alimentos foi avaliada como sendo a principal entrada de elementos químicos nos animais. Contudo, o contato do alimento com elementos químicos não podem ser menosprezados nesse tipo de avaliação (BORDEAN et al., 2014).

Figura 41 – Comparação entre a acumulação de Cu, Fe e Zn nos compartimentos biológicos de *Littoraria angulifera* do Espaço Ciência.



Observou-se, na glândula digestiva (GD), a acumulação de Cu em quantidades seis vezes maiores do que o valor de referência. Para o Fe, a concentração foi 3 vezes maior e quanto ao Zn o valor foi 20 vezes maior, indicando que a glândula digestiva é a estrutura do *L. angulifera* com maior acumulação de Zn. Altas concentrações desse elemento químico também foram observado por Bordon et al. (2016) em estudo realizado com espécie de siri *Callinectes danae* em estuário antropizado. Para o gônada (G), a concentração de Cu foi 12 vezes maior que o valor de referência, enquanto para Fe, o valor quantificado foi o dobro do valor de referência. Zn apresentou 7 vezes mais no Espaço Ciência que no Rio Formoso. Desse modo, conclui-se que a gônada tende a acumular Cu. Os demais órgãos e tecidos (DOT), apresentaram, para Cu, a acumulação 2 vezes maior do que o valor de base, 4 vezes maior para Fe, enquanto, para Zn, a concentração foi 6 vezes maior que os valores de referência. (Figura 41).

Com isso, assume-se que a principal fonte de absorção dos elementos químicos foi a alimentação, característica observada pela alta concentração de Cu, Fe e Zn na glândula digestiva, fato corroborado pelos trabalhos de Green e Walmsley (2013) e Conti (2016). Esses autores observaram mesma via de acumulação para espécimes de invertebrados. Contudo, a acumulação de Cu na gônada extrapolou os níveis do elemento químico para o organismo, indicando possível atividade de desintoxicação, seguida de possíveis prejuízos para a atividade reprodutiva dos animais.

Baseado em estudos anteriores sobre altas concentrações de elementos químicos na parte mole da espécie estudada, o ensaio do micronúcleo foi realizado com a hemolinfa de alguns animais de EC e RF. Das alterações celulares observadas, a apoptose foi a única com resultados significativos, observando maior frequência nos hemócitos dos animais do Espaço Ciência, indicando mecanismos de defesa do animal a agentes estressores. Inclusive, observou-se, durante o ensaio de micronúcleo, uma grande quantidade de grânulos nos hemócitos dos espécimes do manguezal do Espaço Ciência, que, segundo Rohr e Amato (2014), é uma característica comumente encontrada para animais sujeitos a estresse ambiental.

Os resultados, até o momento, demonstraram grande capacidade de acumulação de Zn por *L. angulifera* na região antropizada, sendo a alimentação a principal responsável. Contudo, em estudos de monitoração da qualidade ambiental realizados no manguezal do Espaço Ciência, foram encontradas concentrações máximas de 117 mg kg⁻¹ para Zn nos solos (SOUZA et al., 2015). Já no manguezal do Parque Memorial Arcoverde, local próximo ao Espaço Ciência, foram observadas concentrações para esse elemento químico de, no máximo,

318 mg kg⁻¹ nos sedimentos em suspensão (LYRA, 2016), enquanto a biomonitoração ativa utilizando o líquen *Cladonia verticillaris* na região indicou quantidades não expressivas (máximo de 63 mg kg⁻¹) de Zn na atmosfera (SANTOS, 2016). Como *L. angulifera* alimenta-se principalmente de fungos e líquens dos troncos das espécies arbóreas de mangue, é difícil comprovar que a principal razão da acumulação de Zn seria a disponibilidade do elemento químico. Com as alterações histológicas comprovadas e o aumento da frequência de células apoptóticas na hemolinfa, assume-se que a acumulação de Zn e, também, outros elementos químicos possam estar associados a processos bioquímicos relevantes para os mecanismos de defesa do organismo, sendo possivelmente transferido para as gerações futuras.

5. CONCLUSÕES

Ao envolver diferentes disciplinas como Biofísica, Genética, Química e Zoologia, este trabalho foi considerado inovador por dimensionar a problemática de conservação da biodiversidade de manguezais urbanos devido à pressão ambiental contínua sobre, principalmente, as espécies de gastrópodes terrestres. Desse modo, conclui-se que a presente pesquisa:

- ✓ Otimizou a técnica de coleta de hemolinfa para realização do teste do micronúcleo em *L. angulifera*;
- ✓ Confirmou a aplicabilidade do teste do micronúcleo para avaliação de impactos ambientais, utilizando biomarcadores;
- ✓ Realizou a primeira descrição e diferenciação morfológica das células de hemolinfa do gastrópode *L. angulifera*;
- ✓ O manguezal do Espaço Ciência está submetido aos efeitos do impacto antropogênico, em função do resultado observado no teste citotóxico aplicado;
- ✓ Os impactos de origem antropogênica ainda não ocasionaram mutações em níveis significativos nas células do gastrópode *L. angulifera*;
- ✓ Demonstrou a aplicabilidade da técnica de EDXRF para avaliação da acumulação de elementos químicos mesmo em amostras com pouca massa;
- ✓ Apresentou a primeira descrição na literatura da constituição química de órgãos de *L. angulifera*, evidenciando sua importância para a monitoração ambiental;
- ✓ Comprovou o potencial, já apontado previamente na literatura, de acumulação da espécie *L. angulifera* para Cu e Zn;
- ✓ Sugeriu um possível efeito do impacto ambiental sobre a morfologia dos tecidos dos moluscos;
- ✓ Indicou um aumento no parasitismo dos tecidos dos animais de áreas impactadas pela poluição;
- ✓ Confirmou a espécie de caramujo *L. angulifera* como um potencial biomonitor de impactos ambientais.

6. PERSPECTIVAS

Embora este trabalho tenha incrementado o conhecimento sobre o molusco *Littoraria angulifera* de manguezais conservados e com grande impacto antropogênico e apontado seu emprego como biomonitor em manguezais, estimula-se o desenvolvimento de trabalhos mais direcionados à compreensão da relação entre a acumulação dos elementos químicos e seus efeitos biológicos sobre os animais. Dentre eles, ressaltam-se a importância da avaliação da acumulação dos elementos químicos presentes na hemolinfa do molusco e os efeitos desses elementos químicos sobre os hemócitos, a análise dos efeitos genotóxicos da acumulação destes elementos químicos e a avaliação das vias preferenciais de acumulação dos elementos químicos por este caramujo.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. **Caiçaras na Mata Atlântica: pesquisa científica versus planejamento e gestão ambiental**. Annablume: FAPESP, p. 85-87. 2000.
- ALONGI, D. M. The impact of climate change on mangrove forests. **Current Climate Change Reports**, p. 30–39. 2015.
- AL-SUBIAI, S. N., MOODY, A. J., MUSTAFA, S. A., JHA, A. N. A multiple biomarker approach to investigate the effects of copper on the marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p. 1913-1920, 2011
- ANSALDO, M.; NAHABEDIAN, D. E.; HOLMES-BROWN, E.; AGOTE, M; ANSAY, C. V.; GUERRERO, N. R. V.; WIDER, E. A. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. **Toxicology**, v. 224, n. 1, p. 119-127, 2006
- ARAÚJO FILHO, E. F. **Análise da radiosensibilidade de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* por meio do teste do micronúcleo**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro de Tecnologia e Geociência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em: <<http://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/10113>>. Acesso em: 02/05/2016
- ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 44, p. 62-72. 1999.
- ATAEV, G. L.; KUDRYAVTSEV E. E.; PROKHOROVA, I. V.; POLEVSHCHIKOV, A. V. The influence of trematode infection on the hemocyte composition in *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata). **ISJ**, v. 13, p. 164-171, 2016.
- BALBINO, L. C.; BARCELLOS, A. O.; STONE, L. F. Marco referencial: integração lavoura-pecuária-floresta. **Embrapa Cerrados-Livros científicos (ALICE)**, p. 127. 2012.

BAUER, B.; FIORONI, P.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; OEHLMANN, J.; KALBFUS, W. The use of *Littorina littorea* for tributyltin (TBT) effect monitoring-results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments. **Environmental Pollution**, v. 96, p. 299-309. 1997.

BRASIL. **Decreto-lei nº 750, 10 de fevereiro de 1993**. Dispõe sobre o corte, a exploração e a supressão de vegetação primária ou nos estágios avançado e médio de regeneração da Mata Atlântica, e dá outras providências. Lex: Coletânea de Legislação e Jurisprudência, São Paulo, v.57, p.94-96, jan./mar. 1993.

BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 7, p. 1125-1137, 2012.

BORDEAN, D-M.; NICA D. V., HARMANESCU, M.; BANATEAN-DUNEA I.; GERGEN, I. I. Soil manganese enrichment from industrial inputs: A gastropod perspective. **Plos One**, v. 9, 8 p, 2014.

BORDON, I. C. A. C.; SARKIS, J. E. S.; ANDRADE, N. P.; HORTELLANI M. A.; FAVARO, D. I. T.; HAKAZU, M. H.; COTRIM, M. E. B.; LAVRADAS, R. T.; MOREIRA, I.; SAINT'PIERRE, T. D.; HAUSER-DAVIS, R.A. An environmental forensic approach for tropical estuaries based on metal bioaccumulation in tissues of *Callinectes danae*. **Ecotoxicology**, v. 25, p. 91-104, 2016.

BOUMANS, P.; KLOCKENKÄMPER, R. Total reflection X-ray fluorescence spectrometry. Procedure of the Second Workshop on TXRF, Dortmund. **Spectrochimica Acta**, p. 433, 1989.

BRANDÃO, I. M.; GUIMARÃES, A. S.; TRAVASSOS, P. E. P. Ecologia de paisagem: uma análise multi-temporal dos manguezais urbanos do Complexo de Salgadinho, Olinda/PE. **Anais... XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Natal, Brasil, INPE, p. 25-30. 2009.

BRUSCA, J.G.; BRUSCA, C. R. **Invertebrados**. 2º edição, Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1098p. 2007.

BUSTAMANTE, P.; GRIGIONI, S.; BOUCHER-RODONI, R.; CAURANT, F.; MIRAMAND, P. Bioaccumulation of 12 trace elements in the tissues of the nautilus *Nautilus macromphalus* from New Caledonia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, p. 688-696. 2000.

CAETANO, C. H. S.; ABSALÃO, R. S. Imposex in *Olivancillaria vesica vesica* (Gmelin) (Gastropoda, Olividae) from a Southeastern Brazilian sandy beach. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, p. 215-218. 2002.

CARPENTER, S. R. Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 11039-11040, 2008.

CASTILLO, V.; BROWN, D. I. Microscopic anatomy of the male reproductive system in *Echinolittorina peruviana* (Mollusca: Caenogastropoda). **International Journal of Morphology**, v. 26, p. 423-432, 2008.

CASTRO, I. B. D.; BRAGA, A. R. C.; ROCHA-BARREIRA, C. D. A. Altos índices de imposex em *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) em áreas portuárias dos estados de Alagoas e Sergipe, Brasil. **Tropical Oceanography**, v. 33, p. 121-128. 2005.

CASTRO, I. B. D.; CASCON, H. M.; FERNANDEZ, M. A. D. S. Imposex em *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda) uma indicação da contaminação por organoestênicos na costa do município de Fortaleza–Ceará–Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 33, p. 51-56. 2000.

CHEQUER, F. M. D. **Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-14092008-235513/>> Acesso em: 10/07/2015

CHENG, Z. S., PAN, J. H., TANG, W. C., CHEN, Q. J., LIN, Y. C. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi. **Journal of Forestry Research**, v. 20, p. 63-72. 2009.

COMPANHIA PERNAMBUCANA DO MEIO AMBIENTE - CPRH. **Plano de Gestão, Zoneamento Ecológico Econômico Costeiro – ZEEC – APA de Guadalupe Litoral Sul de Pernambuco**. Recife, CPRH, p. 1-30. 1998.

CONTI, E.; DATTILO, S.; COSTA, G.; PUGLISI, C. Bioaccumulation of trace elements in the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) from the Ionian sandy coasts of Sicily. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.129, p. 57–65, 2016.

COSTA, M. B.; ZAMPROGNO, G. C.; PEDRUZZI, F. C.; DALBEM, G. B.; TOGNELLA, M. M. P. Assessing the continuous impact of Tributyltin from antifouling paints in a Brazilian mangrove area using intersex in *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) as biomarker. **International Journal of Oceanography**, 8p. 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijoocean/2013/769415/cta/>>. Acesso em: 18/07/2015

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, p. 13-23. 2006.

COVA, A. W.; SERAFIM JÚNIOR, M.; BOEHS, G.; SOUZA, J. M. D. Parasites in the mangrove Oyster *Crassostrea rhizophorae* cultivated in the estuary of the Graciosa River in Taperoá, Bahia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 21-27, 2015.

CUNHA, A.; GUIMARÃES, A. S. Biologia reprodutiva dos teleósteos no manguezal Chico Science, Olinda-PE. In: MANGROVE 2000, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 65p. 2000.

DALLINGER, R.; BERGER, B.; TRIEBSKORN-KÖHLER, R.; KÖHLER, H. Soil biology and ecotoxicology In: **The biology of terrestrial mollusks**. BARKER G. M.; CABI publishing, p. 489-527. 2001.

DALLINGER, R. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: DALLINGER, R.; RAINBOW, P.S. (eds) **Ecotoxicology of metals in invertebrates**. Boca Raton, Florida, p. 245–289. 1994.

DATE, A. R.; GRAY, A.L. **Applications of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, Blackie & Son Ltd., London, 254 p. 1989.

DEAN, W. **A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira**. São Paulo: Companhia das Letras, 484 p. 1996.

DE FREITAS TALLARICO, L.; BORRELY, S. I.; HAMADA, N.; GRAZEFTE, V. S.; OHLWEILER, F. P.; OKAZAKI, K.; GRANATELLI, A. T.; PEREIRA, I. W.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 208-215, 2014.

DEPLEDGE, M. H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, p. 109-122, 1998.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (Eds). **Eurachem/CITAC guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement**, 3^{ed}, 2012. disponível em: <www.eurachem.org>. Acesso em 15 de Junho de 2015

FARRAPEIRA, C. M. R.; RAMOS, C. A. C.; BARBOSA, D.F.; MELO, A. V. O. M.; PINTO, S. L.; VERÇOSA, M. M.; OLIVEIRA, D. A. S.; FRANCISCO, J. A. Zonación vertical del macrobentos de sustratos sólidos del estuário del río Massangana, Bahía de Suape, Pernambuco. **Brasil Biota Neotropica**, v. 9, p. 87-100, 2009.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147, p. 29-36, 1985.

FERRARI, A. A.; FRANÇA, E. J.; DE NADAI FERNANDES, E.A.; BACCHI, M.A. Surface contamination effects on leaf chemical composition in the Atlantic Forest. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 270, n. 1, p. 69-73, 2006

FERREIRA-JR, A. L.; CARVALHO, I. F. P.; ABSHER, T. M.; CRISTO, S. W. Reprodução e potenciais impactos sobre *Littorina flava* (neogastropoda: littorinidae) na Ilha do Mel, Paraná Braz. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 18, p. 53-57. 2014.

FIGUEIREDO, C. S.; SILVA, C. B. V.; LUCENA, A. D. L. S.; COSTA, R. S.; FALTAY, P.; SILVA, V. L.; MOTTA, M. Manguezal Chico Science: Avaliação da composição hídrica. **Anais...** Congresso sobre Planejamento e Gestão das Zonas Costeiras dos Países de Expressão Portuguesa, Recife. 2003.

FISCHER, M. L.; COLLEY, E. Espécie invasora em reservas naturais: caracterização da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca-Achatinidae) na Ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 127-144. 2005.

FLORES, M; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista de Saúde e Pesquisa**, v. 1, p. 337-340. 2009.

FRANÇA, E. J. **A biomonitoração da Mata Atlântica na conservação da biodiversidade: Espécies arbóreas nativas acumuladoras de elementos químicos**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2006. 362 p. Tese de Doutorado Direto.

FRÄNZLE, S.; MARKERT, B. The Biological System of the Elements (BSE) - a brief introduction into historical and applied aspects with special reference on “ecotoxicological identity cards” for different element species (e.g. As and Sn). **Environmental Pollution**, v. 120, p. 27 - 45. 2002.

FRÄNZLE, S.; MARKERT, B. The Biological System of the Elements (BSE). Part II: a theoretical model for establishing the essentiality of chemical elements. The application of stoichiometric network analysis to the Biological System of the Elements. **The Science of the Total Environment**, v. 249, p. 223-241. 2000.

GAGNAIRE, B.; THOMAS-GUYON, H.; RENAULT, T. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 501-512, 2004.

GALLAGHER, S. B.; REID, G. K. Reproductive behavior and early development in *Littorina scabra*, *Littorina angulifera* and *Littorina irrorata* (Gastropoda: Prosobranchia) in the Tampa Bay region of Florida. **Malacological Review**, v. 7, p. 105-125, 1974.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica**, v. 59, p. 376-381. 2007.

GEREMIA, G. **Análise de micronúcleos em hemócitos de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira, Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. Monografia (Conclusão do Curso de Ciências Biológicas: Ênfase em Gestão Ambiental, Marinha e Costeira: Bacharelado) –Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000365930>>. Acesso em: 23/05/2016.

GIBBS, P. E.; BRYAN, G. W. TBT paints and demise of the dog-whelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). **Marine Biological Association of the U.K.**, v.68, p. 1482 - 1487. 1987.

GOMOT DE VAUFLEURY, A.; PIHAN, F. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. **Chemosphere**, v. 40, p. 275-284. 2000.

GORBUSHIN, A. M; IAKOVLEVA, N. V. Functional characterization of *Littorina littorea* (Gastropoda: Prosobranchia) blood cells. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 87, p. 741-746. 2007.

GREEN, I. D.; WALMSLEY, K. Time-response relationships for the accumulation of Cu, Ni and Zn by seven-spotted ladybirds (*Coccinella septempunctata*) under conditions of single and combined metal exposure. **Chemosphere**, v. 93, p. 184–189, 2013.

GUTIERREZ P. C. The ecology and behavior of the mangrove periwinkle, *Littorina angulifera*. **Biotropica**, v. 20, p. 352-356. 1988.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 123, p. 61-118, 1983.

HAMED, S. S.; ABDELMEGUIED, N. E.; ESSAWY, A. E.; RADWAN, M. A.; HEGAZY, A. E. Histological and ultrastructural changes induced by two carbamate molluscicides on the digestive gland of *Eobania vermiculata*. **Journal of Biological Science**, v. 7, p. 1017-1037, 2007.

HIROTA M. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2013-2014, Relatório Técnico**. Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto de Pesquisas Espaciais. São Paulo, 60p, 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. ISO 13528 **Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons**. Genebra: ISO, 66p. 2005.

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.

KANG, S. G.; CHOI, M. S.; OH, I. S.; WRIGHT, D. A.; KOH, C. H. Assessment of metal pollution in Onsan Bay, Korea using Asian periwinkle *Littorina brevicula* as a biomonitor. **The Science of the Total Environment**, v. 234, p. 127-137. 1999.

KAVUN, V. Y.; SHULKIN, V. M.; KHRISTOFOROVA, N. K. Metal accumulation in mussels of the Kuril Islands, north-west Pacific Ocean. **Marine Environmental Research**, v. 53, p. 219-226. 2002.

KISSLING, G. E. DERTINGER, S. D.; HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: Dependence on number of cells scored and inter-animal variability. **Mutation Research** v.634, p. 235-240. 2007

KJERFVE, B.; LACERDA, L. D. Mangroves of Brazil. In: **Conservation and sustainable utilization of mangrove forest in Latin America and Africa regions**. Lacerda, L. D. (Ed.). p. 272 , 1993.

KLEIN, C.; DUTROW, B. **Manual de Ciência dos Minerais** - 23ª Ed. Editora; Bookman., p. 706, 2012.

KOHLMEYER, J.; BEBOUT, B. On the occurrence of marine fungi in diet of *Littoraria angulifera* and observations on the behavior of the periwinkle. **Marine Ecology** v.7, p. 333-343. 1986.

KRUG, F. J.; NOBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Espectrômetro de absorção atômica Parte 1. **Fundamentos e atomização com chama**. Apostila, Universidade de São Paulo, 40p. 2004.

LAJUNEN, L.H.J. **Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992, p. 241 (LCA - UNIVERSIDADE DE AVEIRO. Procedimentos de digestão. Disponível em: <<http://www.ua.pt/lca/>>. Acesso em 08 de junho de 2014).

LEDERER, C.M.; HOLLANDER, J. M.; PEARLMAN, I. **Table of Isotopes**, 6.ed. New York, John Wiley, 594p. 1967.

LEME, J. L. M. Sistemática e biogeografia: morfologia geral dos moluscos, em particular da Classe Gastropoda. In: BARBOSA, F. S. **Tópicos em malacologia médica**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 314 p. 1995.

LEVINTON, J. S. **Marine biology: function, biodiversity ecology**. Oxford University Press. 420 p. 2001.

LYRA, D. T. **Determinação de elementos químicos de solos e sedimentos em suspensão para monitoração da qualidade ambiental de manguezal de Pernambuco.** Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro de Tecnologia e Geociência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016. No Prelo.

MAGALHÃES, M. R. L. **Concentrações naturais de elementos químicos da Classe Insecta do fragmento florestal de Mata Atlântica Reserva Charles Darwin.** Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 94p. 2015.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; CARVALHO, M. L.; HIDALGO, M. Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. **Analytica Chimica Acta**, v.549, p. 197-204, 2005.

MARKERT, B. Inorganic chemical investigations in the Forest Biosphere Reserve near Kalinin, USSR. I. Mosses and peat profiles as bioindicators for different chemical elements. **Vegetatio**, v. 95, p. 127-135, 1991.

MARKERT, B.; KAYSER, G.; KORHAMMER, S.; OEHLMANN. Distribution and effects of trace substances in soils, plants and animals. In: MARKERT, B.; FRIESE, K. (Ed.) **Trace elements: their distribution and effects in the environment.** Oxford: Elsevier, p. 3-31, 2000.

MARTIN, M. H. COUGHTREY, P. J. **Biological monitoring of heavy metal pollution.** **Land and air.** 475p. 1982.

MATTEWS, H. R.; FERREIRA-CORREIA, M. M.; SOUSA, N. R. Levantamento da fauna aquática da Ilha de São Luís (Estado do Maranhão, Brasil). I_Molusca **Boletim do Laboratório Hidrobiologia São Luís** v. 1, p. 9-22, 1977.

MATTHEWS-CASCON, H.; LOTUFO, T. M. C. Biota marinha da costa oeste do Ceará. **Série Biodiversidade**, v. 24, 248p. 2006.

MELO, C. G. B.; MAIA, R. C.; ROCHA-BARREIRA, C. A. Variação morfológica da concha e densidade populacional de *Littoraria angulifera* (Mollusca:Gastropoda) em manguezais do ceará, Brasil. **Arquivo Ciência do Mar**, v. 45. n. 2. p. 68 – 76, 2012.

MÉLO, J. T. B. **Moluscos terrestres *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* como biomonitores da qualidade ambiental de manguezais pernambucanos.** Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 79p. 2014.

MELQUIADES, F. L.; GONÇALVES, G. W. P. S.; SILVA, W. D.; PARREIRA, P. S. P.; APPOLONI, C. R. Monitoramento de metais nos lagos Igapó em Londrina, PR, usando a metodologia de EDXRF. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 29, p. 129-138, 2008.

MERTZ, W. **Trace elements in human and animal nutrition.** Elsevier, 480p. 2012.

MINCHIN, D.; STROBEN, E.; OEHLMANN, J.; BAUER, B.; DUGGAN, C. B.; KEATINGE, M. Biological indicators used to map organizing contamination in Cork Harbour, Ireland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p. 188-195, 1996.

NAKANO, E.; WATANABE, L. C.; OHLWEILER, F. P.; DE BRAGANÇA PEREIRA, C. A.; KAWANO, T. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, p. 145-154, 2003.

NAVARRO, T. E. M.; DOMINGUEZ, C. R. C. O uso da imagem como recurso didático no ensino de ciências na educação infantil. **Anais...** Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências, v. 7, p. 1-11. 2009.

ODUM, E. P. **Ecologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 387- 421. 2012.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Mollusks as bioindicators. In: MARKET, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications.** London: Elsevier, 2003, p. 577-635.

ONG, J. E.; GONG, W. K. Structure, function and management of mangrove ecosystems. **ISME Mangrove Educational Book Series**, n. 2. 2013.

PAIVA, J. D. S. **Plantas nativas da costa pernambucana acumuladoras de radionuclídeos**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014. 78p.

PAIVA, J. D. S.; SOUSA, E. E.; FARIAS, E. E.; DO CARMO, A. M.; SILVA FILHO, C. A.; FRANÇA, E. J. Applied tools for determining low-activity radionuclides in large environmental samples. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, p.1-6, 2015.

PAMPANIN, D. M.; LARSEN, E.; PROVAN, F.; SIVERTSVIK, M.; RUOFF, P.; SYDNES, M. O. Detection of small bioactive peptides from Atlantic herring (*Clupea harengus L.*). **Peptides**, v. 34, p. 423-426, 2012.

PINHEIRO, M. A. A.; DUARTE, L. F. A.; TOLEDO, T. R.; ADAM, M. L.; TORRES, R. A. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 8273-8285, 2013.

PHILLIPS, D. J. H.; RAINBOW, P. S. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. **Springer Science & Business Media**, v. 37, p. 1-9. 2013.

REGOLI, F. GORBI, S.; FATTORINI, D.; TEDESCO, S.; NOTTI, A.; MACHELLA, N.; BOCCHETTI, R.; BENEDETTI, M.; PIVA, F. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. **Environmental Health Perspectives**, p. 63-69, 2006.

REID, D. G. Habitat and zonation patterns of *Littoraria* species (Gastropoda: Littorinidae) in Indo-Pacific mangrove forests. **Biological Journal of the Linnean Society**. v. 26, p. 39-68. 1985.

REID, D. G. The comparative morphology, phylogeny and evolution of the gastropod family Littorinidae. **The Royal Society**. v. 324, p. 1-11. 1989.

REID, D. G.; DYAL, P.; WILLIAMS, S.T. Global diversification of mangrove fauna: a molecular phylogeny of *Littoraria* (Gastropoda: Littorinidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** v.55 p.185-201. 2010.

RICARDO, F.; GÉNIO, L.; LEAL, M. C.; ALBUQUERQUE, R.; QUEIROGA, H.; ROSA, R.; CALADO, R. Trace element fingerprinting of cockle (*Cerastoderma edule*) shells can reveal harvesting location in adjacent areas. **Scientific reports**, v. 5, 2015

RICKLEFS, R.E. **A economia da natureza**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 503 p. 2009.

ROHR, R.; AMATO, A.; S. B. Contribuição para o conhecimento e quantificação dos hemócitos de *Bradybaena similaris* e *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Stylommatophora), Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Zoologia**, v. 104, n. 2 2014.

ROMERO, A.; ESTEVEZ-CALVAR, N.; DIOS, S.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis*. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17003, 2011

RUDELL, C. L.; RAINS, D. W. The relationship between zinc, copper and the basophils of two crassostreid oyster, *C. gigas* and *C. virginica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**. v. 51, p. 585-591, 1975.

RUPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Filo Molusca, In: **Zoologia dos invertebrados**, 7 ed. São Paulo: Roca. p. 353-484. 2005.

SANDILYAN, S.; KATHIRESAN K. Mangrove conservation: a global perspective **Biodiversity and Conservation**, v.21, 3523-3542. 2012.

SANTOS, C. H. DOS A.; LOURENÇO, J. A.; NETO, F. H. F. B.; COSTA, O. R.; IGARASHI, M. A. **Características dos ecossistemas estuarinos brasileiros e as atividades**

antrópicas. 2006. Disponível em: <http://www.prex.ufc.br/formularios/Meio_Ambiente_2006/ECOSSISTEMAS%20ESTUARINOS%20BRASILEIROS.pdf> Acesso em 15/05/2015.

SANTOS, D. C. M.; CUPERTINO, M. DO C.; MATTA, S. L.; PINTO DA, O. J.; ALVES DE, S. J. ABDALA, D. Histological alterations in liver and testis of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. **Revista Ceres**, v. 62, p. 133-141, 2015.

SANTOS, I. T. Q. P. **Avaliação da atividade clastogênica do resíduo catalítico industrial, por meio do bioensaio de micronúcleos com *Tradescantia pallida* cv. *purpurea***. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2004. Disponível em:<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-04082005-131203/en.php>>. Acesso em: 08/07/ 2015.

SANTOS, M. C.; MARTIN, W.; WU, B.; SCHEIDER, J.; ODHLMANN, J.; CADORE, S.; BECKER, J. S. Biomonitoring of metal contamination in a marine prosobranch snail (*Nassarius reticulatus*) by imaging Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS). **Talanta**, v. 80, p. 428-433. 2009.

SANTOS, T. O. **Biomonitoração da qualidade do ar na Região Metropolitana do Recife**. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro de Tecnologia e Geociência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 120p. 2016.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal: Ecossistema entre a terra e o mar**. 1ªed. São Paulo: Caribbean Ecological Research, 64p. 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI Y. Manguezais brasileiros: região sudeste-sul. **Anais...** Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste: Síntese dos Conhecimentos. 78 p. 1989.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente, 5ªed, **Editora Santos**, São Paulo, 611 p. 2002.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO, 2004. **Os Biomas e suas florestas**. Disponível em: <<http://www.florestal.gov.br/snif/images/stories/RecursosFlorestais/biomas.jpg>>. Acesso em: 07/05/2015.

SILVA, A. S. C. **Padrões de distribuição genotípica em litorinídeos (Mollusca: Gastropoda) da Costa Brasileira**. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000365930>>. Acesso em: 23/04/2015.

SILVA, A. C.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Perquirere**. v. 7, p. 167-79, 2010.

SILVA, L. R. S; **Deteção de micronúcleo em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* exposto a radiação gama de ⁶⁰Co**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro de Tecnologia e Geociência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010. Disponível em: <http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/9311/arquivo2675_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 26/02/ 2015.

SILVA, M. H. D.; SILVA-CUNHA, M. D. G. G. D.; PASSAVANTE, J. Z. D. O.; GREGO, C. K. D. S.; MUNIZ, K. Estrutura sazonal e espacial do microfitoplâncton no estuário tropical do Rio Formoso, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 23, p 355-a. 2009.

SILVA, P. P.; PESO-AGUIAR, M. C.; RIBEIRO, G. Ciclo gametogênico e comportamento reprodutivo de *Iphigenia brasiliiana* (Mollusca, Bivalvia, Donacidae) no estuário do rio Subaé, Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. **Iheringia**, v. 102, p. 359-369, 2012.

SILVA, J. J. A. O manguezal e a sociedade pernambucana-Brasil. **Revista Geográfica de América Central**, p. 1-22. 2011.

SISCOM/IBAMA. Disponível em: <<http://siscom.ibama.gov.br/novo/mapas>> .Acesso em: 29/06/15.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed, Bookman, Porto Alegre, Brasil, 836p. 2002.

SMITH, BLAKEMAN S. Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. **Journal of Molluscan Studies**, v. 39, n. 5, p. 377-378, 1971.

SPALDING, M.; BLASCO, F.; FIELD, C. **World mangrove atlas**. ISME, Okinawa, p.178, 1997.

SOUSA, E. E.; PAIVA, J. D. S.; FRANÇA, E. J.; ALMEIDA, M. E. S.; CANTINHA, R. S.; HAZIN, C. A. Qualidade nas análises químicas de matrizes biológicas pela Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia. **International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013**. Recife, 2013. 1 DVD-Rom.

TREVISAN, R.; FLESCHE, S.; MATTOS, J. J.; MILANI, M. R.; BAINY, A. C. D.; DAFRE, A. L. Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 159, p. 22-30, 2014.

USHEVA, L. N.; VASCHENKO, M. A.; DURKINA, V. B. Histopathology of the digestive gland of the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 32, p. 166-172, 2006.

VAN DER KNAAP, W. P. W.; LOKER, E. S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. **Parasitology Today**, v. 6, p. 175-182, 1990.

VANNUCCI, M. **Os manguezais e nós**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. 244 p.

VASCONCELOS, D. M.; SANTOS, P. J. P.; TRINDADE, R. L. Distribuição espacial da meiofauna no estuário do Rio Formoso, Pernambuco, Brasil. **Atlântica**, v. 26, p.45-54. 2004.

VILLELA, I. V.; DE OLIVEIRA, I. M.; DA SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, p. 78-86, 2006.

WALD, A. Tests of Statistical Hypothesis Concerning Several Parameters when the Number of Observations is Large. **Transactions of the American Mathematical Society**, v. 54, p.426-482. 1943.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3^a ed., VCH, Weinheim, 1999, 964 p.

WORMS. *Littorina angulifera*. World register of marine species at Versão 2014 <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=224234>> Acesso em: 07/01/2015.

WILSON, E. B. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. **Journal of the American Statistical Association**, v. 22, p.209 – 212. 1927.

XIAO, Y.; PEIJNENBURG, W. J.; CHEN, G.; VIJVER, M. G. Toxicity of copper nanoparticles to *Daphnia magna* under different exposure conditions. **Science of The Total Environment**, v. 563, p. 81-88, 2016.

YANG, J.; LIU, D.; JING, W.; DAHMS, H. U.; WANG, L. Effects of Cadmium on lipid storage and metabolism in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. **Plos one**, v. 8, n. 10, p. e77569, 2013.

ZEIDAN, G. C.; LUZ, M. S. A.; BOEHS, G. Parasites of economically important bivalves from the southern coast of Bahia State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 391-398, 2012.