



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
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

WILLIAMS NASCIMENTO DE SIQUEIRA

**ASPECTOS QUÍMICOS E GENÉTICOS DO *Biomphalaria glabrata* COMO
BIOINDICADOR/BIOMONITOR DE QUALIDADE AMBIENTAL**

Recife
2019

WILLIAMS NASCIMENTO DE SIQUEIRA

**ASPECTOS QUÍMICOS E GENÉTICOS DO *Biomphalaria glabrata* COMO
BIOINDICADOR/BIOMONITOR DE QUALIDADE AMBIENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares.

Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir De França

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

Recife

2019

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

- S618a Siqueira, Williams Nascimento de.
Aspectos químicos e genéticos do *Biomphalaria glabrata* como bioindicador/biomonitor de qualidade ambiental. / Williams Nascimento de Siqueira. - Recife, 2019.
117 f. : il.
- Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2019.
Inclui referências e anexos.
1. Engenharia nuclear. 2. Bioacumulação. 3. *Biomphalaria glabrata*. 4. Genotoxicidade. 5. Hemócito. 6. Lodo de esgoto.
I. França, Elvis Joacir de, orientador. II. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque, coorientadora. III. Título.

WILLIAMS NASCIMENTO DE SIQUEIRA

**ASPECTOS QUÍMICOS E GENÉTICOS DO *Biomphalaria glabrata* COMO
BIOINDICADOR/BIOMONITOR DE QUALIDADE AMBIENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares.

Aprovada em: 09/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elvis Joacir de França - CRCN-NE/CNEN

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo - DBR/UFPE

Prof^a. Dr^a. Vláudia Maria Assis Costa - DMT/UFPE

Prof. Dr. Thiago Oliveira do Santos - SEAMB/CRCN-NE

Prof^a. Dr^a. Luanna Ribeiro Santos Silva - NUP/FACOL

Prof. Dr. Francisco Fernandes Amâncio - DBR/UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, acima de tudo aos meus pais Aurilene Nascimento de Siqueira e Ugleces Barbosa de Siqueira, sinônimos de dedicação, amor e carinho durante toda minha vida e que sempre me apoiaram e ajudaram em todos os momentos.

À minha irmã Áurea pelo carinho ao longo da vida.

À Mariana Cosme, minha namorada, por seu amor, companheirismo e por estar ao meu lado me apoiando.

Aos meus orientadores Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo e Elvis Joacir de França pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e amizade.

A todos os meus amigos do Laboratório de Radiobiologia Luís, Douglas, Dewson, Hianna, Maíra, Maria Luiza, Ricardo, Vinícius, Larissa, Gabrielly e Ingrid.

Aos meus amigos do Serviço de Monitoração Ambiental no CRCN-NE Mariana, Marcelo, Julyane, Katarine, Paulo, Fabiano, Robson, Thiago, Karol, Alberto, Crescêncio e Alesxandro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares (PROTEN) pelo apoio à minha formação.

A todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento desse estudo.

RESUMO

Em várias regiões do mundo, os rejeitos produzidos nas residências e indústrias são as principais fontes de poluentes do ecossistema aquático de água doce. Deste modo, torna-se imperativo o emprego de metodologias que auxiliem nos procedimentos de monitoração ambiental. Assim, o uso de organismos como biomonitores vêm crescendo cada vez mais na atualidade, sendo utilizados modelos que apresentem respostas que possam ser adequadamente avaliadas. Neste trabalho, foi investigado os efeitos genotóxicos e citotóxicos ocasionados por elementos químicos presentes no lodo de esgoto doméstico e industrial por meio da análise de alterações em biomarcadores e da bioacumulação de elementos químicos presentes no molusco *Biomphalaria glabrata*. Para a realização dos testes, foram utilizadas as concentrações de 50, 100, 150 e 500 mg/L dos materiais de referência SRM 2781 *Domestic Sludge* and SRM 2782 *Industrial Sludge*. Todos os ensaios foram executados após os animais serem submetidos aos lodos de forma aguda (horas) e crônica (15 dias). Foram realizados ensaios de toxicidade com caramujos adultos e embriões. Em seguida, foi procedida a contagem de hemócitos por meio da quantificação de células viáveis com auxílio da câmara de Neubauer. Posteriormente, os hemócitos foram analisados quanto a presença de alterações citoplasmáticas e nucleares. Subsequentemente, o teste do cometa foi realizado para quantificar os danos genotóxicos originados pela exposição aos lodos. Além dos biomarcadores, foram realizadas quantificações dos elementos químicos acumulados nos tecidos moles do molusco com a utilização de técnicas espectrométricas GFAAS e ICP-MS. Os caramujos adultos e embriões de *B. glabrata* expostos aos lodos não apresentaram alterações morfológicas significativas, nem alterações na viabilidade celular dos hemócitos. No entanto, os lodos ocasionaram efeitos deletérios nos moluscos confirmados após a realização dos testes de genotoxicidade celular. As análises químicas demonstraram a presença de vários elementos químicos no corpo dos caramujos expostos aos lodos, sendo alguns considerados tóxicos em elevadas concentrações. Portanto, os lodos de esgoto doméstico e industrial provavelmente provocaram danos genotóxicos e citotóxicos nas células dos moluscos em decorrência da presença de altas concentrações de elementos químicos bioacumulados em seus tecidos.

Palavras-chave: Bioacumulação. *Biomphalaria glabrata*. Genotoxicidade. Hemócito. Lodo de esgoto.

ABSTRACT

In many regions of the world, tailings produced in homes and industries are the main sources of pollutants for the freshwater aquatic ecosystem. Therefore, it is imperative to use methodologies that may help in environmental monitoring procedures. Thus, the use of organisms as biomonitors has been growing increasingly in the present time, using models that present answers that can be adequately evaluated. In this work, we investigated the genotoxic and cytotoxic effects caused by chemical elements present in domestic and industrial sewage sludge by analyzing changes in biomarkers and bioaccumulation of chemical elements present in the mollusk *Biomphalaria glabrata*. For the tests, the concentrations of 50, 100, 150 and 500 mg/L of the reference materials SRM 2781 Domestic Sludge and SRM 2782 Industrial Sludge were used. All the tests were performed after the acute (48 hours) and chronic (15 days) exposure of animals to the sludges. Toxicity tests were performed with adult snails and embryos. Hemocytes were then counted by means of the quantification of viable cells with the aid of the Neubauer chamber. Subsequently, the hemocytes were analyzed for the presence of cytoplasmic and nuclear alterations. Then, the comet test was performed to quantify the genotoxic damage caused by exposure to sludges. In addition to the biomarkers, the chemical elements accumulated in the soft tissues of the mollusk were measured using GFAAS and ICP-MS spectrometric techniques. The adult snails and embryos of *B. glabrata* exposed to the sludge did not present significant morphological alterations, nor did they alter the cellular viability of the hemocytes. However, the sludge caused deleterious effects on the mollusks confirmed after performing the cellular genotoxicity tests. The chemical analyzes showed the presence of several chemical elements in the body of the snails exposed to the sludge, some being considered toxic in high concentrations. Therefore, the domestic and industrial sludges probably caused genotoxic and cytotoxic damages in mollusk cells due to the presence of high concentrations of bioaccumulated chemical elements in their tissues.

Keywords: Bioaccumulation. *Biomphalaria glabrata*. Genotoxicity. Hemocyte. Sewage sludge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exemplo do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i>	29
Figura 2 -	Corpo do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i>	30
Figura 3 -	Distribuição espacial de <i>Biomphalaria glabrata</i> no Brasil.....	31
Figura 4 -	Aquários de criação do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i>	34
Figura 5 -	Equipamento para análises químicas por GFAAS (acima) e ICP-MS (abaixo).....	38
Figura 6 -	Representação de um nucleóide padrão e seus respectivos graus de classificação (Grau 0 - 4) de acordo com a extensão do dano observado durante análise das lâminas por meio de um microscópio de fluorescência.....	43
Figura 7 -	Comparação entre as concentrações de cádmio quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.....	45
Figura 8 -	Relação entre a quantidade de cádmio no substrato (lodo) e seu respectivo fator de acumulação.....	47
Figura 9 -	Comparação entre as concentrações de níquel quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.....	49
Figura 10 -	Relação entre a quantidade de níquel no substrato (lodo) e seu respectivo fator de acumulação.....	50
Figura 11 -	Comparação entre as concentrações de molibdênio quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.....	52
Figura 12 -	Relação entre a quantidade de molibdênio no lodo doméstico e industrial e fator de acumulação.....	53
Figura 13 -	Comparação entre as concentrações de manganês quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.....	55
Figura 14 -	Relação entre a quantidade de manganês no substrato (lodo) e seu respectivo fator de acumulação.....	56
Figura 15 -	Comparação entre as concentrações de cobre quantificado no	

	corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.....	59
Figura 16 -	Relação entre a quantidade de cobre no lodo doméstico e industrial e seu respectivo fator de acumulação.....	60
Figura 17 -	Comparação entre as concentrações de urânio quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.....	62
Figura 18 -	Relação entre a quantidade de urânio no lodo de esgoto industrial e seu respectivo fator de acumulação.....	63
Figura 19 -	Comparação entre as concentrações de tório quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas aos lodos de esgoto doméstico e industrial.....	65
Figura 20 -	Relação entre a quantidade de tório no lodo industrial e seu respectivo fator de acumulação para exposição de 48 horas.....	66
Figura 21 -	Embriões de <i>B. glabrata</i> expostos ao lodo doméstico e industrial em diferentes períodos (24 h, 48 h e 8 dias). Para análise estatística foi realizado o teste ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações. O resultado foi expresso como média $\pm$ erro padrão da média.....	69
Figura 22 -	Número de células observadas após exposição aguda (48 h) e crônica (15 dias) ao lodo de esgoto doméstico A relação * vs. C indica que ocorreu diferença significativa com grau de confiança de 95% ($p < 0,05$).....	70
Figura 23 -	Número de células observadas após exposição aguda (48 h) e crônica (15 dias) ao lodo de esgoto industrial A relação * vs. C indica que ocorreu diferença significativa com grau de confiança de 95% ($p < 0,05$).....	71
Figura 24 -	Exemplos de diferentes morfologias celulares após exposição ao lodo de esgoto doméstico e industrial. A) Micronúcleo; B) Célula binucleada; C) Apoptose.....	73
Figura 25 -	Percentuais de alterações celulares em hemócitos de <i>B. glabrata</i> após exposição ao lodo doméstico durante 48 horas. C = Controle, LD = Lodo Doméstico, MN = Micronúcleos, CB =	

	Células Binucleadas e AP = Apoptose.....	74
Figura 26 -	Percentuais de alterações celulares em hemócitos de <i>B. glabrata</i> após exposição ao lodo doméstico durante 15 dias. C = Controle, LD = Lodo Doméstico, MN = Micronúcleos, CB = Células Binucleadas e AP = Apoptose.....	75
Figura 27 -	Percentuais de alterações celulares em hemócitos de <i>B. glabrata</i> após exposição ao lodo industrial durante 48 horas. C = Controle, LI = Lodo Industrial, MN = Micronúcleos, CB = Células Binucleadas e AP = Apoptose.....	76
Figura 28 -	Percentuais de alterações celulares em hemócitos de <i>B. glabrata</i> após serem submetidos ao lodo industrial durante 15 dias. C = Controle, LI = Lodo Industrial, MN = Micronúcleos, CB = Células Binucleadas e AP = Apoptose.....	77
Figura 29 -	Imagens de nucleóides de hemócitos de <i>B. glabrata</i> expostos ao lodo doméstico, com os variados graus de danos (0 - 4).....	83
Figura 30 -	Dano ao DNA dos hemócitos de <i>B. glabrata</i> determinado pelo ensaio do cometa após exposição aguda e crônica ao lodo de esgoto doméstico. C = Controle e LD = Lodo Doméstico.....	84
Figura 31 -	Dano ao DNA dos hemócitos de <i>B. glabrata</i> determinado pelo ensaio do cometa após exposição aguda e crônica ao lodo de esgoto industrial. C = Controle e LI = Lodo Industrial.....	85
Figura 32 -	Imagens de nucleóides de hemócitos de <i>B. glabrata</i> expostos ao lodo industrial com diferentes graus de danos (0 - 4).....	86
Figura 33 -	Dendrograma sintetizando agrupamento dos resultados da bioacumulação e ensaios genotóxicos de acordo com suas semelhanças.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Exposição dos moluscos adultos de <i>B. glabrata</i> ao lodo de esgoto doméstico e industrial durante o período de 48 horas e 15 dias.....	68
------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	Poluição ambiental.....	16
2.2	Poluição do ar.....	16
2.3	Poluição do solo.....	18
2.4	Poluição da água.....	18
2.5	Contaminação ambiental por elementos químicos.....	19
2.6	Efeito genotóxico das substâncias no ambiente aquático.....	22
2.7	Lodo de esgoto.....	23
2.8	Bioindicador e biomarcador.....	24
2.9	<i>Biomphalaria glabrata</i>.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Criação e manutenção do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i>.....	33
3.2	Lodos utilizados no estudo.....	34
3.3	Bioacumulação de elementos químicos por <i>Biomphalaria glabrata</i>.....	35
3.3.1	Preparação das amostras para análise.....	35
3.3.2	Tratamento químico para análise por GFAAS e ICP-MS.....	36
3.3.3	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS).....	37
3.3.4	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS).....	37
3.4	Toxicidade aguda em moluscos adultos de <i>Biomphalaria glabrata</i>.....	39
3.5	Exposição crônica dos moluscos adultos de <i>Biomphalaria glabrata</i>.....	39
3.6	Embriotoxicidade.....	39
3.7	Determinação da quantidade de células viáveis.....	40
3.8	Análise de alterações nos hemócitos.....	41
3.9	Ensaio cometa.....	41
3.9.1	Montagem das lâminas.....	41
3.9.2	Análise das lâminas por meio do microscópio de fluorescência.....	42
3.10	Análises dos resultados.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1	Bioacumulação de elementos químicos nos tecidos de <i>B. glabrata</i>.....	44

4.1.1	Cádmio (Cd).....	44
4.1.2	Níquel (Ni).....	48
4.1.3	Molibdênio (Mo).....	52
4.1.4	Manganês (Mn).....	55
4.1.5	Cobre (Cu).....	58
4.1.6	Urânio (U).....	61
4.1.7	Tório (Th).....	64
4.2	Avaliação da toxicidade em moluscos adultos expostos ao lodo doméstico e industrial.....	67
4.3	Embriotoxicidade do lodo doméstico e industrial.....	68
4.4	Quantidade de células viáveis após exposição aos lodos de esgoto.....	70
4.5	Ensaio do micronúcleo.....	73
4.6	Ensaio cometa.....	83
4.7	Agrupamento dos resultados de bioacumulação e dos ensaios genotóxicos.....	88
5	CONCLUSÕES.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91
	ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO MATERIAL DE REFERÊNCIA SRM 2781 – <i>Domestic Sludge</i>.....	104
	ANEXO B – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO MATERIAL DE REFERÊNCIA SRM 2782 – <i>Industrial Sludge</i>.....	112

1 INTRODUÇÃO

A constante preocupação com a monitoração dos ambientes aquáticos é necessária, pois os danos ocasionados por poluentes potencialmente genotóxicos no meio são pouco conhecidos. Sabe-se, porém, do potencial genotóxico e mutagênico, presente em alguns poluentes aquáticos (TALLARICO et al., 2014). O aperfeiçoamento de metodologias capazes de detectar e quantificar a existência desses agentes genotóxicos em meio aquático torna-se de suma importância para que agências de vigilâncias ambientais sejam capazes de elaborar e implementar procedimentos que possam suprimir ou reduzir a presença das substâncias poluentes, tais como os lodos de esgoto doméstico e industrial.

Por ser constituído de uma complexa mistura de substâncias químicas, a composição e propriedades dos lodos de esgoto produzidos por estações de tratamento são variáveis, pois dependem da característica das águas residuais e da concentração de poluentes presentes, método de tratamento utilizado, legislação seguida, requisitos de recuperação de água, fases de processamento, variações sazonais, duração e condições de armazenamento e dos agentes coagulantes utilizados (SYED-HASSAN et al., 2017; ZAKER et al., 2019). Dentre as principais substâncias poluentes encontradas nos lodos de esgotos podem ser mencionados os vários elementos químicos tóxicos, incluindo zinco, cobre, níquel, cádmio, chumbo, mercúrio e cromo, além de compostos orgânicos como os bifenilos policlorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, dibenzodioxinas policloradas, dibenzofuranos policlorados, sulfonato de alquilbenzeno linear e alquilfenóis (BARAKAT et al., 2017).

Dessa forma, várias espécies de moluscos de água doce e marinhos, bem como terrestres têm sido empregados para avaliar danos no material genético *in vitro* e *in vivo*. Estudos foram feitos em vários tipos de células desde linhagens embrionárias até adultas, tais como hemócitos, células oriundas das brânquias, hepatopâncreas e glândulas digestivas, em que foram demonstrados os efeitos deletérios das radiações ionizantes, não ionizantes e de várias substâncias químicas, entre os quais os elementos químicos tóxicos, por meio de ensaios de genotoxicidade, como o ensaio cometa, produzindo resultados positivos, indicando efeitos danosos ao DNA (GAJSKI et al., 2019). O teste do micronúcleo também tem sido muito utilizado para avaliação de danos nucleares em células de moluscos expostos a agentes poluentes químicos, bem como os ocasionados pelas radiações ionizantes (SANTOS et al., 2018; LIMA et al., 2019).

O molusco *Biomphalaria glabrata* tem sido utilizado como bioindicador ambiental tanto para agentes físicos quanto para agentes químicos (ESTEVAN et al., 2006; SILVA et al., 2008; TALLARICO et al., 2014). Segundo relatos encontrados na literatura, este molusco agrega em sua biologia, características primordiais de um bom bioindicador ambiental, tais como: sensibilidade a poluentes, reprodução rápida e contínua ao longo do ano, em condições controladas, garantindo a realização de experimentos em temperatura ambiente (SANTOS et al., 2018; LIMA et al., 2019). Além disso, essa espécie possui larga distribuição geográfica, baixa dispersão e fácil coleta. A manutenção em laboratório também é facilitada pelo curto ciclo de vida, ocupação de pouco espaço físico e baixo custo econômico (GRAZEFFE et al., 2008). Estes estudos vêm utilizando técnicas macroscópicas que avaliam modificações na capacidade reprodutiva dos animais relacionadas com a fecundidade e a fertilidade, além da letalidade destes espécimes frente a estes agentes (CANTINHA et al., 2010; SILVA et al., 2008; VAZ et al., 2010). No entanto, novas metodologias auxiliarão a obtenção de resultados mais exatos quanto ao verdadeiro impacto da exposição de *B. glabrata* a resíduos como lodo de esgoto doméstico e industrial, pois seu emprego como biomonitor ainda não foi amplamente estudado na literatura.

A padronização adequada das técnicas com materiais de referência também favorecerá a aplicação desse organismo como biomonitor da qualidade ambiental. Pois, com o aumento expressivo da quantidade de rejeitos domésticos, industriais e agrícolas lançados na natureza, ocasionado pelo crescimento tecnológico e a expansão populacional (EEA, 2005), existe a necessidade de desenvolver ações de monitoração dos efeitos nocivos destes resíduos no ambiente e sobre os seres vivos. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo investigar o comportamento de *B. glabrata* com relação a exposição aos lodos doméstico e industrial (*Standard Reference Material*® 2781 - *Domestic Sludge* e *Standard Reference Material*® 2782 - *Industrial Sludge*), tendo como objetivos específicos:

- Determinar o percentual de sobrevivência dos moluscos *B. glabrata* após exposição aos lodos de esgotos;
- Verificar a indução de efeitos letais e mutagênicos dos lodos de esgotos sobre os embriões de *B. glabrata*;
- Determinar a viabilidade celular e o número de hemócitos após exposição aos lodos de esgoto;

- Avaliar os efeitos genotóxicos dos lodos de esgoto por ensaio do micronúcleo;
- Adaptar a metodologia do ensaio cometa para avaliação de alterações no material genético de *B. glabrata* expostos ao material de referência de lodos doméstico e industrial;
- Avaliar a capacidade de acumulação de elementos químicos pelo *B. glabrata* expostos ao lodo doméstico e industrial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Poluição ambiental

A necessidade de monitoração de recursos hídricos é decorrente do fato de que a poluição ambiental é umas das grandes preocupações da sociedade moderna devido ao potencial impactante em praticamente todos os ecossistemas existentes na terra. Suas causas estão diretamente relacionadas com as atividades desenvolvidas pelos seres humanos, desde a agricultura, passando pelo advento da revolução industrial, no qual foi verificado um expressivo aumento na utilização de matéria-prima e nas emissões de substâncias nocivas para o ambiente (FUGIEL et al., 2017).

Vários desses poluentes são responsáveis pela exacerbação do efeito estufa, acidificação dos solos, formação de poluentes fotoquímicos e particulados que, conseqüentemente, acarretaram danos à saúde humana e graves desequilíbrios nos ecossistemas. Além disto, atualmente, o contínuo aumento da população vem acarretando aumento da poluição atmosférica, aquática e dos solos, originárias não somente das indústrias, mas de outras fontes como a agricultura e resíduos domésticos (MCCRINK-GOODE, 2014). Esses tipos de poluição afetam grandemente a qualidade do lodo de esgoto produzido por estações de tratamento, proporcionando diversos poluentes que podem contribuir para os danos observados em organismos biomonitoradores.

2.2 Poluição do ar

A contaminação do ar é causada principalmente pela emissão de substâncias tóxicas, que podem ser particuladas ou gasosas. Estas substâncias são lançadas na atmosfera terrestre em sua grande maioria pela intensa atividade antropogênica, mas também, podem ser naturalmente geradas e emitidas para o ambiente por meio da produção de gases tóxicos oriundos da atividade vulcânica. Estes poluentes atmosféricos são responsáveis por danos à saúde humana e aos ecossistemas. É estimado que a poluição do ar seja responsável por cerca de 5% da carga global de doenças, incluindo os casos de asma e outras doenças respiratórias alérgicas, disfunções cardiovasculares (enfarte do miocárdio, arritmia, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca), distúrbios neurocognitivos e comportamentais, problemas pulmonares e alterações na gravidez, provocando restrição do crescimento fetal, nascimento

premature, baixo peso ao nascer, comprometimento do sistema imunológico e morte fetal, entre outras complicações verificadas durante o período gestacional (BROOK, et al., 2010; VALLERO, 2014; LEVY, 2015; KORTEN et al., 2017; RICH, 2017).

Ao longo dos anos, estudos vêm demonstrando que a quantidade de elementos químicos tóxicos lançados na atmosfera pela indústria, transporte, agricultura, produção de energia, e muitas outras atividades humanas está aumentando. Uma vez emitidos para a atmosfera, estes elementos químicos podem ser submetidos a transformações químicas capazes de aumentar seu potencial em provocar danos nos diferentes ecossistemas e aos organismos presentes nos mesmos. O impacto ocasionado por esse tipo de poluente dependerá da sua concentração no ambiente e da acumulada pelo organismo alvo (RAO et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2016).

A poluição do ar nos diversos ecossistemas e o modo pelo qual ela ocasiona prejuízos à biodiversidade é variado, podendo, até mesmo, induzir perdas irreversíveis de espécies da fauna e flora (BOLUND; HUNHAMMAR, 1999). Existe uma enorme quantidade de substâncias nocivas, no entanto, três grandes grupos de poluentes atmosféricos são motivo de preocupação em se tratando de originar danos ao meio ambiente. Estes grupos de contaminantes são os metais, eutrofizantes, oxidantes fotoquímicos e acidificantes. Os contaminantes pertencentes ao grupo dos metais são caracterizados pela deposição de material particulado ou através das precipitações pluviais (ASHOMORE, 2013).

O dano que um poluente pode gerar em um organismo é complexo e pode envolver diversos fatores. O mais importante destes fatores é a dose recebida do contaminante. Este fator irá depender da concentração da substância no ambiente e do período de exposição à mesma (SAVA; CARSTEN, 2012; CASCIO, 2016).

Além disso, tem ficado cada vez mais evidente que países industrializados empregam vários tipos de poluentes ambientais com potencial para contaminar tanto o meio atmosférico quanto o aquático, sendo os metais pesados um dos principais tipos de poluentes particulados com elevada capacidade de se depositar no ambiente aquático (PANAHI et al., 2018).

2.3 Poluição do solo

Os principais contaminantes do solo são produtos químicos tóxicos, produzidos pela atividade e gestão ineficiente de resíduos das indústrias, subprodutos da mineração e deposição de material particulado presente no ar. Estas substâncias entram em contato com o meio ambiente em várias etapas da atividade industrial. As indústrias de petróleo e gestão de resíduos urbanos e industriais são as fontes de poluição mais frequentes dentro desta categoria (TARAZONA, 2014a; AHMAD et al., 2015; CACHADA et al., 2016).

Dentre os fertilizantes utilizados nas lavouras, o lodo de esgoto tem sido bastante empregado como adubo orgânico e inorgânico. No entanto, a aplicação deste produto em terras agrícolas, especialmente em solos rasos, necessita que estes compostos apresentem níveis adequados de elementos químicos tóxicos, sendo necessária a monitoração de seus efeitos tanto no solo quanto nas plantas. O uso do lodo de esgoto tratado, como fertilizante, tem sido responsável por modificações no solo, resultando em altas concentrações de elementos químicos tóxicos, o que tem limitado a sua utilização (HEI et al., 2016).

Assim, grande parte dos processos de contaminação dos solos podem ocasionar reflexos negativos no ecossistema aquático, um dos principais pode ser verificado durante o descarte de resíduos e efluentes originários das atividades humanas, pois em muitas regiões não existe um tratamento prévio dos rejeitos produzidos. Assim, os recursos hídricos nessas localidades apresentam uma elevada probabilidade de serem contaminados com elementos químicos tóxicos como arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio, zinco, manganês e ferro (GYAMFI et al., 2019).

2.4 Poluição da água

A poluição por elementos químicos tóxicos é resultante, principalmente, da atividade antrópica, causada pela liberação elevada destes elementos para o ambiente, podendo provocar efeitos adversos sobre o ecossistema aquático e a saúde humana (BRACK et al., 2016; WILHELM, 2009). A qualidade da água é definida por um conjunto de parâmetros gerais, tais como oxigênio dissolvido, alcalinidade, pH, dureza, condutividade, salinidade, turbidez, entre outras características. Essas propriedades estão relacionadas com as condições geológicas e ecológicas dos locais onde a água é encontrada. Embora exista uma grande variabilidade, as características são mantidas dentro de certos limites em cada corpo de água

específico. Nesse caso, a biodiversidade aquática local está bem adaptada às condições do ambiente aquático. No entanto, diversas atividades antrópicas têm liberado grandes quantidades de substâncias químicas contaminantes, a exemplo dos elementos químicos tóxicos, em níveis que excedem a capacidade dos ecossistemas aquáticos de manterem as condições apropriadas da qualidade da água, resultando em danos ao ambiente e aos organismos que ali vivem (TARAZONA, 2014b).

Os efluentes de esgoto são rejeitos produzidos pelas estações de tratamento de águas residuais domésticas ou industriais. Mais de 20 milhões de toneladas de lodo de esgoto secos são produzidos todos os anos (MELERO et al., 2015), sendo que este montante deverá aumentar no futuro próximo devido, sobretudo, à crescente urbanização e industrialização. Desta maneira, a elevação deste tipo de poluição acarretada pelos efluentes residuais de esgoto doméstico e industrial têm se mostrado alarmante, e consequentemente, gerando grande preocupação devido à quantidade e risco cada vez maior para o meio ambiente. Estes compostos, contêm várias substâncias orgânicas e inorgânicas, além de diferentes elementos químicos, alguns tóxicos. Assim, é importante destinar esses resíduos de maneira apropriada (WU et al., 2017). Além disso, os elementos químicos tóxicos presentes nos lodos de esgoto podem ser produzidos naturalmente pela erosão prolongada de solos e rochas, que subsequentemente são depositados em sistemas aquáticos. Alguns destes elementos, incluindo mercúrio, cromo, cádmio, níquel, cobre, chumbo, arsênio entre outros, quando adentram a cadeia alimentar, podem originar elevada toxicidade para os organismos presentes no meio ambiente (ZHOU, et al., 2008).

2.5 Contaminação ambiental por elementos químicos

Dentre alguns dos elementos relacionados com a contaminação do ambiente e dos organismos por lodo de esgoto tratado, podem ser mencionados: arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio, zinco, alumínio, titânio, tungstênio, ferro, cromo, manganês, níquel, cobre, molibdênio, bário e estrôncio (CALLENDER, 2014).

Os elementos químicos puramente tóxicos são aqueles que formam compostos solúveis e biodisponíveis não possuindo nenhuma função para o organismo, sendo capazes de substituir um elemento essencial (Cr, Mo, Mn, Co, Ni, Cu e Zn, por exemplo) ou desregular uma função biológica. Os principais elementos tóxicos são os íons metálicos, entretanto, deve

ser mencionado que os elementos químicos mais leves (quer sejam metálicos ou não) também podem apresentar toxicidade, da mesma maneira que os elementos essenciais, pois quando presentes em quantidades elevadas podem gerar prejuízo ao sistema biológico. A principal diferença entre os elementos tóxicos e essenciais é que não existem efeitos benéficos para espécies tóxicas em qualquer faixa de concentração (PALACIOS; CAPDEVILA, 2013).

No ambiente aquático, o aumento na concentração de contaminantes, como os elementos químicos tóxicos, impacta diretamente a disponibilidade e qualidade da água, consequentemente, afetando de forma negativa os organismos mais sensíveis, além de provocar outras alterações no ecossistema. Contudo, os metais são preconizados como os principais elementos potencialmente tóxicos responsáveis pelo elevado risco de contaminação ambiental (LÓPEZ-DOVAL et al., 2012).

Além disso, a toxicidade de determinados elementos químicos está fortemente correlacionada com sua solubilidade. Os compostos que apresentam baixa solubilidade, normalmente, demonstram toxicidade desprezível, enquanto os de maior toxicidade são normalmente altamente solúveis em meios aquosos. No caso dos íons metálicos, sua toxicidade também é dependente de sua forma química. Certos metais, como chumbo, arsênio, mercúrio, cádmio entre outros, podem dar origem, em condições naturais, a compostos organometálicos, e isto, pode elevar ou reduzir a toxicidade do elemento químico presente na molécula (PALACIOS; CAPDEVILA, 2013).

Nos sistemas biológicos, a via habitual de contaminação por elementos químicos tóxicos é a dieta. A bioacumulação destes elementos químicos nos organismos vivos é especialmente favorecida quando a sua forma química se mostra lipofílica. Esta característica é comum para a maioria dos elementos químicos tóxicos, podendo levar a toxicidade crônica, principalmente devido à contínua acumulação nos tecidos e órgãos. Por conseguinte, várias patologias podem estar correlacionadas a presença de elementos tóxicos no organismo, a exemplo da doença de itai-itai (doença dói-dói), uma disfunção que atinge o sistema renal e o tecido ósseo, verificado no Japão devido a exposição a altas concentrações de cádmio (NOGAWA et al., 2018).

De forma semelhante, estudos populacionais realizados na China atribuíram o desenvolvimento de osteoporose e fraturas ósseas, além de demonstrar a ligação com várias formas de câncer, a indivíduos expostos ao cádmio por um longo período. Outro elemento

tóxico inorgânico que a população está exposta a quantidades excessivas é o arsênio, que tem provocado um número elevado de casos de câncer de pulmão, bexiga, pele, hepático e renal, além de, lesões cutâneas e efeitos adversos em fetos e lactantes. Diversos casos de intoxicação pelo arsênio foram relatados em regiões de Bangladesh e China, devido, principalmente, a mudanças nas fontes de obtenção de água potável e ao uso intensivo de carvão mineral para produção de energia, respectivamente (NORDBELG; NORDBELG, 2016).

A toxicidade destes elementos químicos está fortemente relacionada com suas características toxicocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e modo de excreção, além de suas características toxicodinâmicas como a ligação e interação com alvos específicos para indução de efeitos deletérios ao sistema biológico (DORNE et al., 2011). Para que possa exercer seu efeito lesivo, o elemento químico capaz de gerar efeito tóxico tem de penetrar na célula através da membrana. A travessia da membrana é facilitada por determinadas proteínas envolvidas no processo de transporte ativo. Esta penetração também pode ocorrer por difusão passiva por canais iônicos ou através da camada lipídica, desde que o composto exiba propriedades lipofílicas (PALACIOS; CAPDEVILA, 2013).

A acumulação desses elementos químicos tóxicos pode causar danos severos a vários tipos de tecidos. Uma vez dentro da célula, os elementos químicos podem exercer efeitos danosos de diferentes maneiras, tais como: intervenção nos processos metabólicos, substituindo ou mimetizando a ação de elementos químicos essenciais para a manutenção das funções biológicas; inibindo enzimas; alterando estrutura e função de organelas celulares. Estes elementos químicos podem provocar o acúmulo em certas regiões do sistema biológico até promover prejuízos físicos ou alterações no material genético, causando efeitos genotóxicos nos organismos (SONG; LI, 2015; KOPP et al., 2018).

Além disso, estudos detalhados realizados nas últimas duas décadas demonstraram que ferro, cobre, cádmio, cromo, mercúrio, níquel e vanádio possuem potencial para a produção de entidades químicas altamente reativas, os radicais livres. Estes incluem uma ampla variedade de radicais de oxigênio, carbono e enxofre, provenientes do peróxido de hidrogênio e radical superóxido, bem como quelatos de aminoácidos e proteínas complexadas com metais tóxicos. Todos têm a capacidade de provocar peroxidação lipídica, danos a estrutura do DNA, oxidação de grupos sulfidrilas em proteínas, depleção de antioxidantes, dentre outros efeitos (VALKO et al., 2005).

2.6 Efeito genotóxico das substâncias no ambiente aquático

No ecossistema aquático, dentre a biodiversidade existente, pode-se destacar os invertebrados como organismos importantes devido ao seu número expressivo. Os invertebrados desempenham um importante papel no funcionamento e manutenção dos ecossistemas aquáticos e apresentam elevada relevância para abordagens experimentais em laboratório e no campo (TURAK et al., 2015).

Organismos invertebrados podem ser empregados como bioindicadores para avaliação de danos causados ao material genético e para a monitoração de diversos ecossistemas, pois demonstram elevada capacidade para responder a estímulos relacionados aos mais diversos agentes causadores de contaminação ambiental (LEME; MARINMORALES, 2009). Os testes genotóxicos (teste do micronúcleo, letal dominante e o ensaio do cometa) permitem a observação de diferentes parâmetros genéticos que passam por modificações em decorrência do estresse sofrido pelo sistema biológico à exposição a agentes químicos ou físicos (GRANT, 1994).

Os efeitos deletérios estão relacionados com distúrbios estruturais de componentes genéticos, tais como a alteração da integridade e função do ácido desoxirribonucleico, refletindo em alterações nucleares, que ocorrem a partir de mutações pontuais, tanto em células individuais como em estruturas mais complexas (GRANT, 1994).

Os agentes genotóxicos são amplamente distribuídos no ambiente podendo ser classificados em: biológicos (vírus, patógenos e parasitas, entre outros), químicos (elementos químicos tóxicos, pesticidas, drogas farmacêuticas e compostos naturais e sintéticos) e físicos (radiação ionizante e raios ultravioleta). Os agentes químicos podem ser produzidos de forma endógena como resultado de interações químicas em sistemas biológicos, como os subprodutos do metabolismo oxidativo celular (TCHOUNWOU, 2013).

As substâncias genotóxicas têm afinidade para interagir com o DNA, o que não constitui necessariamente uma prova de periculosidade com relação à saúde. Entretanto são potencialmente mutagênicas ou carcinogênicas, capazes de induzir mutações genéticas, contribuindo para o desenvolvimento de tumores (GRANT, 1994).

Um dos mais importantes efeitos causados pelas substâncias genotóxicas são as alterações cromossômicas estruturais ou numéricas, que podem acontecer em qualquer fase do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Tais alterações são consideradas evidências de efeitos mutagênicos, induzidos por agente clastogênicos e/ou aneugênicos. Os agentes clastogênicos têm a capacidade de causar mudanças na estrutura e número dos cromossomos e cromátídeos. Os aneugênicos são agentes químicos, que em nível molecular, impedem a fixação das fibras do fuso ao cinetócoro durante a divisão celular (HOUK, 1992; TCHOUNWOU, 2013). Contudo, são poucas as substâncias, dentre as existentes, que são devidamente conhecidas com respeito aos efeitos genotóxicos, como, por exemplo, misturas complexas como é o caso de lodos de esgoto de estações de tratamento.

2.7 Lodo de esgoto

A atividade humana resulta na produção de grandes volumes de águas residuais no mundo. Grande parte desta água residual passa por processos de tratamento físico (tais como a flotação e sedimentação), químico (a exemplo da floculação) e biológico (tratamento microbiano) para remoção de compostos orgânicos suspensos e dissolvidos, sólidos, agentes patogênicos e outros agentes contaminantes. Em seguida, o efluente tratado é despejado para massas de água superficiais. Durante as várias fases de tratamento das águas residuais, os sólidos são separados a partir de sua matriz. O montante de resíduos semi-sólidos gerados durante o processo de tratamento primário (físico e químico) e secundário (biológico) da água residual é chamado de lodo, sendo classificado em primário e secundário, respectivamente (RAHEEM et al., 2018).

O lodo de esgoto é comumente encontrado em processos naturais e industriais. Pode se originar normalmente na parte inferior de um corpo de água (mares, rios, lagos ou pântanos), por processos naturais de sedimentação de materiais sólidos constituídos de matéria orgânica, argila e areia. É formado por aproximadamente 1-5% de materiais sólidos, 60% de compostos orgânicos não tóxicos, poluentes orgânicos, patógenos e componentes inorgânicos. Contudo, mais de 95% do lodo de esgoto é constituído por água (WANG et al., 2008; TEZEL et al., 2011).

Os componentes retirados de águas residuais oriundas de instalações domésticas e industriais apresentam durante o processo de tratamento diversos tipos de rejeitos sólidos e

com alta concentração de matéria orgânica. O lodo é caracterizado após toda a remoção de resíduos sólidos presentes na água residual, esta retirada é realizada em locais chamados de instalação de tratamento de águas. Pode ser de dois tipos, lodo doméstico e industrial. Após a obtenção do lodo, análises químicas quantitativas demonstraram que estes produtos apresentam a capacidade de serem utilizados no setor agrícola, para fertilização ou recuperação dos solos, devido à presença de vários elementos químicos e compostos orgânicos que podem ser aproveitados como um tipo de adubo para fornecer às plantas nutrientes para o seu desenvolvimento. Contudo, seu emprego deve ser moderado, pois em grandes quantidades este material pode conter concentrações elevadas de substâncias químicas potencialmente perigosas para o solo e águas de lençóis freáticos (CIEŚLIK, et al., 2015).

Assim, o lodo de esgoto (doméstico e industrial) por ser uma fonte rica em nutrientes orgânicos pode ser um carreador para vários tipos de contaminantes, tais como elementos químicos potencialmente tóxicos, xenobióticos orgânicos e microrganismos patogênicos. Portanto, é necessário estudar sua toxicidade para conferir mais segurança para sua utilização, principalmente porque seu uso tem se tornado cada vez mais comum no setor agrícola (BLOEM et al., 2017). Desse modo, a utilização de biomonitores e marcadores biológicos podem ser considerados uma boa alternativa para avaliação do potencial tóxico destes lodos de esgoto.

2.8 Bioindicador e biomarcador

Nas últimas décadas, a poluição e contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais têm se tornado um problema global cada vez mais relevante. Essas substâncias podem entrar em contato com diversos tipos de ambientes aquáticos, principalmente, por meio das atividades antropogênicas. Foi verificado que os principais agentes poluentes são os resíduos de efluentes industriais e domésticos, compostos empregados na agricultura como os pesticidas e fertilizantes inorgânicos e lixiviação de aterros sanitários, além desta fontes artificiais de contaminação, atividades oriundas de processos naturais como intemperismo geológico da crosta terrestre e deposição de poluentes atmosféricos também são responsáveis por ocasionar poluição no ecossistema aquático. Assim, o emprego de organismos bioindicadores e biomarcadores tornam-se essenciais para a avaliação dos impactos ambientais (BAT; ARIRI, 2018).

Bioindicadores são definidos como espécies ou grupos de espécies utilizados para indicar efeitos adversos gerados por algum tipo de contaminação. As espécies empregadas como bioindicadoras geralmente são diferentes dos organismos modelos utilizados para a investigação toxicológica, pois estes modelos muitas vezes não são espécies encontradas nos ambientes a serem monitorados. A análise dos efeitos adversos normalmente é mensurável nos organismos por meio da alteração no número total das amostras ou pela variação na abundância relativa das espécies presentes no meio (NIKINMAA, 2014).

Espécies bioindicadoras ocupam uma grande variedade de ambientes. Suas características possibilitam a determinação de quais organismos devem ser empregados para a avaliação da qualidade dos ecossistemas em várias instâncias. Tais espécies não imigram ou emigram do ecossistema a ser analisado. Contudo, as diferentes propriedades de uma boa espécie bioindicadora não são facilmente encontradas em um único organismo. Além disso, bioindicadores podem também ser tolerantes a agentes tóxicos, desde que demonstrem uma propriedade facilmente mensurável para avaliação de qualidade ambiental por biomarcadores (SPARLING, 2016).

Os peixes são muito utilizados como organismos bioindicadores da poluição ambiental, principalmente quando se trata da contaminação originada por metais pesados. Várias espécies de peixes, tais como, *Alburnus alburnus*, *Perca fluviatilis*, *Abramis brama*, *Vimba vimba*, *Scardinius erythrophthalmus*, *Leuciscus aspius*, *Sander lucioperca* e *Hypophthalmichthys nobilis*, podem ser analisadas quanto as suas propriedades de bioacumulação para elementos químicos tóxicos (STRUNGARU et al., 2018).

Outros organismos empregados para avaliação dos parâmetros ambientais são os crustáceos por serem sensíveis a poluição. Espécies da família Amphipoda são amplamente empregados devido ao seu pequeno tamanho e abundância no ecossistema de água doce (CILIBERTI et al., 2017). Em testes realizados em laboratório, o camarão *Palaemonetes argentinus* demonstrou sensibilidade após exposição a poluentes orgânicos e inorgânicos (BERTRAND et al., 2016a; 2016b).

Além das espécies mencionadas, um grupo de invertebrados que tem recebido ampla atenção dos pesquisadores são as planárias, pois apresentam características biológicas únicas, como a forma primitiva do sistema nervoso central e notável capacidade de regeneração tecidual. Estes animais de água doce têm sido utilizados de forma crescente em ensaios de

toxicidade química desde a década de 60. Os resultados de vários experimentos toxicológicos sugerem que as planárias de água doce podem servir não apenas como modelos alternativos para exames de toxicidade química em laboratórios, mas também como potenciais bioindicadores para a qualidade dos ambientes de água doce (WU; LI, 2018).

Dentre os biomonitores utilizados para detectar e quantificar a presença de elementos químicos tóxicos no meio aquático, os moluscos *Mytilus galloprovincialis* e *Rapana venosa*, são espécies amplamente utilizadas para monitorar o nível de poluição das águas costeiras em todo o mundo, em razão de acumularem altas concentrações de metais pesados em seus tecidos moles. São facilmente coletados e identificados, além de serem abundantes no ecossistema (BAT; OZTEKIN, 2016).

Para avaliar a poluição por elementos químicos metálicos no meio aquático, vários organismos podem ser utilizados como bioindicadores, tais como algas, plantas aquáticas, protozoários, insetos, moluscos bivalves, moluscos gastrópodes, crustáceos, peixes, anfíbios, plantas, mamíferos marinhos e aves. Cada bioindicador demonstra características específicas para determinação da poluição por metais no ecossistema aquático quando comparado com os outros organismos (ZHOU et al., 2008).

Um biomarcador é uma característica mensurável de um organismo que responde a um agente tóxico. Desta forma, o marcador biológico é caracterizado pela desordem de uma função normal existente em um determinado sistema biológico. Alguns dos biomarcadores mais utilizados são enzimas antioxidantes, tais como, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione s-transferase e glutathione redutase, além de, formação de micronúcleos, aberrações cromossômicas, desenvolvimento de tumores, aumento da frequência de apoptoses, malformações embrionárias e mortalidade do organismo (LEE et al., 2015; DUAN et al., 2018).

Assim, é necessário o entendimento de vários aspectos relacionados com o tipo de biomarcador presente no organismo a ser utilizado, como por exemplo, a atuação dos xenobióticos causando perturbações nestes sistemas vivos e quais as consequências destes distúrbios funcionais para o organismo. Os ensaios realizados com biomarcadores devem avaliar o risco potencial de poluentes ambientais para as populações, comunidades ou ecossistemas. São empregados na monitoração de possíveis efeitos danosos para os organismos decorrentes da contaminação ambiental, e assim indicar em um menor tempo,

prováveis danos irreversíveis. As principais características de um bom marcador biológico são: a capacidade de ser facilmente quantificados, possibilitar medições rápidas e de baixo custo, apresentar especificidade para um tipo de substância tóxica a ser mensurada e demonstrar resposta à concentração ou dose do contaminante presente no local (MICHALAK; CHOJNACKA, 2014; NIKINMAA, 2014).

É preciso salientar que organismos diferentes apresentam sensibilidades distintas aos mais variados agentes xenobióticos. Desse modo, a eficiência na utilização de biomarcadores tem relevância ecológica quando pode ser combinada com o conhecimento da sensibilidade da espécie ao agente contaminante. Outro fator importante a ser considerado é o fato do biomarcador além de ser influenciado pelo poluente ambiental de interesse, poder sofrer interferências significantes de outros contaminantes presentes no meio (SOGORB et al., 2014).

Os animais invertebrados têm sido o modelo de escolha para biomonitoramento e bioindicação ambiental de poluentes, pois representam mais de 90% das espécies aquáticas. Além disso, possibilitam a diminuição do uso de vertebrados superiores por razões bioéticas, redução do espaço necessário para realização dos testes e apresenta baixo custo de aquisição e cuidados com animais (CHEUNG; LAM, 1998). Esses animais podem desempenhar um papel relevante nos bioensaios para avaliar a toxicidade de compostos químicos e em teste de novos fármacos para doenças humanas e animais. No entanto, por sua importância e papel ecológico, os moluscos pertencentes a um dos filos do reino animal mais rico em espécies apresentam características que os tornam especialmente adequado para serem empregados como modelos de monitoração ambiental (OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003).

Entre os invertebrados, caramujos de água doce são comumente usados em estudos de toxicidade aguda e crônica de substâncias químicas que poderiam prejudicar todos os filos de vida aquática, bem como aves e mamíferos, incluindo seres humanos (WILSON-SANDERS, 2011). A compreensão abrangente de moluscos como modelos de monitoração ambiental é uma abordagem de pesquisa importante e viável, pois, também deve ser considerado que os moluscos são componentes muito importantes de determinados ecossistemas. Portanto, além de seu papel como modelos para entender os efeitos de toxinas em outros animais, seu uso na avaliação de toxicidade também ajuda a entender os efeitos ecológicos de toxinas em um grande grupo de animais (HABIB et al., 2016). Dentre as espécies de moluscos, *Biomphalaria*

glabrata apresenta diversas características favoráveis para a sua utilização em estudos de monitoração do meio aquático.

2.9 *Biomphalaria glabrata*

Os invertebrados constituem a grande maioria das espécies observadas nos ecossistemas aquáticos, representam aproximadamente 90% dos organismos e, deste total, 80%, são moluscos classificados como gastrópodes. A classe gastropoda apresenta a maior quantidade de moluscos existente, sendo descritas cerca de 30.000 espécies viventes e 15.000 formas fósseis. Os gastrópodes foram capazes de adapta-se a uma grande diversidade de habitat, dentre eles, o marinho, a água doce e o ambiente terrestre (BARNES; RUPPERT, 1995). Dentre as espécies de moluscos de água doce, pode-se observar um grande interesse pelo caramujo *Biomphalaria glabrata* (Figura 1), pois, além de ser um dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*, esta espécie é bastante utilizada como biomarcador e bioindicador (TALLARICO et al., 2014).

Dentre as principais características morfológicas do molusco *B. glabrata* (Figura 2), pode ser observada uma concha constituída por um disco em forma de espiral e diâmetro variável (podendo atingir 35 mm de diâmetro e 11 mm de largura) de acordo com a idade do caramujo, presença de um par de tentáculos longos e filiformes; olhos localizados na parte inferior dos tentáculos, boca circundada pela mandíbula, que é semelhante ao formato de T, quando vista na posição frontal. Na região do colo, localizam-se as aberturas genitais masculina e feminina, localizada atrás da base do tentáculo esquerdo e sob a pseudobrânquia, respectivamente. Sua região podal é alongada, o que influencia o modo como molusco se movimenta, expondo sua massa cefalopodal unida pelo colo ao resto do corpo. A cavidade pulmonar se encontra na parte cefálica da massa visceral (THIENGO; FERNANDEZ, 2008).

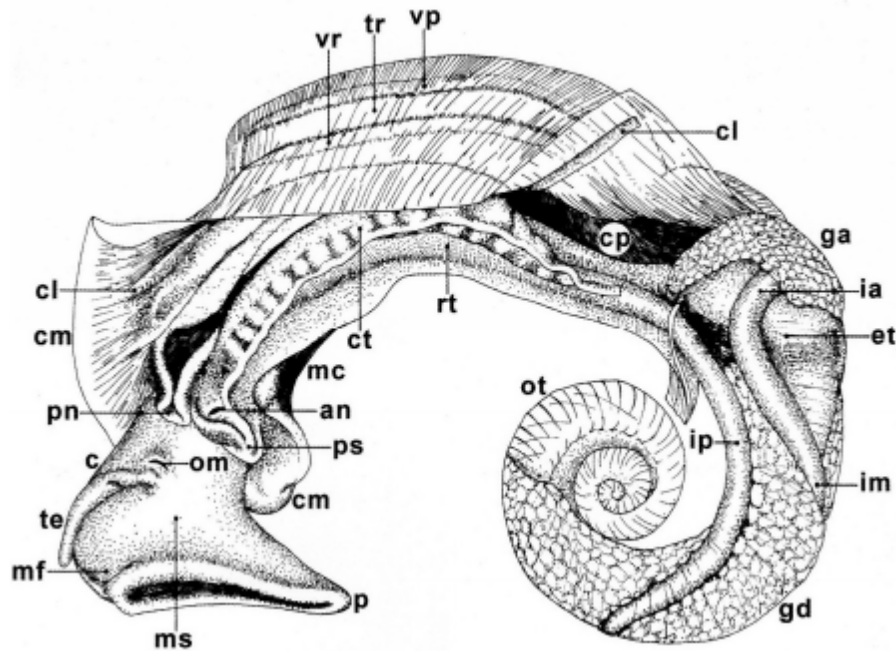
Figura 1 - Exemplo do molusco *Biomphalaria glabrata*.



Fonte: O autor.

No ambiente natural, são encontrados normalmente exemplares com tamanho do corpo que variam entre 1 e 2,5 cm, apresentando conchas com 4 a 6 giros. Esses caramujos são hermafroditas, possuem gônada única, em forma de cacho, contendo numerosos ácidos denominados ovoteste. Os óvulos e espermatozoides são formados em uma região na qual ambos ficam próximos entre si (CIMERMAM; CIMERMAM, 2001). Quando em colônia, o molusco *B. glabrata* adota, preferencialmente, a fecundação cruzada como forma reprodutiva, entretanto, podem modificar esta forma de procriação para a autofecundação, principalmente quando os animais estão sob condições ambientais hostis (PARAENSE, 1970).

Figura 2 - Corpo do molusco *Biomphalaria glabrata*

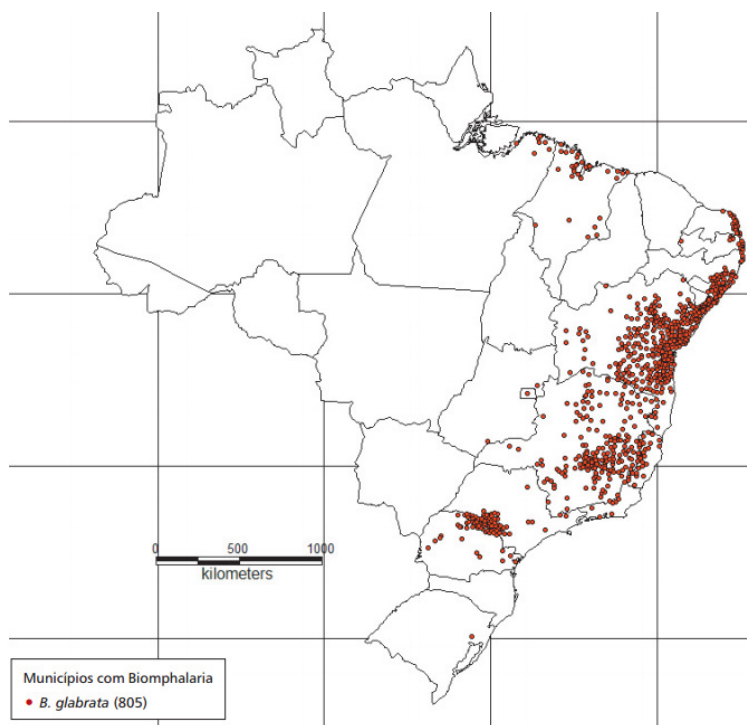


Biomphalaria glabrata, animal retirado da concha com o manto, visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (ms), cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), abertura genital (om), colar ou borda do manto (cm), pseudobrânquia (ps), pneumóstoma (pn), abertura anal (an), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia renal (vr), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (tr), glândula de albúmen (ga), intestino anterior (ia), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot).

Fonte: Thiengo e Fernandez (2008); Paraense (1976).

B. glabrata demonstra grande capacidade adaptativa a variações ambientais, desta maneira vivem em regiões (Figura 3) que apresentam diferentes tipos de climas, como florestas equatoriais e em ambientes áridos, além de sobreviverem em baixas e altas altitudes. Geralmente, habitam cursos de água com pouca velocidade, lagos e coleções de água parada, suportam variação de pH entre 5,8 a 8 (JURBERG et al., 1987).

Figura 3 - Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata* no Brasil.



Fonte: Carvalho e Caldeira (2004).

O molusco *B. glabrata* apresenta propriedades que permitem seu uso em laboratório como indicador ambiental de diversos agentes contaminantes, nos quais são quantificadas alterações na sua capacidade reprodutiva e sobrevivência dos indivíduos adultos e/ou embriões quando expostos às substâncias testadas. Além disso, o uso de uma espécie representativa com significado ecológico para o meio aquático a caracteriza como uma importante ferramenta para o monitoramento de substâncias poluentes do ecossistema de água doce (ANSALDO et al., 2009; VAZ et al., 2010; TALLARICO et al., 2014; CANTINHA et al., 2017; LIMA et al., 2019).

O *B. glabrata* foi a espécie de invertebrado empregado na biomonitoração da estação de tratamento de efluentes do município de Suzano, localizado em São Paulo, Brasil, por meio de ensaios de toxicidade aguda e mutagenicidade (TALLARICO et al., 2014). Testes realizados com o molusco *B. glabrata* evidenciaram que doses subletais de cádmio, chumbo e arsênico podem impactar determinados estágios do ciclo reprodutivo do invertebrado, o processo de oviposição, capacidade de eclosão e sobrevivência embrionária, demonstrando que o desenvolvimento e a reprodução dos caramujos foram significativamente

comprometidos após exposição às concentrações subletais dos contaminantes estudados. Arsênio ocasionou os maiores danos ao processo de postura dos ovos de *B. glabrata*. Além disso, cádmio e chumbo impactaram negativamente a sobrevivência dos embriões e no tempo de eclosão (ANSALDO et al., 2008).

Em outros trabalhos, biomarcadores avaliados no *B. glabrata* como a proteína HSP70 e células hemocitárias foram utilizadas para avaliar os efeitos deletérios oriundos da exposição do caramujo adulto ao metal pesado cádmio (CANTINHA et al., 2017) e ao herbicida oxyfluorfen (LIMA et al., 2019).

Mesmo com os ensaios e suas características de bioindicador bastante exploradas, pouco se conhece sobre a acumulação de elementos químicos nos tecidos de *B. glabrata*. Outro fator relevante é a ausência de trabalhos com a exposição desse animal a resíduos como lodo doméstico e industrial, acompanhando o processo de acumulação/eliminação e os efeitos danosos ao material genético dos animais.

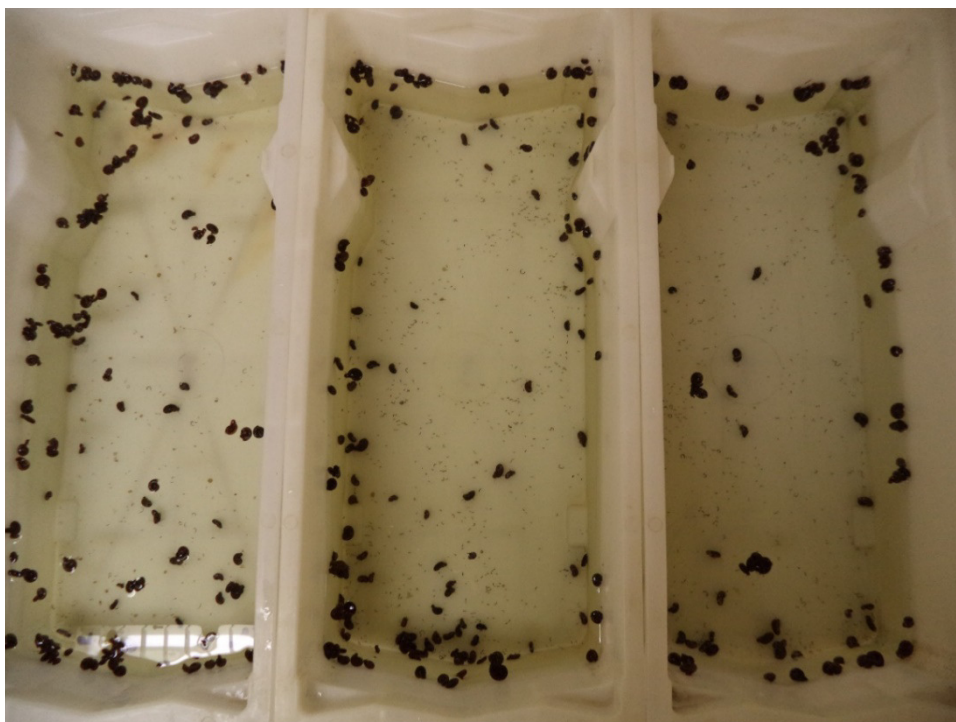
3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho estudou os aspectos genéticos e químicos da exposição de *Biomphalaria glabrata* aos lodos doméstico e industrial por meio da viabilidade celular, embriotoxicidade, ensaios de micronúcleo e cometa em hemócitos e a avaliação da acumulação de elementos químicos nos tecidos dos animais após a exposição.

3.1 Criação e manutenção do molusco *Biomphalaria glabrata*

Foram utilizados animais adultos, pigmentados e sexualmente maduros da espécie *B. glabrata*. Estes animais, oriundos de São Lourenço da Mata - PE, foram criados no moluscário do Laboratório de Radiobiologia localizado no Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE e negativos quanto à presença do platelminto *Schistosoma mansoni*, os moluscos foram mantidos em aquários (medindo 50 x 23 x 17 cm) com capacidade para 20 L, abastecidos com água filtrada e decolorada, com pH em torno de 7,0 (Figura 4). Os aquários de criação dos espécimes foram dispostos em condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), com ciclos de 12 h no escuro e 12 h sob luz quente incandescente. A alimentação dos moluscos foi realizada diariamente com alface orgânico (*Lactuca sativa*) e a troca da água ocorria semanalmente com recolhimento das respectivas desovas (oviposição).

Figura 4 - Aquários de criação do molusco *Biomphalaria glabrata*.



Fonte: O autor.

3.2 Lodos utilizados no estudo

Para a realização dos experimentos de toxicidade e mutagenicidade foram utilizados os materiais de referência correspondentes aos lodos doméstico SRM 2781 - Domestic Sludge e industrial SRM 2782 - Industrial Sludge, produzidos pelo National Institute of Standards and Technology (NIST).

O SRM 2781 é um lodo doméstico seco e pulverizado. Foi produzido a partir da desidratação parcial de amostras do esgoto da *Metropolitan Denver Sewage Disposal District No.1*, de acordo com as especificações dos EUA. As amostras foram transportadas para instalações do *U.S. Geological Survey (Lakewood, CO)*, sendo submetidos à secagem à temperatura ambiente em estufa. Em seguida, foram triturados até a obtenção do diâmetro aproximado de 75 μm (200 mesh). Posteriormente, o material foi homogeneizado durante 24 h e esterilizado com a utilização de radiação ionizante e uma amostra contendo 40 g foi enviada ao National Institute of Standards and Technology (NIST) para ser certificada. Os elementos químicos certificados foram: As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Mo, Ni, Se, Ag, Zn, N, Be, Al, Ca, Fe, Mg, P, K, Si, Na e Ti (Anexo 1).

O SRM 2782 foi obtido de um efluente industrial localizado no norte de New Jersey, EUA. A coleta foi realizada com a assistência do Departamento de Proteção Ambiental da região. O material foi liofilizado e transportado para as instalações do *U.S. Geological Survey (USGS)* em Denver. No USGS o material foi triturado até a obtenção do diâmetro aproximado de 75 µm (200 mesh), em seguida, o material foi homogeneizado, esterilizado e enviado para certificação pelo NIST, semelhante ao realizado para o material de referência SRM 2781. Os elementos químicos certificados foram: As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Mo, Ni, Se, Ba, Ce, Co, Ga, In, La, Ag, Ti, V, Al, Ca, Fe, Mg, P, K, Na, Sb, Eu, Au, Hf, Li, Mn, Rb, Sm, Ta, Tb, Th, U, Yb, Y, C, Si, S (Anexo 2).

3.3 Bioacumulação de elementos químicos por *Biomphalaria glabrata*

Foram analisados o corpo (tecido mole) dos moluscos expostos às soluções dos materiais de referência dos lodos doméstico e industrial. Os caramujos foram divididos em 4 grupos por substância a ser testada: um grupo controle (C) apenas com água filtrada e decolorada e dois grupos expostos, separadamente, as soluções dos lodos doméstico e industrial nas concentrações de 50, 100 e 150 e 500 mg/L. Cada grupo conteve 30 animais.

3.3.1 Preparação das amostras para análise

A preparação das amostras consistiu na separação dos corpos e conchas dos moluscos *B. glabrata* com o auxílio de uma pinça metálica. Após a separação do tecido mole da concha, os animais foram sacrificados a partir da exposição à temperatura de -4 °C. Em seguida, as amostras foram aliquotadas, identificadas e congeladas à temperatura de -4 °C, para posterior liofilização. O procedimento de liofilização ocorreu por aproximadamente 48 horas ou até que o peso da massa tornasse constante. Após essa etapa, as amostras foram homogeneizadas com pistilo e maceradas no almofariz de vidro, para evitar contaminação com elementos químicos, até a obtenção de partículas de tamanho máximo de 18 mesh (1 mm). Em seguida, as amostras foram encaminhadas para tratamento químico e posterior análise por ICP-MS e GFAAS.

3.3.2 Tratamento químico para análise por GFAAS e ICP-MS

Em todas as etapas de tratamento das amostras preparadas para análise por GFAAS e ICP-MS, foram utilizados ácidos ultrapuros e água padrão Milli-Q (resistividade maior que 18,2 MΩ.cm a 25 °C). Os reagentes utilizados possuíram nível metrológico elevado e o ácido nítrico usado para o tratamento químico foi destilado para reduzir o risco de contaminação com elementos químicos. As soluções foram preparadas com auxílio de uma micropipeta automática calibrada (desvio de 0,2%), com ponteiros descartáveis, e manuseadas em capela de fluxo laminar. As pesagens foram realizadas em balança analítica com precisão de 0,00001 g.

Materiais, como vidrarias e frascos de plásticos para armazenar as soluções, foram descontaminados por imersão em solução detergente de Extran alcalino a 5% por 24 h. Posteriormente, as amostras foram enxaguadas com água abundante, e imersos em solução de ácido nítrico 10% por 24 h; enxaguados novamente e secos em capela de fluxo laminar.

Para realização das análises por GFAAS e ICP-MS, as amostras foram submetidas a tratamento químico com a utilização de um banho de ultrassom (Thornton). Foi adicionado peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para auxiliar na decomposição da matéria orgânica, impedindo a quelação de elementos químicos de interesse.

Porções das amostras dos moluscos expostos aos lodos doméstico e industrial liofilizadas (massa de 0,2 a 0,5 g), juntamente com porções analíticas dos materiais de referência de fígado de boi - SRM 1577b (0,2 g), soro de leite em pó - IAEA 155 (0,2 g) e solo - SRM 2710 (0,2 g), foram encaminhadas para análise por GFAAS e ICP-MS para quantificação de elementos químicos. Brancos analíticos (n = 6) também foram preparados juntamente com as amostras e materiais de referência.

O banho de ultrassom foi utilizado para otimizar o processo de decomposição das amostras, que consistiu em:

- i. Pesagem de 0,2 a 0,5 g das amostras;
- ii. Adição de 2 mL de HNO₃ P.A. ultrapuro (~ 65%) destilado para cada 100 mg de amostras;

- iii. Pré-digestão por 24 h em capela de fluxo laminar com movimentos circulares para evitar a adesão das partículas às paredes do tubo de ensaio;
- iv. Aquecimento em banho com ultrassom até 80 °C. Após estabilização da temperatura, as amostras permaneceram durante 1 h no banho de ultrassom;
- v. Repouso em capela de fluxo laminar até atingir o equilíbrio térmico à temperatura ambiente;
- vi. Adição de 0,2 mL de peróxido de hidrogênio para cada 100 mg de amostra;
- vii. Aquecimento no banho de ultrassom até 80 °C. Após estabilização da temperatura, as amostras permaneceram durante 1 h no banho de ultrassom;
- viii. Adição de 0,2 mL de peróxido de hidrogênio para cada 100 mg de amostra e em seguida leva-se ao banho de ultrassom por 1 h;
- ix. Adição de água ultrapura (Milli-Q) até o volume de 30 mL de solução.

3.3.3 Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS)

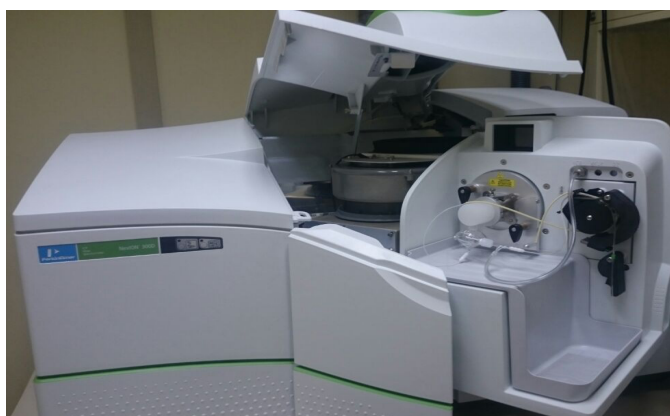
Os exemplares foram avaliados quanto à sua composição química (elementos Cu, As, Ni, Mn e Pb) por meio da técnica de GFAAS. A análise foi determinada em espectrômetro Varian AAS 220 ZEEMAN com forno de grafite GTA 120. Após a calibração com frações de massa conhecidas para cada elemento químico a partir das soluções-padrão Merck (1000 mg/kg). Para a realização da análise, foram determinadas as condições analíticas de corrente (mA), comprimento de onda (nm), diâmetro da janela (nm) e gás combustível/oxidante para quantificação dos elementos químicos (Figura 6).

3.3.4 Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)

Para realização desta técnica foram utilizadas amostras do tecido corporal dos moluscos. Os exemplares foram avaliados quanto à sua composição química (elementos Cd, Mo, Pb, Th e U) pela técnica de ICP-MS (Sistema NexION 300D da PerkinElmer) (Figura 5) do Serviço de Monitoração Ambiental do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE).

Para realização da análise foi empregada uma solução de 1 µg/L de berílio, cério, ferro, índio, lítio, magnésio, chumbo e urânio, respectivamente, para configuração do equipamento, referente aos parâmetros eletrônicos e analíticos.

Figura 5 – Equipamento para análises químicas por GFAAS (acima) e ICP-MS (abaixo).



Fonte: O autor.

Para validação dos procedimentos analíticos, foram empregados os cálculos referentes ao Número E_n , definido como a diferença entre o valor obtido na análise da amostra e o valor certificado, dividido pela raiz quadrada da soma quadrática das incertezas analíticas expandidas conforme a Equação 1. Em nível de confiança de 95%, a faixa adequada para os resultados dos materiais de referência foi entre -1 e 1, conforme recomendação da ISO 13528:2005 (ISO, 2005).

3.4 Toxicidade aguda em moluscos adultos de *Biomphalaria glabrata*

Os moluscos *B. glabrata*, com diâmetro de concha entre 11 e 15 mm, foram mantidos isolados em recipientes com capacidade para 200 mL de água para realização da separação dos animais sexualmente maduros. Em seguida, foram utilizados 10 espécimes de moluscos pré-selecionados para cada concentração teste (50, 100, 150 e 500 mg/L) dos lodos doméstico e industrial. A exposição foi realizada por 48 horas e todos os experimentos foram realizados em triplicata. A escolha dessas concentrações foi baseada em dados encontrados na literatura sobre os níveis normais das concentrações dos elementos químicos tóxicos observados em águas de estação de tratamento no Brasil (DORNE et al, 2011; BILLIONNET et al, 2012; BAT; ARIRI, 2018).

3.5 Exposição crônica dos moluscos adultos de *Biomphalaria glabrata*

Os caramujos sexualmente maduros, selecionados previamente, foram expostos por 15 dias aos lodos doméstico e industrial nas concentrações de 50, 100 e 150 e 500 mg/L. Para realização deste experimento, foram acondicionados em recipientes de polietileno com capacidade para 200 mL, vedados com tampa plástica perfurada para permitir a passagem do ar e deixar os animais em contato com as soluções durante todo o período de exposição. Foram utilizados 10 espécimes para cada concentração, e durante o período de exposição os animais foram alimentados diariamente com alface orgânico e a cada 5 dias as soluções foram repostas. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.6 Embriotoxidade

Para avaliar os efeitos dos lodos doméstico e industrial sobre os embriões de *B. glabrata*, foram colocadas tiras de polietileno translúcidas (10 x 10 cm) sobre a superfície da água dos aquários criadouros por um período de 24 h para que os moluscos realizassem a oviposição na superfície do material. Após a coleta das desovas, os embriões foram selecionados no estágio de blástula e expostos aos lodos. Os grupos analisados foram constituídos da seguinte forma: controle negativo com água filtrada e decolorada (C), controle positivo com 1 µg/mL de niclosamida (NCL), moluscicida recomendado pela organização mundial de saúde, e os grupos expostos ao lodo doméstico e industrial nas concentrações de 50, 100, 150 e 500 mg/L. Os grupos foram expostos ao lodo durante os intervalos de 24, 48 e

192 h (8 dias) em placas de poliestireno de 24 poços (Prolab, São Paulo, Brazil). Em seguida, foi avaliada a frequência de viabilidade (eclosão) e inviabilidade (mortos e malformados) com a utilização de um estereomicroscópio (Tecnival SQZ-SD4, São Paulo, Brazil). As exposições a diferentes concentrações dos lodos foram realizadas em triplicata.

3.7 Determinação da quantidade de células viáveis

Para a realização do teste de viabilidade celular foi utilizado uma adaptação do método padronizado por Louis e Siegel (2011), em que uma alíquota de 20 µL de hemolinfa de *B. glabrata* foi coletada e misturada há uma solução azul de tripano a 0,4% (Gibco) na proporção de 1:2 em microtubo com capacidade para 1,5 mL (Eppendorf® LoBind microcentrifuge tubes). Em seguida, o volume de, aproximadamente, 10 µL da solução formada foi aplicada no hemocitômetro (Câmara de Neubauer Espelhada, Bright-Line) na borda da câmara, entre a lamínula e a ranhura em forma de V. Após a adição das células, a amostra permaneceu em repouso durante o intervalo de 3 minutos em temperatura ambiente de $(25 \pm 2^\circ\text{C})$. Posteriormente, os hemócitos foram quantificados e avaliados quanto ao número de células viáveis e inviáveis. A leitura na câmara de Neubauer foi realizada nos quatro quadrantes (A, B, C e D) destinados para contagem e avaliação das células. Em seguida, a média das quatro leituras foi multiplicada por 10^4 para obtenção do número de células por mL da amostra aplicada no hemocitômetro (Equações 1 e 2). Logo após, o valor foi multiplicado por dois, referente a diluição de 1:2 da amostra com azul de tripano.

$$\text{Número de células (viáveis ou inviáveis)} = \frac{(A+B+C+D)}{4} \times 10^4 \times 2 \quad 1$$

$$\% \text{ de células (viáveis ou inviáveis)} = \frac{\text{Número de células (viáveis ou inviáveis)}}{\text{Número total de células}} \quad 2$$

3.8 Análise de alterações nos hemócitos

Para análise das alterações dos hemócitos, foram utilizados 5 animais expostos às concentrações crônica e aguda dos lodos. Para cada molusco foram coletados 100 µL de hemolinfa, transferida para lâminas microscópicas, sendo coberta por 100 µL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) misturado com solução de Ringer numa concentração final de 10 mM. Após esse procedimento, cada lâmina foi colocada durante 30 minutos em câmara úmida e ao término deste período, as células foram fixadas na lâmina com a utilização de 200 µL de gluteraldeído a 1% em solução de Ringer, por 5 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com solução de Ringer e coradas Giemsa (Merck) (PAVLICA et al., 2000).

A análise dos hemócitos foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico (Medilux), onde foram analisadas 3000 células para cada concentração teste, quantificando a presença de micronúcleos, binucleação e apoptose celular.

3.9 Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com Grazeffe et al. (2008) com algumas modificações. Hemócitos extraídos de *B. glabrata* foram utilizados neste ensaio para avaliar a atividade genotóxica dos lodos de esgoto doméstico (SRM 2781 - *Domestic Sludge*) e industrial (SRM 2782 - *Industrial Sludge*). O ensaio cometa é um método sensível para avaliar os danos do DNA em células individuais. A abordagem consiste na análise da migração eletroforética de DNA de nucleóides obtidos após lise celular em uma fina camada de agarose (AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018).

3.9.1 Montagem das lâminas

Foram utilizados 5 moluscos adultos por grupo com diâmetro variando entre 12-16 mm. Cerca 100 µL de hemolinfa de *B. glabrata* foram coletados na ausência e na presença de diferentes concentrações dos lodos e homogeneizado em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Sigma-aldrich) dissolvida em PBS (Soro Bovino Fetal) pH de 7,4. Imediatamente, este homogenato foi colocado sobre uma lâmina de microscópio, previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5% (Sigma-aldrich)

dissolvida em PBS, (pH 7,4), coberto com lamínula e mantido a 4 °C (10 minutos). Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton-X 100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) por 12 h à 4 °C. Após o processo de lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução de tampão alcalino com pH de 13,0 (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM), por 20 minutos. Posteriormente, a corrida eletroforética, a 0,74 V/cm e 300 mA, aconteceu durante 20 minutos a 4 °C. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) por 15 min e fixadas com álcool absoluto por 10 minutos e conduzidas a análise em microscópio de fluorescência.

3.9.2 Análise das lâminas por meio do microscópio de fluorescência

As lâminas foram coradas com 50 µL de uma solução de SYBR safe (Invitrogen) (1:500). Foram analisadas 100 células por animal em microscópio de fluorescência (Nikon H550L) em aumento de 400x, com um filtro de excitação de 450-490 nm, filtro de emissão de 500-550 nm e um filtro de barreira de 495 nm. A análise visual dos danos ao DNA foi realizada de acordo com a metodologia de Collins et al. (2008). Os nucleóides foram divididos em 5 categorias de dano ao DNA (0 – 4), dependendo da extensão do dano (Figura 6). A categoria 0 indica que não ocorreu danos, já as categorias de 1 a 4 indicam danos em níveis crescentes sobre o material genético. Para avaliar o grau de dano ao DNA, foi utilizado o Índice de Dano (ID) como parâmetro. O ID foi calculado de acordo com a formula: $ID = 0 (\text{número de cometas categoria 0}) + 1 (\text{número de cometas categoria 1}) + 2 (\text{número de cometas categoria 2}) + 3 (\text{número de cometas categoria 3}) + 4 (\text{número de cometas categoria 4})$.

Figura 6 - Representação de um nucleóide padrão e seus respectivos graus de classificação (Grau 0 - 4) de acordo com a extensão do dano observado durante análise das lâminas por meio de um microscópio de fluorescência.



Fonte: O autor.

3.10 Análises dos resultados

A análise estatística dos resultados obtidos com os bioensaios e os testes de genotoxicidade foram realizados com a utilização do programa GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Prism, San Diego, California, USA) por meio da análise de variância (ANOVA), Student-Newman-Keuls, Tukey e Bonferroni. O nível de significância dos resultados foi considerado quando $p < 0,05$.

Para a descrição das concentrações dos elementos químicos quantificados nos exemplares de *B. glabrata* expostos aos lodos, os valores de referência foram empregados na estatística descritiva a partir dos cálculos de média, desvio padrão e coeficiente de variação. A análise dos resultados obtidos pelo GFAAS e ICP-MS foi realizada por testes paramétricos e não paramétricos com a utilização do programa STATISTICA 1.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a apresentação dos resultados dos efeitos biológicos da exposição dos moluscos *B. glabrata* aos lodos de esgoto industrial e doméstico (materiais de referência) foram necessárias algumas etapas experimentais. Primeiramente, foram obtidos os resultados dos testes de bioacumulação por meio de técnicas espectrométricas GFAAS e ICP-MS. Na sequência foram realizados os ensaios de toxicidade em moluscos adultos e na fase embrionária, com o propósito de avaliar a sobrevivências dos animais a baixas concentrações dos elementos químicos presentes nos materiais de referências. Posteriormente, foram realizadas as análises citotóxica e genotóxica em moluscos adultos expostos aos lodos estudados.

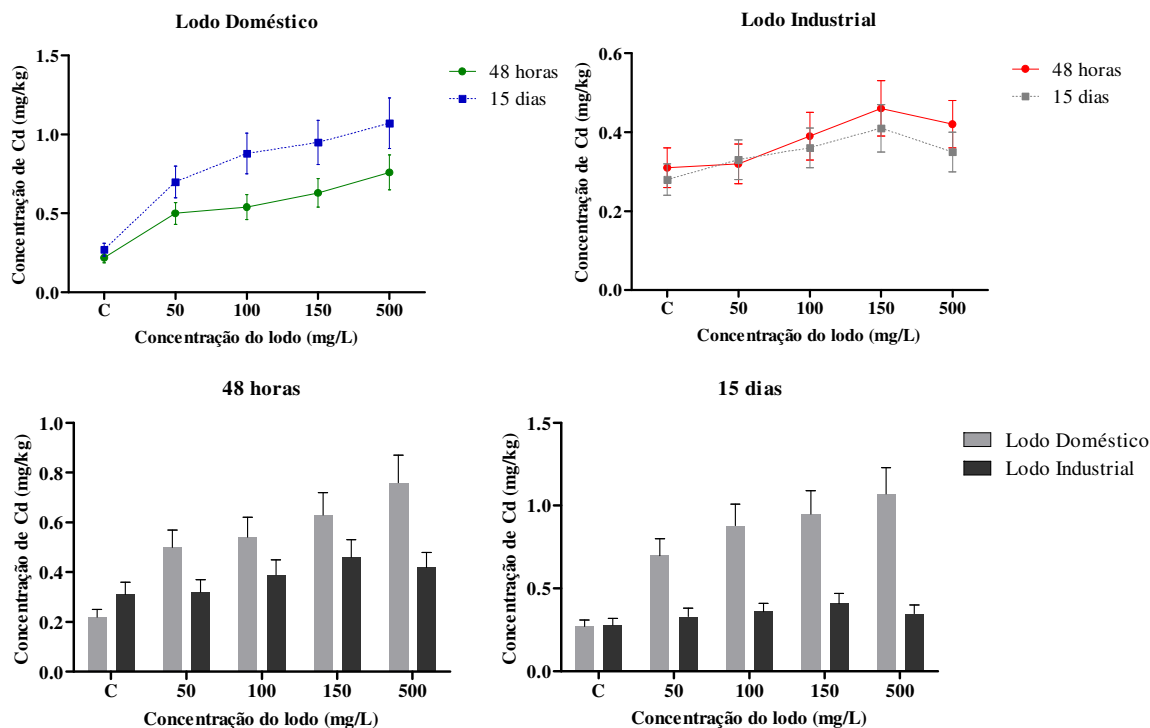
4.1 Bioacumulação de elementos químicos nos tecidos de *B. glabrata*

Após as exposições aguda e crônica dos animais aos lodos doméstico e industrial, as concentrações de elementos químicos essenciais e tóxicos indicaram as substâncias químicas acumuladas e sua correlação com os danos observados.

4.1.1 Cádmio (Cd)

Na Figura 7, é possível observar na parte superior a relação dos níveis de cádmio bioacumulado após exposição aguda (48 horas) e crônica (15 dias) aos lodos de esgoto doméstico e industrial, respectivamente. Além da comparação dos lodos entre si para o mesmo período de exposição, na parte inferior da figura.

Figura 7 - Comparação entre as concentrações de cádmio quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.



Fonte: O autor.

Pode ser observado no gráfico (Figura 7) elaborado para o lodo doméstico, que independente do período de exposição, a concentração de cádmio demonstrou um aumento linear diretamente correlacionado com o aumento da concentração do lodo a que os moluscos foram expostos, além disso, a comparação dos resultados após a exposição aguda e crônica demonstrou que os animais submetidos ao lodo doméstico por 15 dias apresentaram uma maior concentração de cádmio nos tecidos. Na Figura 7 é possível observar ainda que, com exceção dos pontos que se cruzam na concentração de 50 mg/L do lodo, todos os demais refletiram um padrão semelhante. Contudo, diferentemente do que foi verificado para o lodo doméstico, a exposição de 48 horas demonstrou que a concentração do cádmio no corpo dos caramujos foi um pouco maior quando comparado com a exposição de 15 dias.

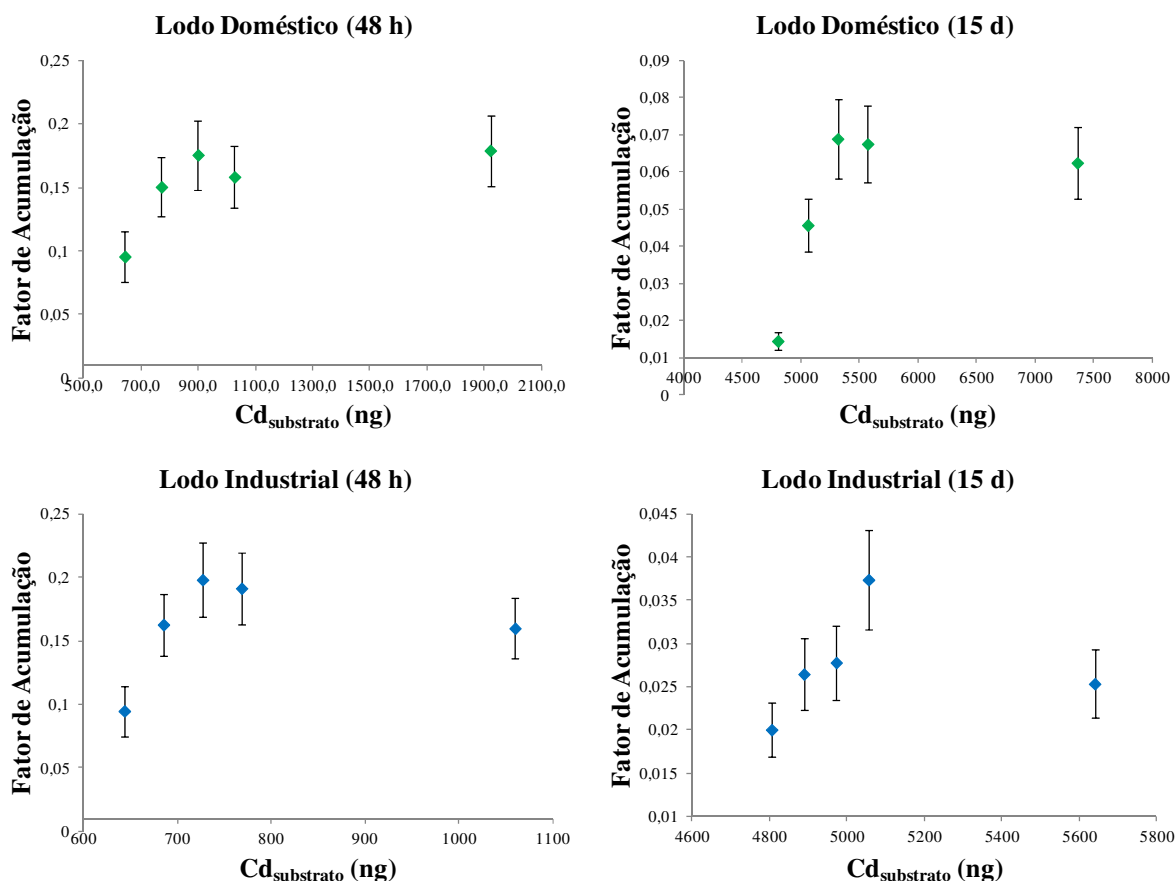
Quando os lodos foram comparados entre si, independentemente do período, os moluscos submetidos ao lodo doméstico apresentaram maiores níveis de cádmio presente em seus corpos. Este resultado pode ser justificado pelo fato do lodo de esgoto doméstico apresentar em sua composição uma maior concentração de cádmio. Além disso, a constituição

química do composto pode propiciar condições favoráveis para melhor absorção do elemento químico analisado pelo *B. glabrata*. Por isso, a relação entre a quantidade de cádmio e o fator de acumulação foi estudada para os animais durante todos os intervalos de exposição.

Em seguida, o fator de acumulação de cádmio foi estimado para cada lodo e seus respectivos tempos de exposição com base nos resultados da quantidade de cádmio determinado nos moluscos (Figura 8). Para ambos os lodos, doméstico e industrial, independente do período de exposição aos compostos, o fator de acumulação para cádmio apresentou uma relação logarítmica inversamente proporcional as concentrações testadas, ou seja, quanto maior a concentração do elemento no substrato, menor o seu fator de acumulação, pois a acumulação segue um comportamento específico para o *B. glabrata*.

Em síntese, a análise dos resultados evidenciou que ocorreu um aumento da bioacumulação para o cádmio, com exceção do ponto de 500 mg/L para as exposições com lodo industrial. Estando o cádmio possivelmente acumulado em maior quantidade nos órgãos do molusco, tais como a glândula digestiva e hepatopâncreas. Assim, é possível afirmar que o molusco de água doce *B. glabrata* pode ser utilizado em estudo para avaliar a contaminação de ambientes aquáticos compatíveis com sua sobrevivência. Além disso, é sugerido que o cádmio possivelmente possa estar diretamente relacionado com os danos genotóxicos observados nas células hemocitárias visto que o acúmulo de cádmio foi dependente da concentração para os animais expostos ao lodo doméstico.

Figura 8 - Relação entre a quantidade de cádmio no substrato (lodo) e seu respectivo fator de acumulação.



Fonte: O autor.

Os mesmos resultados de bioacumulação de cádmio pelo *B. glabrata* exposto aos lodos de esgoto de forma crônica e aguda foram encontrados em caramujos expostos ao cádmio, em que apresentaram níveis significativamente elevados desse metal em seus corpos em quatro semanas a 17 °C ou 28 °C, indicando que esta espécie e/ou seus parentes próximos podem se mostrar valiosos como biomonitores para poluição de metais (ALLAH et al., 2013). Estudos realizados com cádmio observaram que este elemento químico tóxico se acumula em diversos organismos, tais como vertebrados, várias espécies de invertebrados, plantas entre outros. Seus efeitos deletérios em nível molecular são oriundos da produção de espécies reativas do oxigênio, inibição de mecanismos de reparo e/ou danos diretos a estrutura do DNA (ZHANG; REYNOLDS, 2019). Para os moluscos, estes danos ocorrem após o cádmio se acumular no tecido muscular e principalmente nos órgãos desses animais (MOK et al., 2014). Em caramujos *B. glabrata* tratados com cádmio, foi demonstrado que os

principais locais de bioacumulação deste elemento químico tóxico foram a região pulmonar, gonadal, cefalopodal e glândula digestiva, este último o maior acumulador de cádmio (GUERRERO et al., 2000).

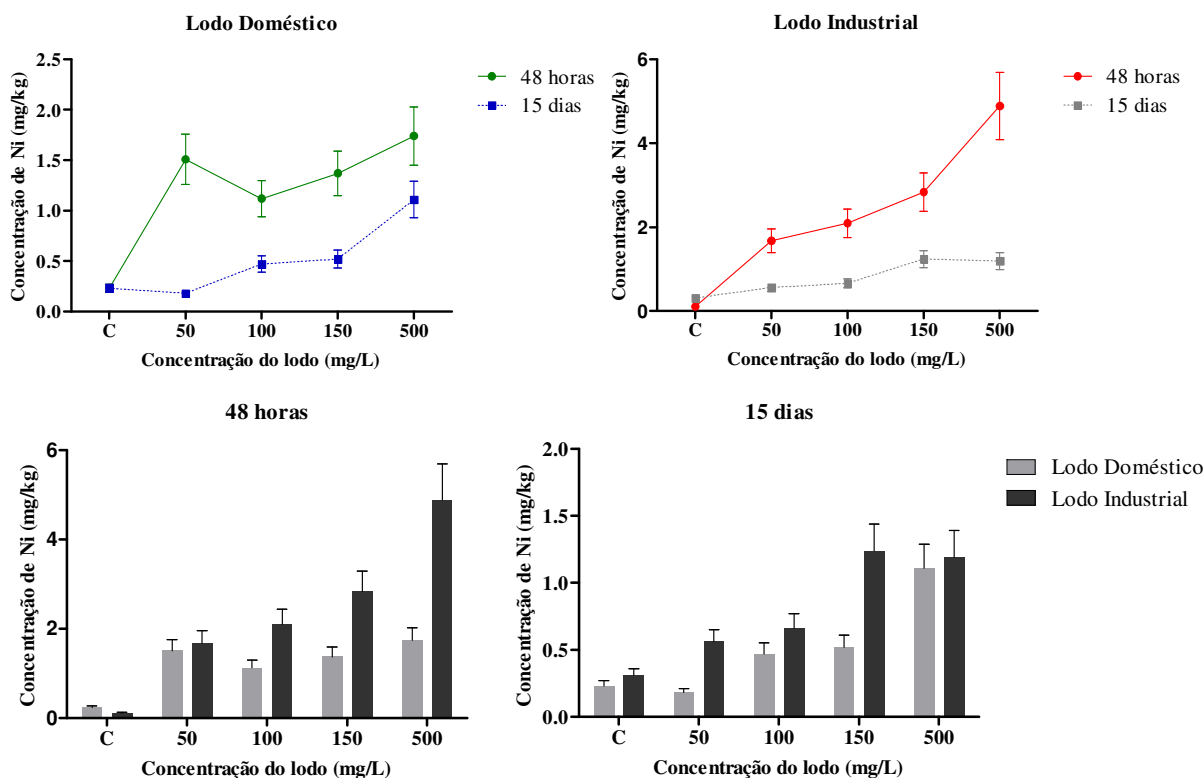
Mebane (2006) observou que o cádmio pode provocar efeitos toxicológicos e fisiológicos graves em organismos aquáticos, durante exposições agudas a níveis elevados de cádmio, este metal pesado pode perturbar gravemente os mecanismos de homeostase do cálcio, o que pode levar à morte do indivíduo. Em outro estudo, os autores sugerem que, além de seus efeitos tóxicos para o metabolismo, cádmio também pode reduzir a taxa de sobrevivência dos moluscos por meio de um efeito depressor na atividade alimentar e locomotora (HABIB et al., 2016).

Entretanto, estudo realizado por Cantinha et al. (2017) utilizando moluscos da espécie *B. glabrata* submetidos a concentrações subletais de cádmio, demonstraram a ação de mecanismos intracelulares de atenuação dos danos relacionados a proteína HSP70, pois ocorreu um aumento na expressão da mesma após o período de exposição a baixas concentração de cloreto de cádmio. Além do mais, os autores observaram que a indução do HSP70 pelo cádmio pode estar correlacionada a uma maior sobrevivência. Assim, pode ser provável que um aumento na atividade da enzima HSP70, com consequente potencialização da capacidade de desintoxicação, possa estar relacionado a redução dos níveis de cádmio após a concentração de 150 mg/L para os caramujos submetidos ao lodo industrial em todos os períodos de exposição.

4.1.2 Níquel (Ni)

Na Figura 9, pode ser observada (gráficos na posição superior da figura) a relação entre concentração de níquel presente nos tecidos do *B. glabrata* e as exposições aguda e crônica aos lodos de esgoto doméstico e industrial, respectivamente, enquanto, os dois gráficos localizados na região inferior da Figura 9 apresentam a comparação dos lodos entre si após o mesmo período de exposição.

Figura 9 - Comparação entre as concentrações de níquel quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.



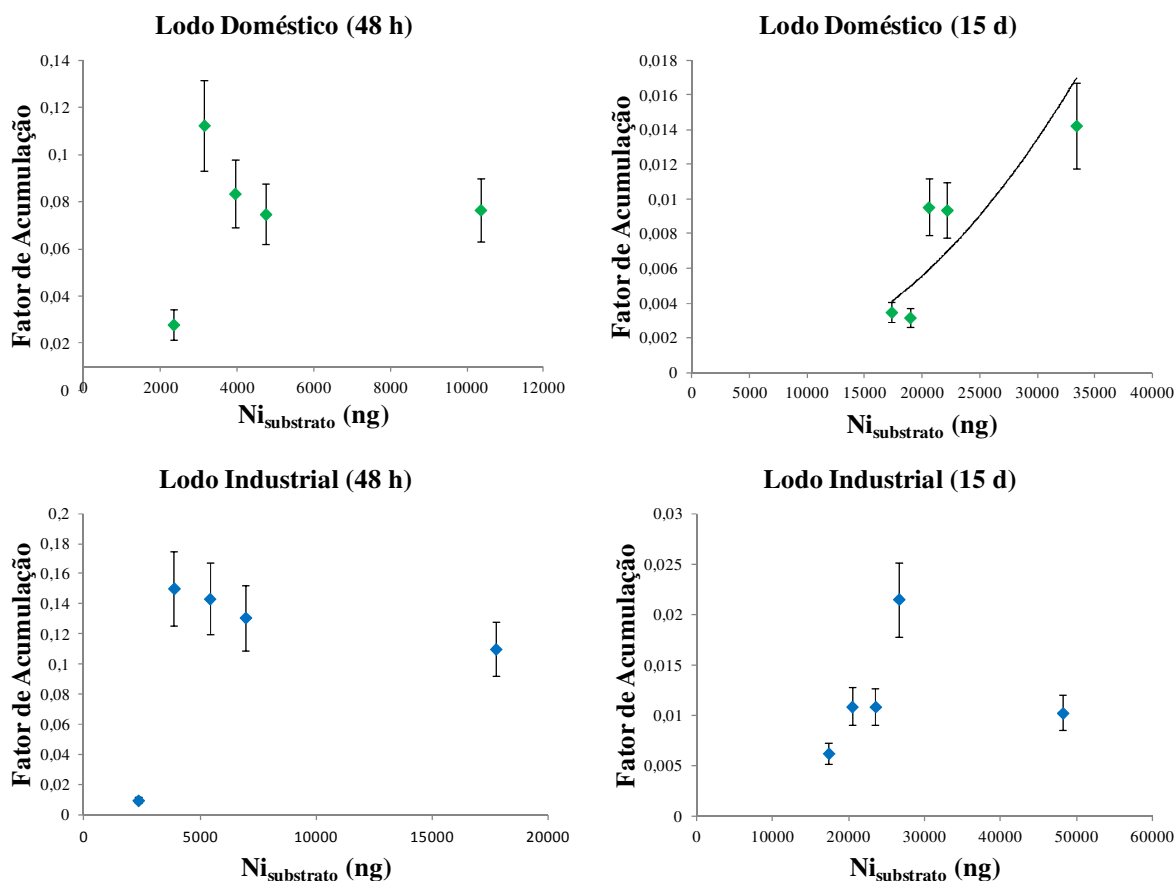
Fonte: O autor.

Para o níquel (Figura 9), foi observado uma interação diferente do que ocorreu com o cádmio, pois, para os dois lodos de esgoto estudados, as maiores concentrações de níquel foram evidenciadas nos caramujos submetidos aos compostos durante o intervalo de 48 horas. Contudo, no experimento realizado com o lodo doméstico pode ser verificado que houve um aumento da concentração de níquel correspondente com o aumento na quantidade de substrato a qual os animais foram expostos. Para os grupos submetidos ao lodo industrial, os moluscos expostos de forma aguda apresentaram um aumento proporcional nas concentrações do lodo utilizado para cada grupo. Entretanto, nos indivíduos submetidos ao material de forma crônica, pôde ser observado que, a partir da concentração de 150 mg/L, os níveis de níquel se mantiveram constantes.

Comparando os experimentos de exposição aos lodos entre si, é possível verificar que os grupos submetidos ao lodo industrial apresentaram uma bioacumulação ligeiramente mais elevada que os indivíduos expostos ao lodo doméstico. A relação entre a quantidade de níquel

e o fator de acumulação (Figura 10) foi calculado para os moluscos submetidos aos lodos doméstico e industrial durante todos os intervalos de exposição.

Figura 10 - Relação entre a quantidade de níquel no substrato (lodo) e seu respectivo fator de acumulação.



Fonte: O autor.

Dessa forma, pode-se observar um padrão semelhante de declínio gradativo na relação entre o fator de acumulação e os níveis de níquel presente no meio onde os caramujos permaneceram durante a exposição aos lodos. Em todos os gráficos da Figura 10 foi demonstrado que o fator de acumulação é inversamente proporcional ao aumento na quantidade de níquel presente no meio aquático.

Os resultados mostraram que há uma maior bioacumulação de níquel após períodos de exposição aguda ao elemento químico ou compostos que o possuam em sua composição. Desta forma, após análise conjunta com os dados obtidos pelo ensaio cometa e teste do

micronúcleo, o níquel em concentrações consideradas elevadas pode desencadear possíveis efeitos genotóxicos relacionado ao aumento do estresse oxidativo intracelular e consequente danos a molécula do DNA. Estudos utilizando 4 espécies de invertebrados, dentre eles o molusco de água doce *Lymnaea stagnalis*, sugerem a possibilidade de existir um limiar real para a bioacumulação de níquel no organismo. Deste modo, assim que os organismos passam a acumular o elemento, a toxicidade começa a ocorrer (LEONARD; WOOD, 2013).

Experimentos realizados com peixes da espécie *Prochilodus lineatus* expostos ao níquel demonstraram que este elemento se acumula em diferentes órgãos e tecidos, tais como os rins, fígado, brânquias e músculo. Tendo sido verificado ainda que a bioacumulação varia de acordo com o tempo de exposição (PALERMO et al., 2015). De acordo com o resultado da quantificação de níquel em *B. glabrata*, foi possível observar que a exposição aguda apresentou uma maior concentração do elemento químico nos tecidos do molusco.

Além do que, os níveis de metalotioneína (proteína com propriedades de ligação a metais) em peixes aumentaram no fígado e brânquias após exposição ao níquel, implicando que a presença de níquel nesses locais poderia induzir a síntese de metalotioneína. Também foi observado que a exposição ao níquel acarretou danos nas defesas antioxidantes, aumentando a peroxidação lipídica no fígado dos peixes expostos. Além do mais, os autores demonstraram que os efeitos deletérios no DNA foram exacerbados nas células sanguíneas e branquiais dos peixes expostos ao níquel, indicando o potencial genotóxico deste elemento químico (PALERMO et al., 2015).

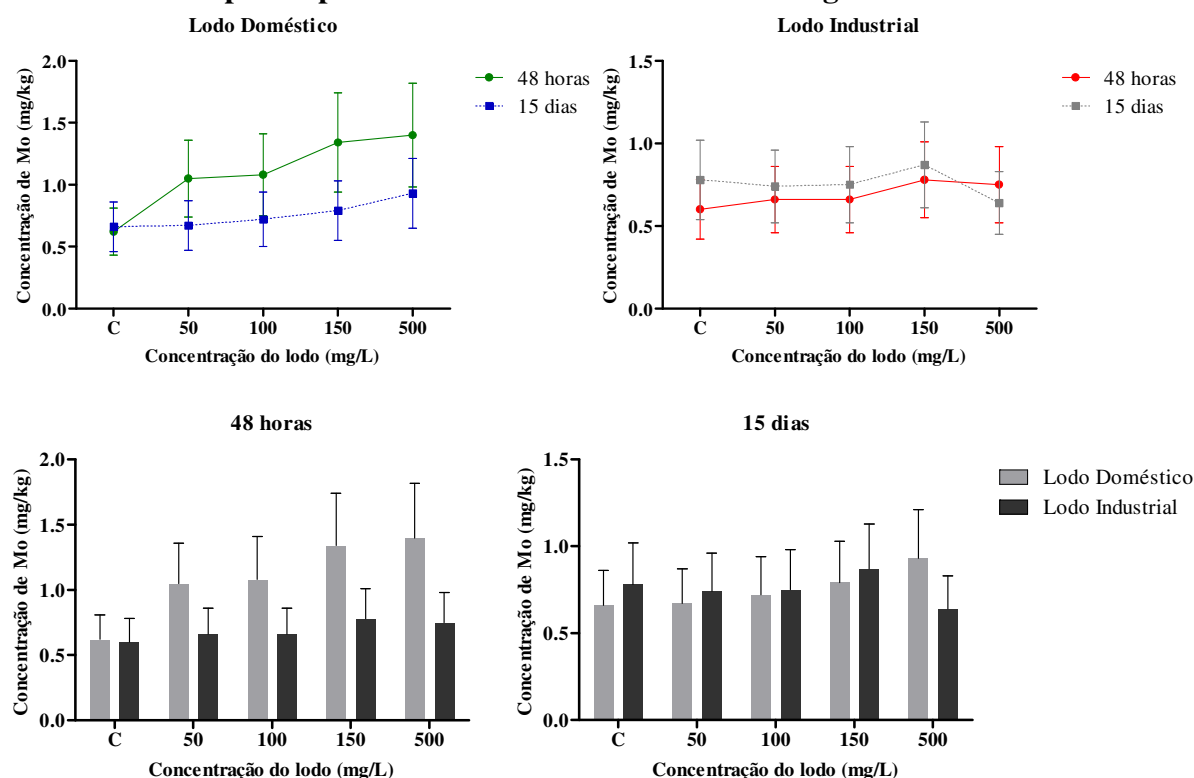
Em um trabalho desenvolvido com tecido de brânquias de peixes dourado, os pesquisadores puderam evidenciar que níveis alterados de níquel interagem com o tecido promovendo a inibição da atividade de enzimas antioxidantes, resultando no aumento do estresse oxidativo (KUBRAK et al., 2013). Portanto, quando o sistema de defesa antioxidante mostra-se deficiente ou inativo, é presumível que os danos oxidativos possam ocorrer, assim como a peroxidação lipídica. Dessa maneira, o estresse oxidativo ocorre, quando a quantidade de espécies reativas do oxigênio aumenta de forma significativa ou o sistema de defesa antioxidante se torna inativo (MANOJ; PADHY, 2013). Estes dados podem estar correlacionados com uma possível explicação para indução dos danos observados após a realização dos ensaios genotóxicos. Estudos realizados com células humanas (fibroblastos dérmicos) utilizando o ensaio cometa demonstraram que cádmio e níquel, dependendo de suas concentrações, podem provocar danos genotóxicos. Estes elementos químicos são

responsáveis pela ocorrência de quebras na estrutura do DNA por meio de interações eletrostáticas com grupos fosfato do ácido nucleico (BELLIARDO et al., 2018).

4.1.3 Molibdênio (Mo)

Na Figura 11, estão apresentados os resultados referentes as concentrações de molibdênio mensuradas nas partes moles do caramujo *B. glabrata* após separação da concha. Nesta figura, pode ser verificado a relação dos níveis de molibdênio presente no organismo dos invertebrados após exposição de 48 horas e 15 dias aos lodos. Além disto, os lodos de esgoto doméstico e industrial foram comparados entre si após o mesmo período de exposição para determinar o substrato que proporcionou as mais elevadas concentrações de molibdênio presentes nas amostras.

Figura 11 - Comparação entre as concentrações de molibdênio quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.



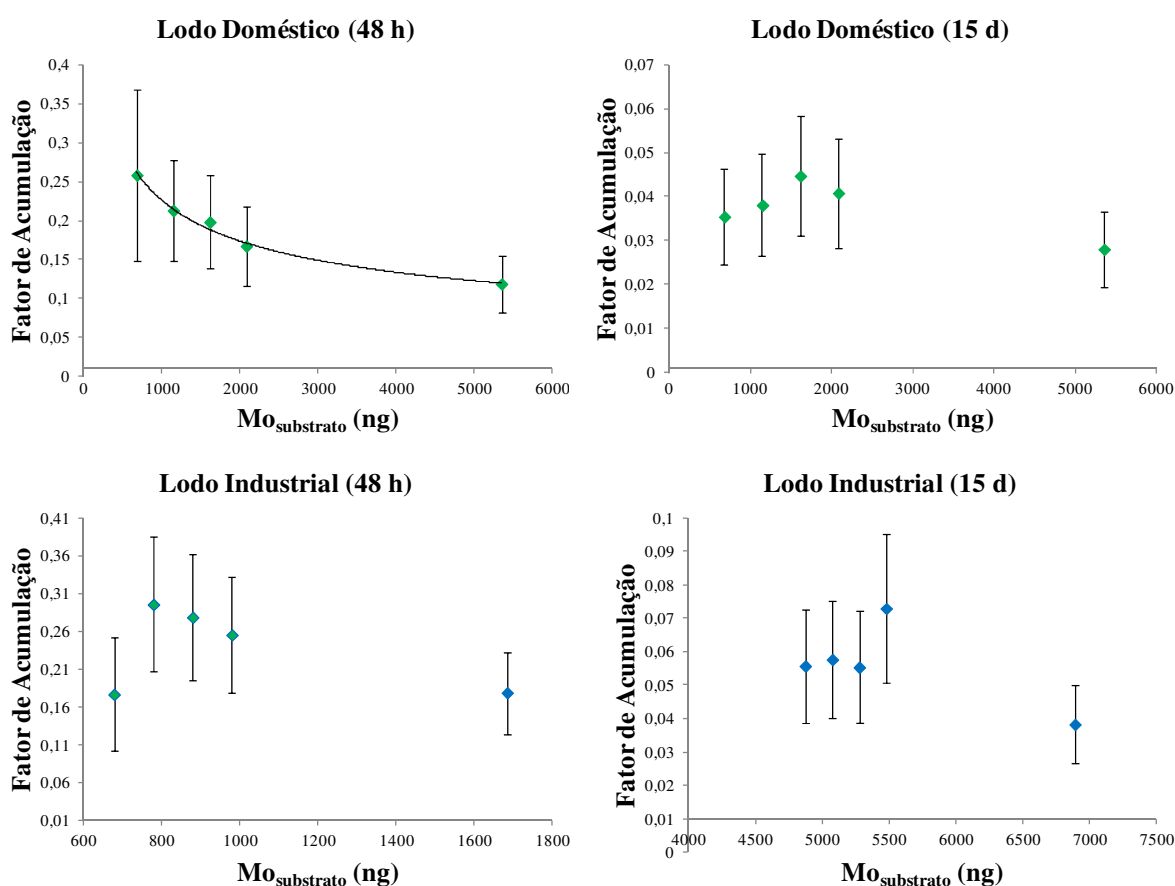
Fonte: O autor.

Para finalizar as análises referentes a acumulação do elemento químico molibdênio, a relação entre o fator de acumulação e a quantidade do elemento presente no meio aquático foi determinada para os lodos domésticos e industrial, de acordo com o tempo de exposição aos

compostos (Figura 12). A estimativa foi realizada com base nos resultados obtidos após a determinação da concentração de níquel presente nos tecidos dos moluscos.

A concentração de molibdênio nos moluscos apresentou padrões diferentes para cada tipo de substrato. Os grupos submetidos ao lodo doméstico e industrial por 48 horas apresentaram uma bioacumulação mais elevada quando comparado com os grupos expostos no intervalo de 15 dias (Figura 12). Para os indivíduos submetidos ao lodo industrial é possível observar um padrão semelhante para os dois intervalos de exposição, os indivíduos expostos de forma crônica demonstraram uma maior concentração de molibdênio quando correlacionado com os animais expostos de forma aguda, porém, na concentração de 500 mg/L pode ser verificado uma redução dos níveis de molibdênio no grupo submetido ao lodo por 15 dias (Figura 11).

Figura 12 - Relação entre a quantidade de molibdênio no lodo doméstico e industrial e fator de acumulação.



Fonte: O autor.

Entretanto, o estudo realizado por Siddiqui et al. (2015), utilizando fibroblastos epidérmicos de camundongos expostos ao molibdênio em associação com nanopartículas, demonstrou uma redução na viabilidade celular dependente da concentração e tempo de exposição, além de alterações na morfologia celular. Foi verificado um aumento significativo do estresse oxidativo nas células, tendo sido confirmado pelo aumento na produção da peroxidação lipídica e espécies reativas do oxigênio, bem como a diminuição nos níveis enzimáticos de glutathione e catalase. Foi observado também a ocorrência da diminuição do potencial da membrana mitocondrial refletindo em comprometimento funcional da membrana presente na mitocôndria. A análise do ciclo celular e os dados do ensaio cometa revelaram que a associação do molibdênio as nanopartículas induziram o bloqueio do ciclo celular nas fases G2/M e danos a molécula do DNA. Portanto, os autores concluem, com base nos testes realizados, que a associação molibdênio-nanopartículas foi capaz de induzir citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade em células fibroblásticas de camundongos (SIDDQUI et al., 2015).

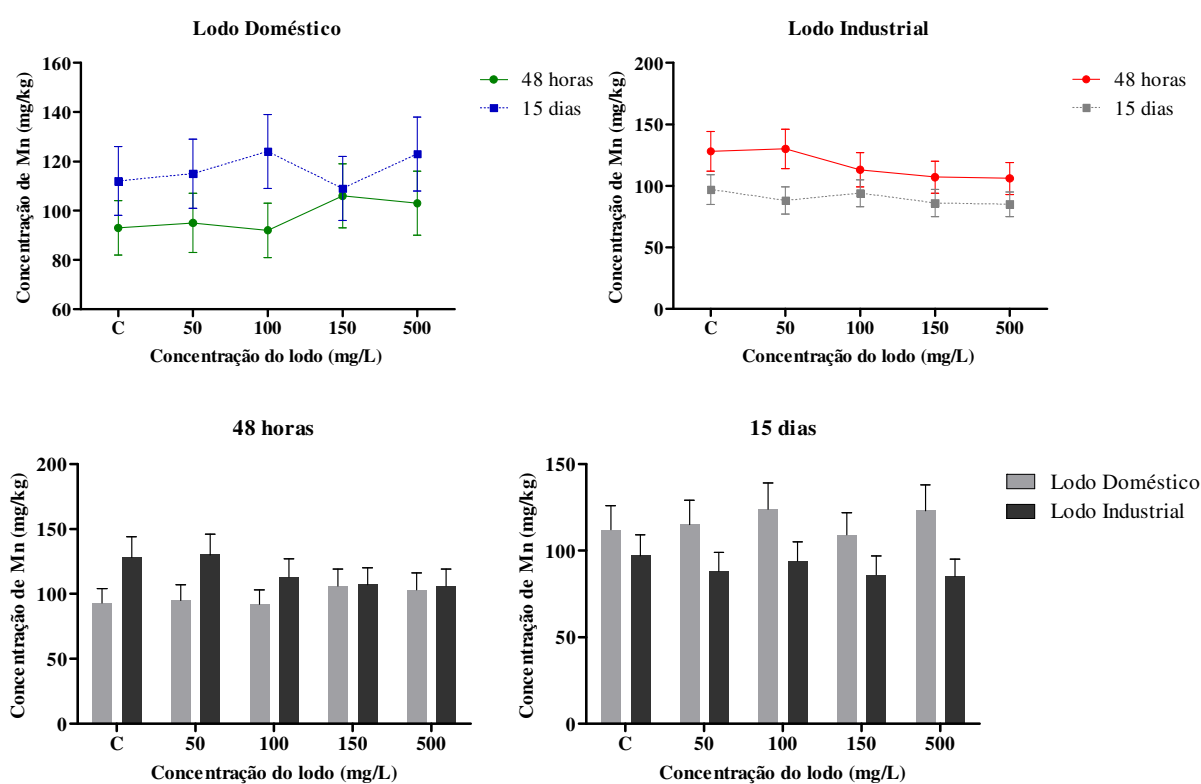
Heijerick et al. (2012) avaliaram os efeitos da exposição crônica ao molibdênio em 9 espécies de animais aquáticos, dentre elas, os moluscos *Mytilus edulis* e *Crassostrea gigas*. Foi observado que os moluscos *M. edulis* apresentaram a maior sensibilidade ao molibdênio quando comparados aos outros organismos testados. Além disso, a comparação dos dados disponíveis para o molibdênio presente de forma crônica nos ambientes marinho e de água doce resultou em maior sensibilidade das espécies marinhas quando comparada com os organismos que habitam os ambientes de água doce.

Estes resultados podem sugerir que, assim como outros organismos, os moluscos *B. glabrata* também necessitem de determinadas quantidades de molibdênio para otimização de suas funções orgânicas. No entanto, acima destas concentrações é possível que o elemento químico possa exercer efeitos celulares adversos relacionados com o aumento na produção de espécies reativas do oxigênio e danos a macromoléculas, entre elas a membranas citoplasmáticas, as organelas e o DNA, e danos citotóxicos e genotoxicidade. É sugerido, ainda, que estes efeitos deletérios podem ser amplificados quando houver um sinergismo do molibdênio como outros elementos químicos.

4.1.4 Manganês (Mn)

Na Figura 13, observa-se na parte superior a relação dos níveis de manganês mensurados nos tecidos do *B. glabrata* após exposição aos lodos doméstico e industrial nos intervalos de 48 horas e 15 dias. Ademais, na parte inferior da Figura 13, também é demonstrado os resultados da comparação dos lodos entre si após o mesmo período de exposição.

Figura 13 - Comparação entre as concentrações de manganês quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.



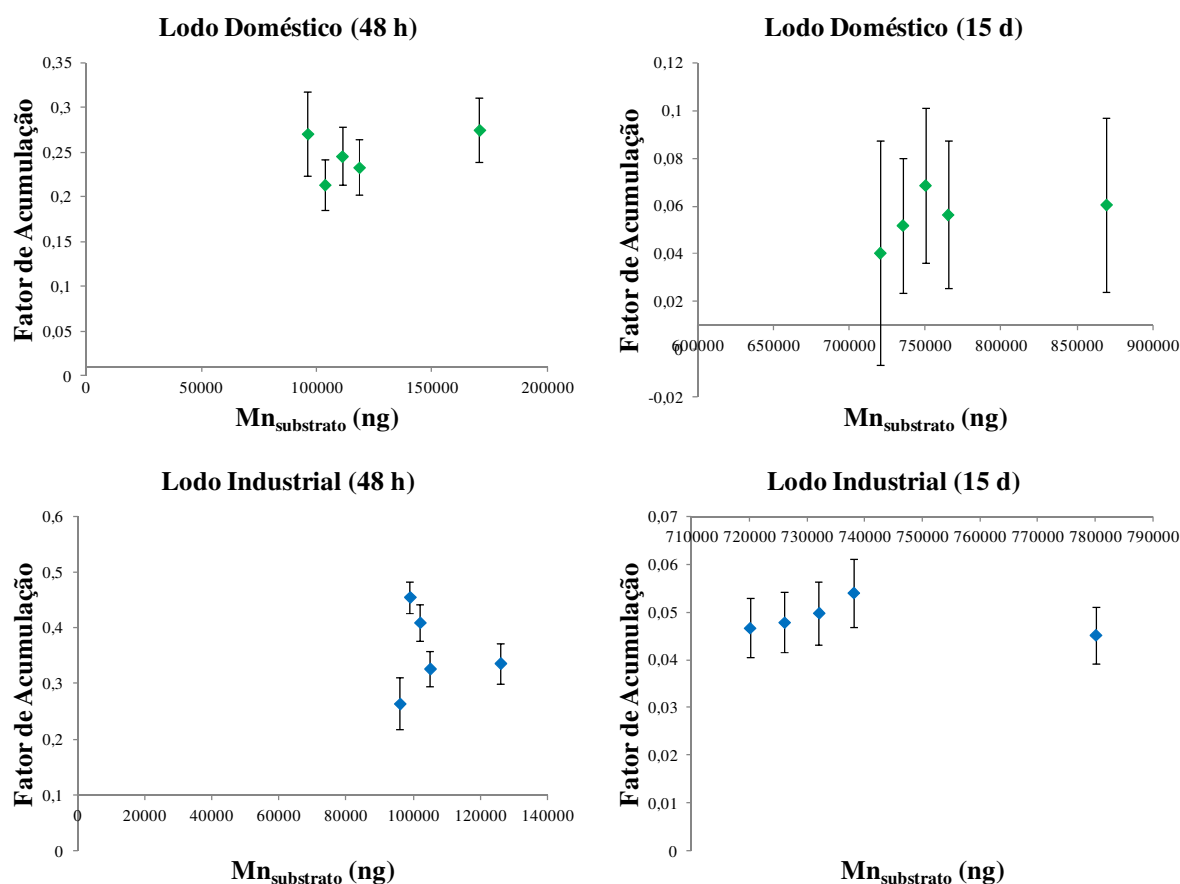
Fonte: O autor.

Pode ser observado no gráfico da Figura 13, elaborado para o lodo doméstico, que independente do período de exposição, a bioacumulação para o intervalo de 15 dias do manganês no corpo dos moluscos apresentou um padrão irregular quando correlacionado como as concentrações do lodo presente no meio. É observado ainda uma diminuição na quantidade do elemento químico acumulado pelos caramujos quando os mesmos foram submetidos a concentração de 150 mg/L. Após exposição dos animais por 48 horas ao lodo foi demonstrado uma elevação no acúmulo de manganês presente no substrato para concentração de 150 e 500 mg/L. Em relação aos grupos expostos ao lodo industrial

(Figura 13), é possível verificar que em ambos os intervalos de exposição há uma leve tendência de redução da bioacumulação de manganês para as concentrações de 100, 150 e 500 mg/L.

Além das análises individuais para cada lodo, é possível observar os resultados comparativos dos lodos entre si após os mesmos intervalos de exposição (Figura 13). Para os caramujos expostos de forma aguda pode ser observado que nas concentrações de 150 e 500 mg/L a bioacumulação nos animais foi semelhante, entretanto, nos grupos submetidos ao lodo de forma crônica foi demonstrado que os moluscos expostos ao lodo de esgoto doméstico apresentaram maiores concentrações em seus tecidos. Na Figura 14, são mostrados os gráficos onde são apresentados a relação da quantidade de manganês presente no meio aquático e o fator de acumulação, calculado para os lodos doméstico e industrial após a exposição aguda e crônica.

Figura 14 - Relação entre a quantidade de manganês no substrato (lodo) e seu respectivo fator de acumulação.



Fonte: O autor.

Em seguida, o fator de acumulação para manganês foi estimado para cada composto (doméstico e industrial) e seus respectivos tempos de exposição com base nos resultados da quantidade de manganês determinado no corpo dos caramujos *B. glabrata*. Dessa maneira, pode-se observar um padrão semelhante de decréscimo contínuo na relação entre o fator de acumulação e os níveis de manganês contido no meio onde os animais permaneceram durante a exposição aos lodos. Assim, em virtude do exposto, é possível destacar que todos os gráficos presentes na Figura 14 demonstram que o fator de acumulação é inversamente proporcional ao aumento na concentração de manganês presente no meio onde os caramujos foram submetidos aos lodos.

A bioacumulação do manganês apresentou valores bem mais elevados quando comparados com as concentrações de cádmio, níquel e molibdênio quantificados nos *B. glabrata* utilizados nestes estudos. Desse modo, a concentração de manganês observada nos caramujos pode estar diretamente relacionada com as necessidades celulares do elemento químico (HABIB et al., 2016). Além disso, o aumento sequencial na concentração de manganês, as quais os moluscos foram expostos utilizando o lodo industrial, demonstrou que pode existir uma tendência de estabilização ou até mesmo de diminuição na quantidade do elemento químico bioacumulado, pois é conhecido que altos níveis de manganês podem atuar reduzindo a quantidade de alimento ingerido.

Mesmo o manganês sendo um constituinte fundamental em enzimas e cofatores, como a glutamina sintetase e a superóxido dismutase, que são essenciais para o funcionamento adequado de vários órgãos (YOKEL, 2009), após realizar estudos com caramujos da espécie *Biomphalaria alexandrina* submetidos ao manganês, foi demonstrado que a locomoção e os hábitos alimentares desses animais foram completamente inibidos. Pois, a dopamina está envolvida na geração de padrões neurais que controlam a capacidade de se alimentar e a locomoção dos caramujos. Além do mais, a toxicidade do manganês para organismo de água doce é mediada pela competição de íons Mn^{2+} com íons Ca^{2+} e H^{+} no preenchimento de alguns locais dentro das células. Estas observações mostraram que tanto a locomoção como a alimentação são uns dos primeiros comportamentos alterados em decorrência de distúrbios ambientais (HABIB et al., 2016).

Martin et al. (2008) avaliaram os efeitos do manganês no sistema nervoso do molusco bivalve *Crassostrea virginica*, tendo sido observado que embora o elemento químico seja essencial em quantidades vestigiais, seu acúmulo tecidual pode ocasionar danos neurotóxicos,

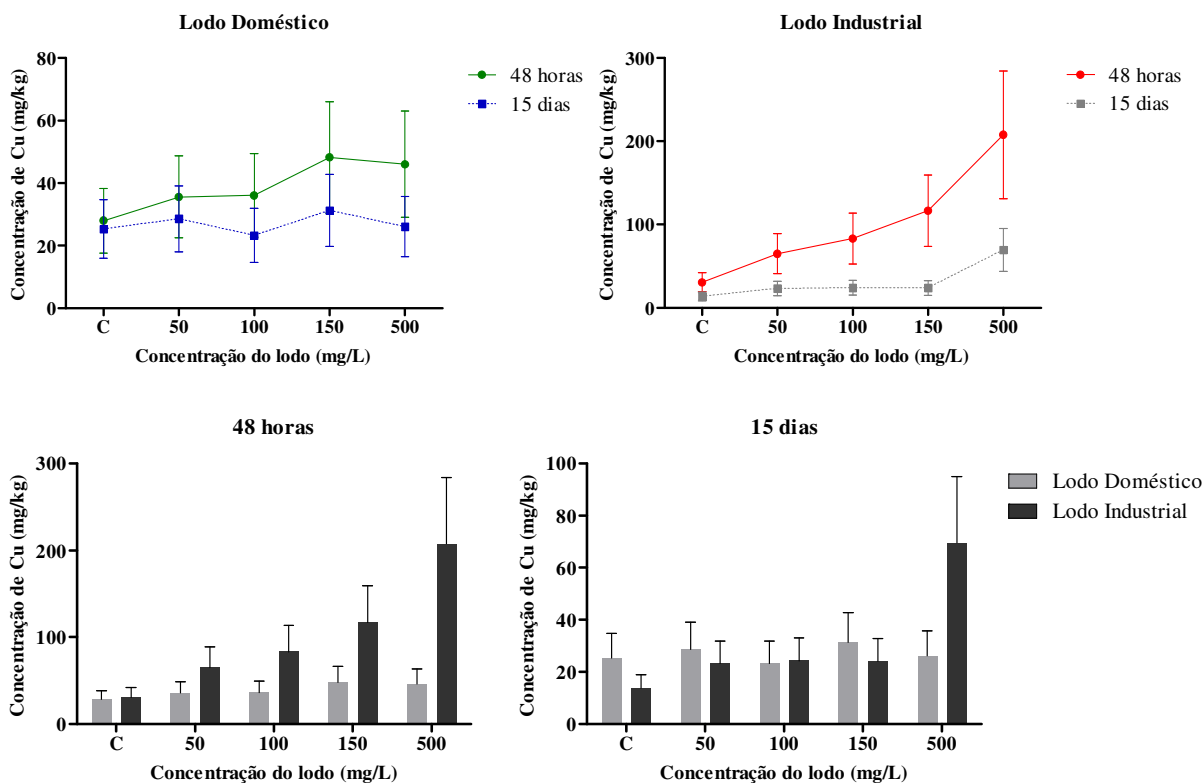
evidenciados principalmente no sistema dopaminérgico pela diminuição nos níveis endógenos de dopamina nos gânglios cerebrais, viscerais e nas brânquias. Dessa forma, é sugerido que a exposição ao manganês danifique os receptores de dopamina localizados no epitélio branquial ou possam interromper o mecanismo de transdução de sinal pós-receptor, além de poder ter ocorrido perda neuronal, diminuição da liberação terminal de dopamina ou deficiência na recaptação da dopamina. Assim, a partir dos resultados obtidos, os autores do estudo puderam especificar a toxicidade do manganês para o sistema dopaminérgico do animal.

4.1.5 Cobre (Cu)

Para o moluscicida cobre, foi demonstrado na região superior a relação dos níveis de cobre bioacumulado após exposição aguda e crônica aos lodos de esgoto doméstico e industrial, respectivamente (Figura 15). Logo abaixo são apresentados os gráficos comparativos dos lodos entre si para o mesmo período de exposição.

Os indivíduos expostos a intervalos de 48 horas apresentaram uma maior concentração de cobre quando comparados com os animais submetidos aos lodos durante um período de 15 dias. Além disso, pôde-se verificar que, para o experimento realizado com o lodo industrial por 48 horas, ocorreu um aumento da acumulação de cobre diretamente proporcional a concentração de substrato presente no meio. Quando os compostos foram comparados entre si, demonstrou-se um maior acúmulo de cobre oriundo do lodo industrial, provavelmente em decorrência da maior concentração do elemento neste substrato (Figura 15).

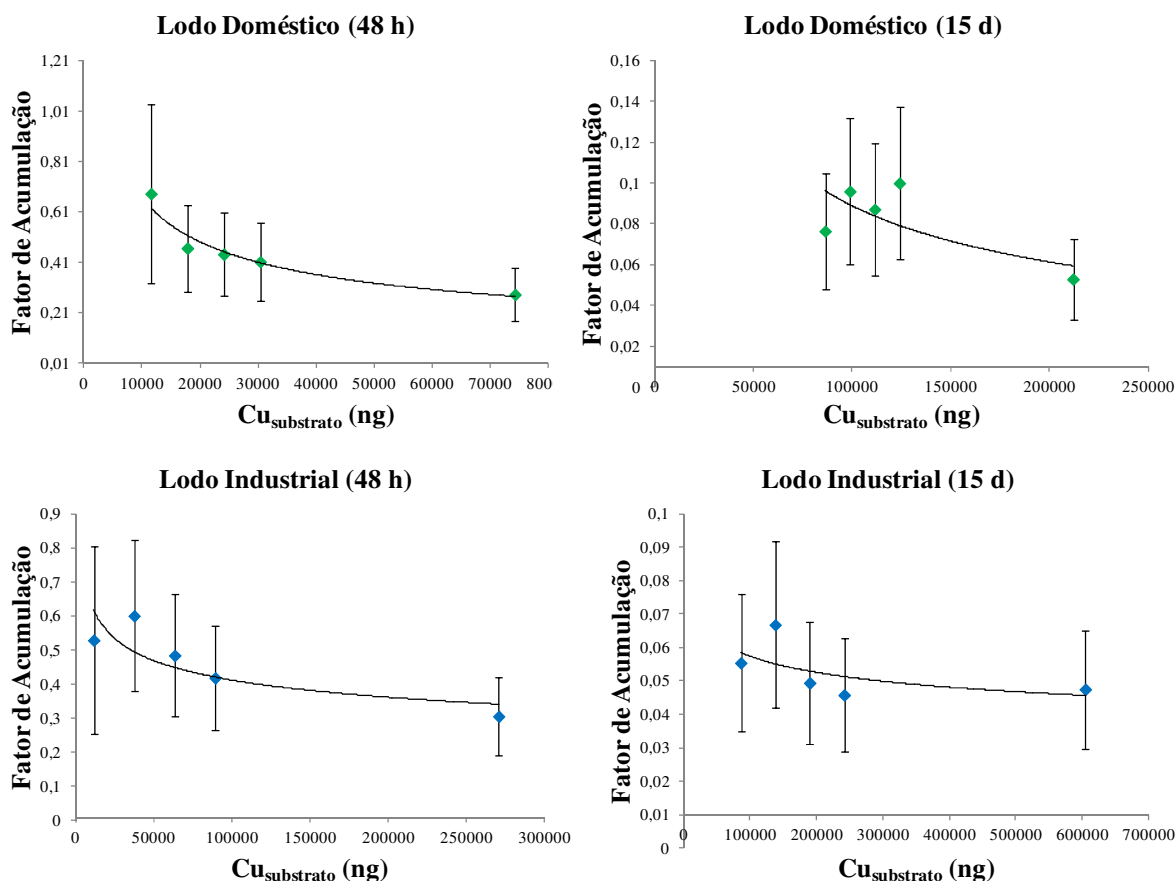
Figura 15 - Comparação entre as concentrações de cobre quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.



Fonte: O autor.

A Figura 16 mostra a relação entre a quantidade de cobre presente no meio aquoso e o fator de acumulação estimado para os lodos doméstico e industrial após a exposição aguda e crônica. Como ocorreu para os demais elementos químicos, houve uma resposta ajustada para a acumulação do cobre nos caramujos. Foi possível realizar a correlação com os dados de genotoxicidade obtidos por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo. Dessa forma, as concentrações de cobre determinadas nos moluscos expostos aos lodos, principalmente ao lodo de esgoto industrial, podem ter induzido ou contribuído para que ocorresse aumento na produção de espécies reativas do oxigênio, resultando em estresse oxidativo nos hemócitos. Outra relação sugerida é que os resultados da bioacumulação e genotoxicidade remetem a uma possível interação direta do cobre com a estrutura do ácido desoxirribonucleico.

Figura 16 - Relação entre a quantidade de cobre no lodo doméstico e industrial e seu respectivo fator de acumulação.



Fonte: O autor.

Estudos feitos com o intuito de quantificar a bioacumulação de cobre em tecidos de moluscos da espécie *Mytilus galloprovincialis* mostraram que o cobre apresenta biodisponibilidade para os animais. Tendo sido observado uma taxa crescente no acúmulo de cobre nos tecidos após exposições agudas, enquanto, para exposição com períodos de até 15 dias, foi demonstrado que os animais apresentaram uma taxa elevada de eliminação do metal (GOMES et al., 2011). No entanto, experimentos realizados com molusco de água doce *Potamopyrgus antipodarum* demonstraram que ocorreu uma bioacumulação significativa de cobre presente em sedimentos quando comparado com os caramujos do grupo controle (RAMSKV et al., 2015).

A fim de avaliar os efeitos prejudiciais induzidos pela exposição a baixas concentrações de cobre em mexilhões da espécie *Mytilus coruscus*, foram realizados estudos com o objetivo de analisar, *in vivo*, as respostas antioxidantes, genotoxicidade e danos diretos

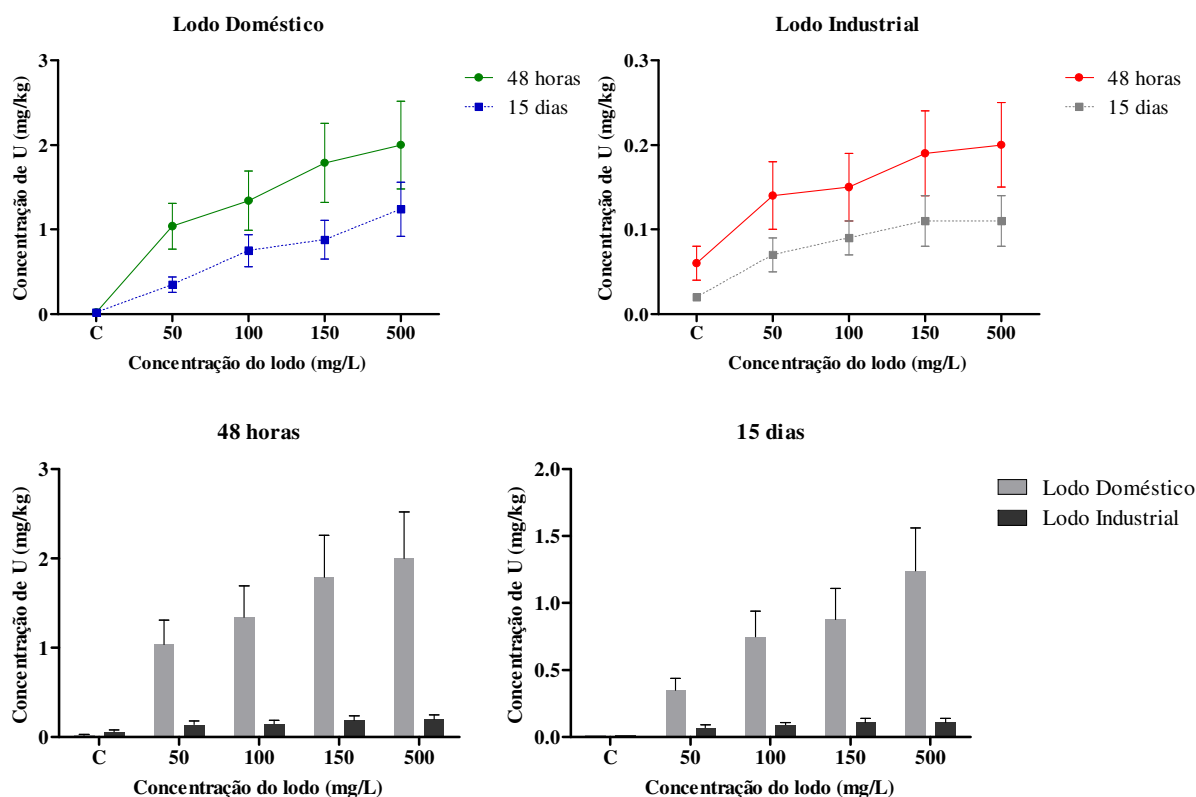
a estrutura do DNA. Os resultados revelaram que ocorreu uma elevação significativa na atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, bem como um aumento na concentração de malonaldeído em hemócitos de *M. coruscus*, indicando a presença de estresse oxidativo. A exposição ao cobre induziu danos genotóxicos na molécula do DNA dependentes da concentração e tempo de exposição. Os mecanismos de danos ao DNA podem estar relacionados a produção de radicais livres resultantes de modificações na concentração de oxigênio dissolvido no meio. Assim, os radicais podem interagir diretamente com biomoléculas, como o DNA, ou podem atuar de forma indiretamente através de moléculas sinalizadoras capazes de mediar danos ao núcleo da célula (XU et al., 2018).

Gomes et al. (2013), em um estudo para avaliar a exposição do molusco *Mytilus galloprovincialis* a nanopartículas de cobre, verificaram que o metal induziu danos ao DNA das células hemocitárias. Os mecanismos de ação podem ser mediados pelos efeitos decorrentes do estresse oxidativo. Segundo Al-Subiai et al. (2011), a genotoxicidade do cobre para os hemócitos pode estar correlacionada com seu envolvimento na formação de espécies reativas do oxigênio e danos oxidativos subsequentes, contribuindo principalmente para formação de rupturas nas cadeias do DNA e oxidação das bases nitrogenadas.

4.1.6 Urânio (U)

Na Figura 17, podem ser observados os resultados das concentrações do elemento químico urânio para os lodos doméstico e industrial nos intervalos de 48 horas e 15 dias. Logo abaixo, representados pelos gráficos de coluna, os resultados das exposições aos lodos foram correlacionados para os mesmos períodos de exposições.

Figura 17 - Comparação entre as concentrações de urânio quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas e 15 dias aos lodos de esgoto doméstico e industrial.

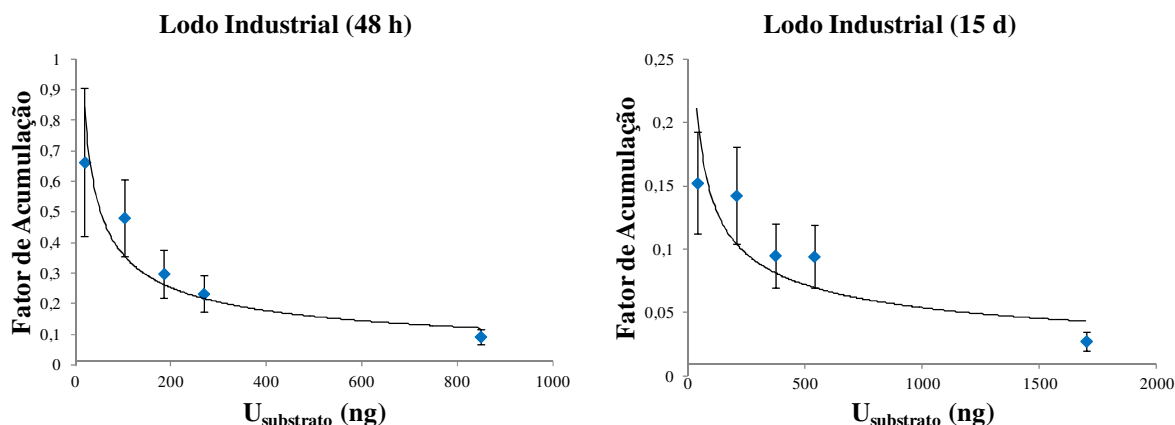


Fonte: O autor.

A acumulação do urânio nos tecidos apresentou um aumento linear diretamente relacionado com o aumento da concentração dos lodos presentes no meio a que os caramujos foram submetidos, porém não significativos para três das concentrações testadas a 95% de confiança. Pode ser observado ainda, que quando é feita uma comparação dos lodos entre si, relacionando os mesmos intervalos de exposição, pode ser demonstrado que tanto no período de 48 horas quanto no intervalo de 15 dias, o lodo de esgoto doméstico apresentou uma maior concentração de urânio presente nos tecidos do *B. glabrata*.

Na Figura 18 foram representados os gráficos contendo os pontos referentes a relação entre a quantidade de urânio e o fator de acumulação estimado apenas para o lodo industrial ao término das exposições por 48 horas e 15 dias. A inexistência dos gráficos apresentando os dados relativos à exposição ao lodo doméstico se deve a ausência das especificações referente a concentração do elemento urânio no certificado de análise do lodo.

Figura 18 - Relação entre a quantidade de urânio no lodo de esgoto industrial e seu respectivo fator de acumulação.



Fonte: O autor.

Apesar da maior acumulação nas exposições de 48 horas (Figura 18), é provável que o urânio não tenha exercido grande influência sobre os danos genotóxicos observados nas células hemocitárias do *B. glabrata*, sendo sugerido que em concentrações mais elevadas este elemento químico pode interferir no crescimento e na capacidade alimentar por meio de alterações na atividade da bomba de Na^+/K^+ ATPase desencadeadas pelo aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (TAGLIAFERRO et al., 2018). Contudo, nas concentrações de lodo utilizados foi verificado que ocorreu um aumento na bioacumulação de urânio, podendo indicar que os efeitos sobre a bomba de Na^+/K^+ ATPase possivelmente ocorre quando há uma maior quantidade de urânio no meio.

Pesquisas feitas para avaliar a resposta do invertebrado aquático *Calamoceras marsupus* a exposições subletais de cobre e urânio utilizando como parâmetros a sobrevivência, crescimento e eficiência alimentar, além de um conjunto de biomarcadores enzimáticos para estresse oxidativo (glutathione-S-transferase e catalase), respiração (lactato desidrogenase), atividades de acetilcolinesterase e da bomba de Na^+/K^+ . Demonstrou que a sobrevivência, crescimento e eficiência alimentar não foram afetados pelo cobre ou urânio. No entanto, a atividade enzimática da catalase foi exacerbada com o aumento da concentração de cobre. Já, a atividade da Na^+/K^+ ATPase apresentou uma redução com o aumento da concentração de urânio. Dessa maneira, os autores do estudo demonstraram que a atividade das enzimas lactato desidrogenase, glutathione-S-transferase e acetilcolinesterase não foram modificadas. Mas, tanto a catalase quanto a bomba de Na^+/K^+ -ATPase demonstraram serem

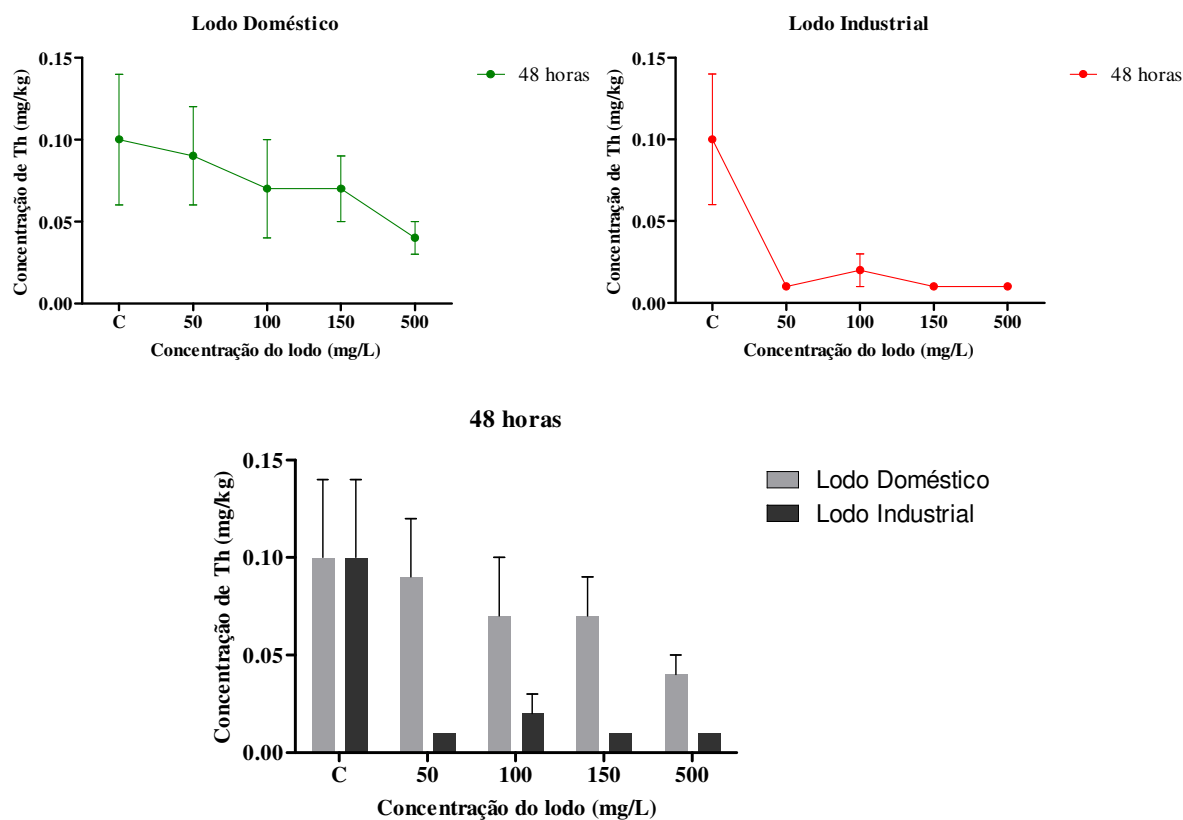
biomarcadores mais sensíveis para avaliar exposições ao cobre e urânio, respectivamente, em baixas concentrações (TAGLIAFERRO et al., 2018).

Gagnaire et al. (2014) trabalhando com peixes de água doce da espécie *Danio rerio* demonstraram que além destes vertebrados bioacumularem o elemento urânio, também foi observado um aumento nos níveis basais das espécies reativas do oxigênio e, conseqüentemente, redução de parâmetros relacionados com o adequado funcionamento do sistema imunológico, prejudicado em decorrência da exposição ao urânio. Estes dados podem estar correlacionados com os resultados observados após os moluscos *B. glabrata* serem expostos aos lodos de esgoto, indicando uma possível relação do urânio com o aumento de radicais livre.

4.1.7 Tório (Th)

As concentrações de tório presentes no corpo dos caramujos foram obtidas apenas para as exposições aos lodos após o intervalo de 48 horas como pode ser verificado na Figura 19. Logo, a comparação entre os lodos foi realizada apenas para os moluscos expostos de forma aguda. Os dados referentes aos testes feitos com os lodos após exposição de 15 dias não foram obtidos devido ao limite de detecção da técnica empregada (0,009 mg/kg).

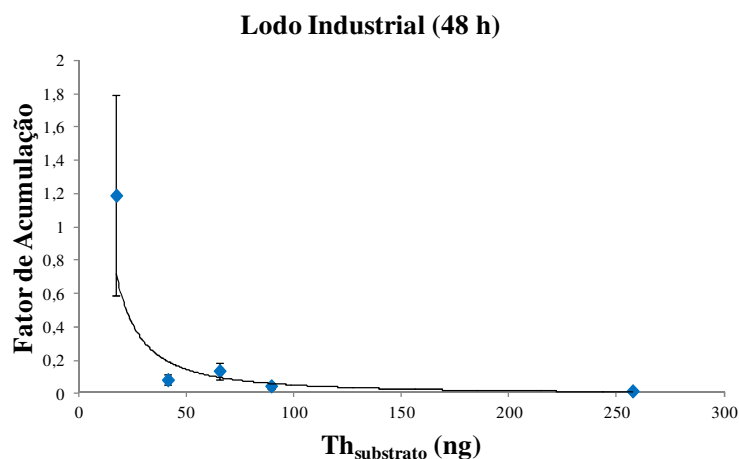
Figura 19 - Comparação entre as concentrações de tório quantificado no corpo dos moluscos expostos por 48 horas aos lodos de esgoto doméstico e industrial.



Fonte: O autor.

Os resultados de tório demonstraram que, para ambos os lodos, após o período de 48 horas, os níveis de tório diminuem de forma inversamente proporcional ao aumento na concentração do elemento químico no meio aquático. Além disso, a análise do gráfico de barras (Figura 19) demonstra nitidamente uma maior concentração de tório presente nos animais expostos ao lodo doméstico.

Figura 20 - Relação entre a quantidade de tório no lodo industrial e seu respectivo fator de acumulação para exposição de 48 horas.



Fonte: O autor.

Semelhante aos gráficos anteriores, a Figura 20 apresenta a relação exponencial para a quantidade de tório contido no substrato industrial aquoso e o fator de acumulação deste elemento químico para o molusco *B. glabrata* após 48 horas de exposição. Sendo verificado que o fator de acumulação do tório também segue uma proporção inversa, com a consequente diminuição da bioacumulação de tório quando estiver presente em elevadas concentrações no meio, entretanto, menos explícita. A ausência dos demais gráficos é justificada pela não obtenção dos dados devido ao limite de detecção da técnica empregada (ICP-MS).

Pauget et al. (2017) analisaram a biodisponibilidade e depuração do tório em moluscos *Cantareus aspersus*, os autores observaram que a ausência do acúmulo de tório nos moluscos pode ser resultado das concentrações relativamente baixas nos solos estudados, combinadas a uma baixa biodisponibilidade desse elemento. Semelhante a matriz estudada, o lodo industrial utilizado neste trabalho apresenta baixa concentração de tório.

De acordo com os dados mencionados anteriormente, ao serem correlacionados com os resultados obtidos neste trabalho, realizado com o *B. glabrata*, é provável que devido as concentrações reduzidas presentes nos lodos doméstico e industrial, o tório possivelmente não tenha influenciado a indução dos danos genotóxicos.

Estudos na Baía de Gdańsk, localizada na Polônia, foram realizados para determinar as concentrações de urânio e tório nos tecidos mole e concha de moluscos das espécies *Mytilus*

edulis, *Cardium glaucum*, *Mya arenaria*, *Macoma baltica*, além de outros invertebrados bentônicos. Os resultados desta investigação mostraram que as concentrações dos elementos químicos em alguns moluscos são específicas da própria espécie. Contudo, para tório foram observadas variações significativas na concentração dependentes do local onde os animais foram coletados. Os autores sugeriram que dentre os fatores analisados, é provável que possa existir algum tipo de relação entre as concentrações de metais analisadas com tamanho e idade dos moluscos (SZEFER; WENNE, 1987).

Kochhann et al. (2009) avaliaram os efeitos da exposição crônica ao tório na bioacumulação, metabolismo e parâmetros oxidativos (níveis de peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes presente nas células branquiais, hepáticas e musculares) em peixes da espécie *Rhamdia quelen*. Foi verificado que o aumento nos níveis de tório na água correspondeu a uma bioacumulação progressiva na concentração do elemento presente nas brânquias e rins. A exposição crônica ao tório acarretou alterações nos parâmetros oxidativos das células branquiais, tendo sido observado uma diminuição nos níveis de glutathione-S-transferase bem como da superóxido dismutase. Além disso, o aumento da peroxidação lipídica nas brânquias expostas ao tório sugere que este tecido sofreu os maiores danos oxidativos. Entretanto, no fígado e músculo, essas alterações ocorreram principalmente quando o tório estava presente em baixas concentrações na água.

4.2 Avaliação da toxicidade em moluscos adultos expostos ao lodo doméstico e industrial

Os resultados da toxicidade do lodo doméstico e industrial pode ser visualizado na Tabela 1. São observados os resultados referentes ao teste de toxicidade realizado com os moluscos expostos ao lodo durante 48 horas (exposição aguda) e 15 dias (exposição crônica). Na Tabela 1, foi demonstrado que, independente da concentração testada, todos os grupos apresentaram um percentual de viabilidade de 100% e inviabilidade de 0% após exposição aos lodos.

Para confirmação dos resultados obtidos, foram analisados os parâmetros: batimentos cardíacos, motilidade no meio aquoso e retração dos moluscos. Todos os caramujos apresentaram os parâmetros normais, após serem meticulosamente analisados. Dessa forma, ao término da análise experimental, não foi possível verificar nenhum dado ou modificação em nível macroscópico nos moluscos expostos. Isto pode ser explicado por se tratar de uma

material de referência, em que a concentração dos elementos químicos dispersos no meio foram inferiores aos encontrados nas estações de tratamento (DIAS et al., 2008), o que permitiu analisar a bioacumulação desses elementos no corpo dos caramujos e os efeitos ao nível celular e genético.

Tabela 1 - Exposição dos moluscos adultos de *B. glabrata* ao lodo de esgoto doméstico e industrial durante o período de 48 horas e 15 dias.

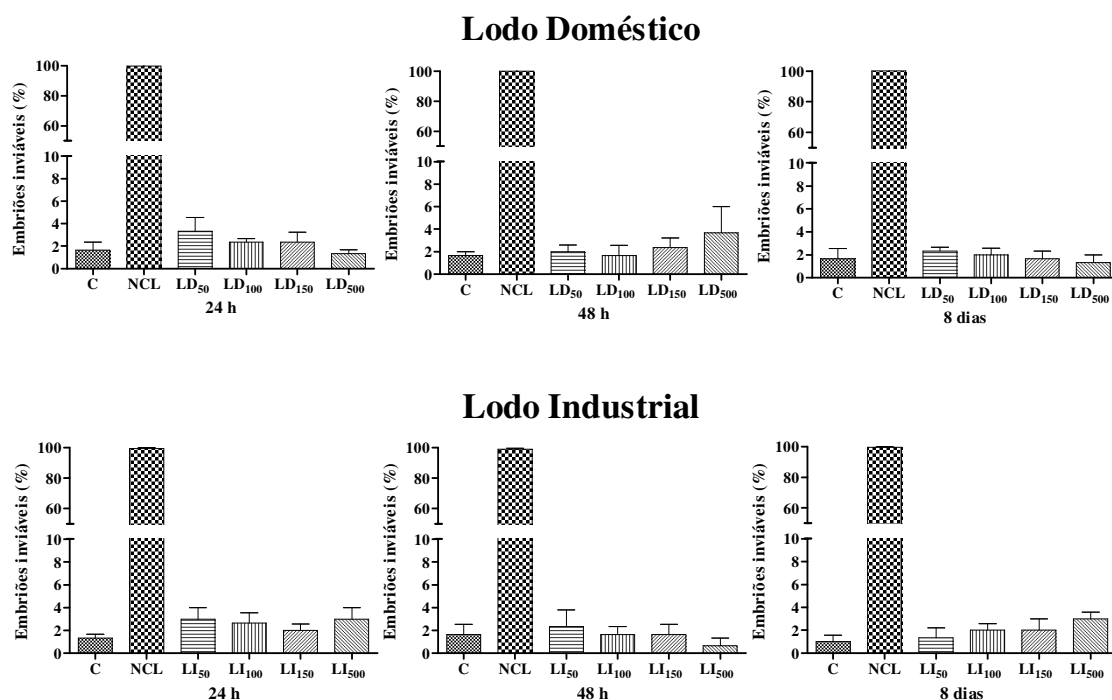
Amostra	Grupos (mg/L)	Total (%)			
		Vivos (48 h)	Mortos (48 h)	Vivos (15 d)	Mortos (15 d)
Lodo doméstico	C	100	0	100	0
	50	100	0	100	0
	100	100	0	100	0
	150	100	0	100	0
	500	100	0	100	0
Lodo industrial	C	100	0	100	0
	50	100	0	100	0
	100	100	0	100	0
	150	100	0	100	0
	500	100	0	100	0

Fonte: O autor.

4.3 Embriotoxicidade do lodo doméstico e industrial

Os resultados do teste de toxicidade para os embriões de *B. glabrata* expostos ao lodo doméstico e industrial podem ser observados na Figura 21. A exposição dos moluscos foi realizada nos períodos de 24, 48 e 192 h (8 dias). É possível verificar que em todos os intervalos avaliados, nenhum dos grupos demonstrou um percentual estatisticamente significativo de embriões inviáveis quando correlacionados aos respectivos grupos controle (C). Assim, independente da concentração e do período de exposição aos lodos, não foi constatado um efeito embriotóxico do composto testado frente aos embriões de *B. glabrata*.

Figura 21 - Embriões de *B. glabrata* expostos ao lodo doméstico e industrial em diferentes períodos (24 h, 48 h e 8 dias). Para análise estatística foi realizado o teste ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações. O resultado foi expresso como média $\pm$ erro padrão da média.



Fonte: O autor.

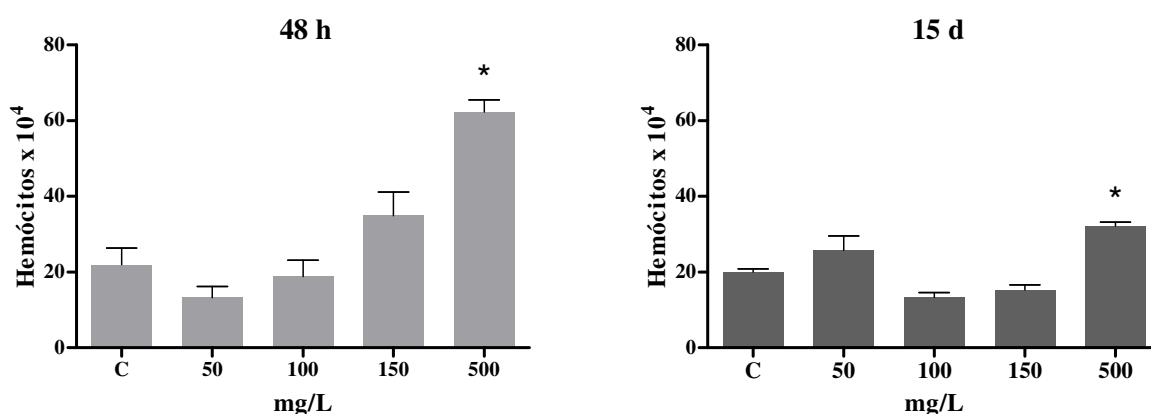
Com base nos resultados, pode-se observar que o efeito nos organismos das concentrações dos elementos químicos dos materiais de referência foi baixo, o que permitiu prosseguir com a análise dos efeitos subletais ao nível citológico e a avaliação da bioacumulação de elementos químicos.

Na literatura consultada, nenhum dado foi encontrado sobre efeitos do lodo industrial e doméstico frente ao molusco *B. glabrata*. No entanto, estudo realizado com outro invertebrado, embriões de ouriço do mar da espécie *Sphaerechinus granularis*, comprova que os efeitos biológicos decorrentes da exposição a sedimentos ricos em elementos químicos estão diretamente relacionados com as concentrações dos elementos nas amostras estudadas (TRIFUOGGI et al., 2019).

4.4 Quantidade de células viáveis após exposição aos lodos de esgoto

Com a utilização da câmara de Neubauer, foi realizada a contagem de células viáveis (Figura 22) após exposição aguda e crônica dos caramujos ao lodo doméstico e, posterior, coleta da hemolinfa. O percentual de hemócitos viáveis foi superior a 99%. A análise das células hemocitárias dos animais expostos por 48 horas ao lodo, o grupo submetido à concentração de 500 mg/L apresentou uma quantidade de hemócitos significativamente maior quando comparado ao grupo controle. Além disso, é possível observar no gráfico da exposição aguda (Figura 22) que houve um aumento linear na quantidade de células de todos os grupos expostos ao lodo. Por outro lado, no experimento realizado após exposição dos caramujos durante 15 dias, também foi possível evidenciar que, após análises dos hemócitos na câmara de Neubauer, as células dos animais expostos a concentração de 500 mg/L apresentaram um número significativamente maior com relação às quantidades de células dos animais pertencentes ao grupo controle. Diferentemente do que foi demonstrado após a exposição aguda, não houve um aumento linear do número de células hemocitárias dos grupos submetidos ao lodo doméstico por 15 dias.

Figura 22 - Número de células observadas após exposição aguda (48 h) e crônica (15 dias) ao lodo de esgoto doméstico. A relação * vs. C indica que ocorreu diferença significativa com grau de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

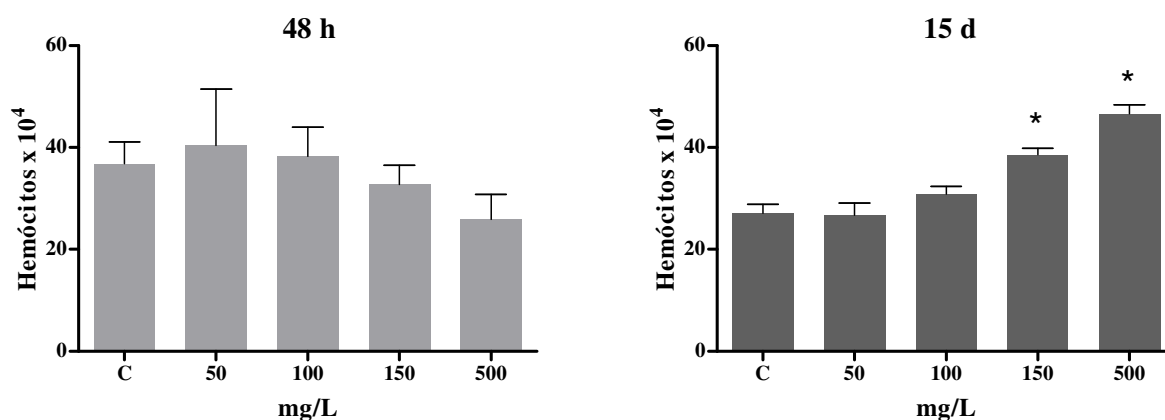


Fonte: O autor.

A quantidade de hemócitos foi determinada após contagem realizada na câmara de Neubauer para os animais expostos ao lodo industrial (Figura 23). Foi observado um

percentual de viabilidade celular superior a 99%. A exposição dos moluscos ao lodo industrial durante os períodos de 48 horas e 15 dias não causou danos aos hemócitos. Além disso, pode ser observado que a quantidade de células viáveis dos animais submetidos ao lodo por 48 horas não apresentou diferenças significativas quando relacionados com o número de hemócitos pertencentes ao grupo controle. Contudo, nas células dos caramujos expostos de forma crônica ao lodo industrial, pode ser verificado que o grupo submetido a concentração de 500 mg/L demonstrou uma maior quantidade de células hemocitárias quando comparado a coluna referente ao total de células do grupo durante a contagem na câmara de Neubauer. A presença de células inviáveis pode estar associada com a quantidade de lodo industrial utilizado por análises, pois independente do grupo testado, a concentração final de elementos químicos tóxicos foi baixa.

Figura 23 - Número de células observadas após exposição aguda (48 h) e crônica (15 dias) ao lodo de esgoto industrial. A relação * vs. C indica que ocorreu diferença significativa com grau de confiança de 95% ($p < 0,05$).



Fonte: O autor.

Como obtido nesse trabalho, a análise da viabilidade celular de hemócitos, provenientes de diversas espécies de moluscos bivalves de água doce, expostos a várias concentrações de metais, *in vitro*, demonstrou, que, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (SAUVÉ et al., 2002). De forma semelhante, Biachi et al. (2014) observaram que moluscos de espécie *Diplodon chilensis*, expostos à água poluída com resíduos de esgoto, não apresentaram diferenças na viabilidade celular após comparação com

hemócitos da mesma espécie de molusco presente em uma região aquática não poluída. Pesquisadores brasileiros demonstraram que os resultados da viabilidade celular, avaliados utilizando o método de coloração com azul de tripano em cultura de células do tecido hepático humano apresentaram viabilidade celular superior a 95% após exposição à água rica em efluentes de esgoto. As amostras de água foram coletadas de rio que corta uma região altamente industrializada e densamente povoada de São Paulo, Brasil (MANZANO et al., 2015). De acordo com os resultados de um estudo realizado com a utilização de hemócitos de *Elliptio complanata*, uma espécie de mexilhão de água doce, expostos a concentrações crescentes de efluentes residuais domésticos, a quantidade de hemócitos viáveis não foi significativamente afetada pela exposição ao efluente municipal. No entanto, o número de total de células presentes na hemolinfa teve um aumento de 250% (FRANÇOIS et al., 2015).

Por outro lado, a exposição direta a soluções de elementos químicos proporcionou resultados diferenciados dos obtidos nesse trabalho. Nas análises da viabilidade celular de glândula digestiva do molusco *Sepia officinalis* expostas aos efeitos dos metais cobre, zinco e prata, apenas o zinco utilizado na concentração de 0,02 μM provocou um aumento significativo na quantidade de células viáveis. Contudo, os dados obtidos após exposição ao cobre, prata e zinco (0,02 mM) não demonstraram uma elevação significativa no número de células viáveis. De acordo com os pesquisadores, esse resultado pode parecer controverso, pois os metais são conhecidos por induzirem efeitos nocivos nos organismos vivos. No entanto, zinco, em baixas concentrações, é um elemento químico fundamental para a manutenção da vida, pois é um composto essencial presente em numerosas moléculas. Sendo um constituinte de mais de 200 metalo-enzimas e outros compostos metabólicos, zinco assegura a estabilidade de moléculas biológicas, como o DNA e de estruturas biológicas, como as membranas celulares. Em contrapartida, níveis elevados de zinco acarretam um funcionamento inadequado do sistema enzimático intracelular (LE BIHAN et al., 2004).

Mesmo assim, avaliações realizadas por Sauvé et al. (2002) com o intuito de verificar os efeitos da exposição, *in vitro*, aos metais Ag, Cd, Hg e Zn em hemócitos de moluscos marinhos e de água doce, não indicaram diferenças significativas em nível de 95% de confiança na viabilidade de hemócitos em células cultivadas na presença de quaisquer metais em baixas concentrações (10^{-9} a 10^{-5} M). Por outro lado, estudos realizados por Revel et al. (2018) demonstraram que hemócitos do molusco de água doce *Elliptio complanata* apresentaram uma diminuição na viabilidade celular após 3 e 8 dias de exposição ao cádmio.

Ainda, segundo os autores, a redução do número de hemócitos viáveis estaria relacionada aos danos provocados ao DNA, devido ao aumento do estresse oxidativo ou pela interferência do cádmio nos mecanismos de reparo do material genético. Katsumiti et al. (2018), após analisarem hemócitos de mexilhões expostos a concentrações crescentes de cobre (0,5, 1, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/L), constataram uma diminuição significativa na quantidade de células viáveis, tendo sido sugerido que este efeito provavelmente está correlacionado com o aumento da produção de espécies reativas do oxigênio intracelular e peroxidação lipídica.

De certo modo, o fato dos metais estarem inseridos numa matriz geológica como é o caso dos lodos utilizados nesse trabalho, sua disponibilidade pode ser alterada, proporcionando resultados diferenciados, mesmo que elementos químicos como cádmio ($11,20 \times 10^5 \mu\text{g/mL}$), cobre ($12,72 \times 10^5 \mu\text{g/mL}$) e zinco possam induzir a redução da viabilidade celular nas espécies analisadas (LADHAR-CHAABOUNI; HAMZA-CHAFFAI, 2015).

4.5 Ensaio do micronúcleo

Na Figura 24 podem ser observadas a morfologia e alterações celulares quantificadas nos hemócitos de *B. glabrata* após exposição aos lodos de esgoto doméstico e industrial na concentração de 500 mg/L. As alterações morfológicas analisadas foram micronúcleos, células binucleadas e apoptoses. Estes danos celulares podem estar correlacionados com os efeitos tóxicos oriundos da concentração dos elementos químicos presentes nos lodos de esgotos.

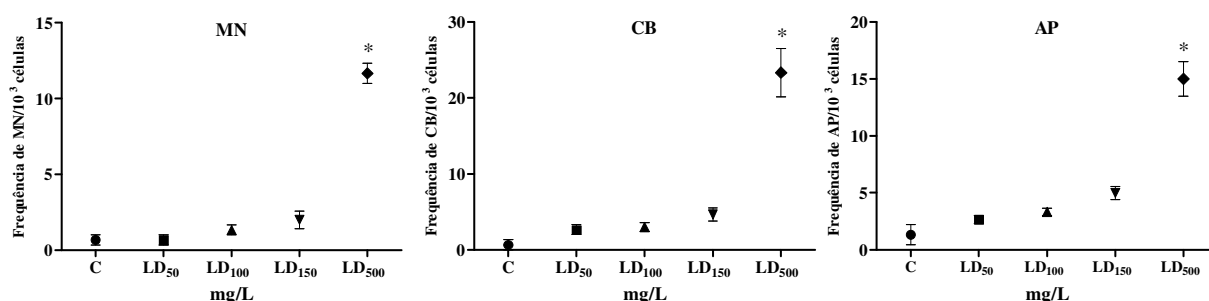
Figura 24 - Exemplos de diferentes morfologias celulares após exposição ao lodo de esgoto doméstico e industrial. A) Micronúcleo; B) Célula binucleada; C) Apoptose.



Fonte: O autor.

Ao término da exposição dos moluscos ao lodo doméstico por 48 horas, os hemócitos foram analisados quanto a frequência de alterações celulares (Figura 24) caracterizadas como micronúcleo (MN), células binucleadas (CB) e apoptoses (AP). Na Figura 25 é possível observar que a frequência de MN presentes no grupo LD₅₀₀ foi significativamente maior quando comparado com o grupo C. De forma semelhante, o número de hemócitos com presença de binucleações foi elevado no grupo dos animais expostos ao lodo na concentração de 500 mg/L, tendo sido demonstrado uma diferença significativa em relação ao grupo controle. Além destas alterações nucleares, também foram analisados e quantificados o número de hemócitos em apoptose. De acordo com os resultados, é possível observar que as células do grupo exposto a maior concentração (500 mg/L) do lodo doméstico apresentaram uma quantidade de AP significativamente maior quando correlacionado com o número de alterações presentes no grupo controle.

Figura 25 - Percentuais de alterações celulares em hemócitos de *B. glabrata* após exposição ao lodo doméstico durante 48 horas. C = Controle, LD = Lodo Doméstico, MN = Micronúcleos, CB = Células Binucleadas e AP = Apoptose.



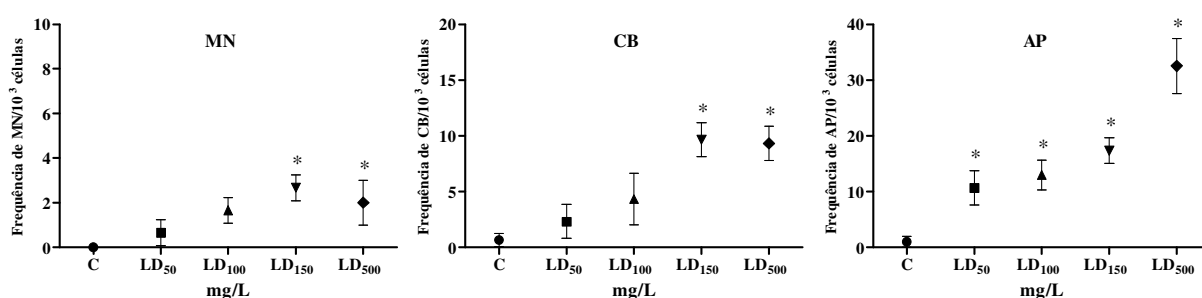
Fonte: O autor.

Em todos os gráficos da Figura 25, os grupos submetidos ao lodo nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/L apresentaram um discreto aumento linear na quantidade de alterações, contudo, não foram significativos em nível de 95% de confiança quando comparados com os respectivos grupos C.

Após exposição crônica ao lodo doméstico, os hemócitos de *Biomphalaria glabrata* foram quantificados e analisados quanto a presença de MN, CB e AP (Figura 26). Ao término

da leitura das lâminas, o número de hemócitos com a presença de micronúcleos foi significativamente maior nos grupos expostos ao lodo nas concentrações de 150 e 500 mg/L com relação ao grupo controle. A quantidade de células binucleadas também se mostrou significativamente mais elevada nos grupos LD₁₅₀ e LD₅₀₀ quando correlacionados com a quantidade de CB observadas no grupo C. No entanto, a quantidade de células hemocitárias em apoptose foi estatisticamente elevada em todos os grupos submetidos ao lodo quando comparado com o respectivo grupo controle. Além disso, pode ser observado que o aumento no número de AP ocorreu de forma dose-dependente.

Figura 26 - Percentuais de alterações celulares em hemócitos de *B. glabrata* após exposição ao lodo doméstico durante 15 dias. C = Controle, LD = Lodo Doméstico, MN = Micronúcleos, CB = Células Binucleadas e AP = Apoptose.



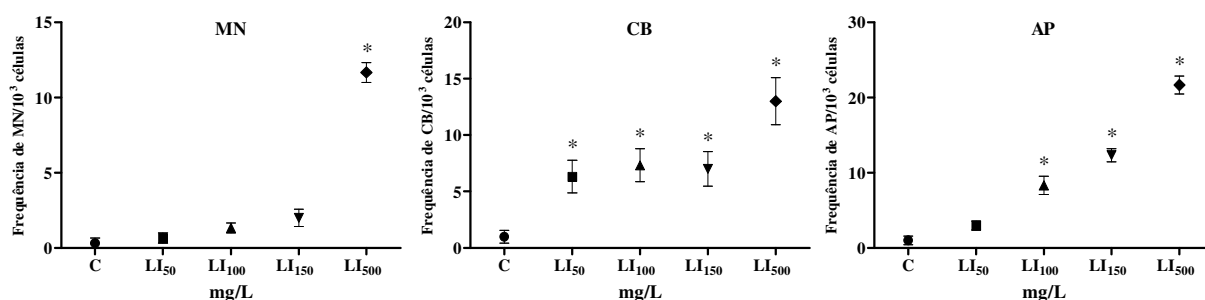
Fonte: O autor.

O lodo de esgoto doméstico foi responsável por danos citotóxicos e genotóxicos para os hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos durante os períodos de 48 horas e 15 dias. Desta forma, com base nos dados obtidos neste trabalho e de acordo com a literatura científica, os efeitos deletérios observados nas células hemocitárias podem estar relacionados com mutações pontuais e a indução de efeitos aneugênicos.

Após a análise das células expostas ao lodo industrial de forma aguda (Figura 27), é possível observar que o número de hemócitos com a presença de micronúcleo no grupo submetido a concentração de 500 mg/L foi significativamente maior quando correlacionado com o grupo C. Porém, após análises do quantitativo de hemócitos foi possível demonstrar que todos os grupos expostos ao lodo apresentaram diferenças significativas no número de

células binucleadas quando comparados com o grupo C. Além disso, a presença de apoptoses foi significativamente maior nas concentrações de 100, 150 e 500 mg/L quando relacionadas ao grupo controle. É possível observar ainda que o número de apoptoses aumentou.

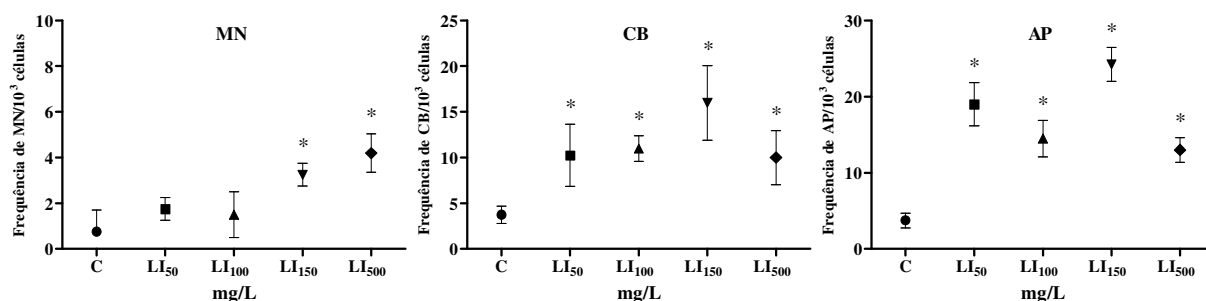
Figura 27 - Percentuais de alterações celulares em hemócitos de *B. glabrata* após exposição ao lodo industrial durante 48 horas. C = Controle, LI = Lodo Industrial, MN = Micronúcleos, CB = Células Binucleadas e AP = Apoptose.



Fonte: O autor.

Ao final da exposição crônica (Figura 28), o número de micronúcleos dos grupos submetidos ao lodo nas concentrações de 150 e 500 mg/L apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo C. Após 15 dias de exposição, foi verificada uma quantidade de células binucleadas significativamente maior em todos os grupos expostos ao lodo industrial quando correlacionados com grupo C. Com relação a quantidade de apoptoses, foi demonstrado que todos os grupos submetidos ao lodo apresentaram uma elevada quantidade de micronúcleos que diferiu de forma significativa em nível de 95% de confiança do número de MN observados no grupo C.

Figura 28 - Percentuais de alterações celulares em hemócitos de *B. glabrata* após serem submetidos ao lodo industrial durante 15 dias. C = Controle, LI = Lodo Industrial, MN = Micronúcleos, CB = Células Binucleadas e AP = Apoptose.



Fonte: O autor.

Tanto na exposição aguda quanto na crônica, as alterações celulares (micronúcleo, binucleação e apoptose) foram observadas em todas situações testadas. Assim, possivelmente os efeitos deletérios provocados no material genético dos hemócitos podem estar correlacionados com a presença de elementos químicos tóxicos. Esses elementos químicos podem modificar a funcionalidade de organelas celulares e componentes, como DNA nuclear e mitocondrial, bem como inibir determinadas enzimas envolvidas no processo de reparo do material genético, ocasionando danos ao DNA e alterações conformacionais que podem levar a modulação do ciclo celular e, consequentemente, apoptose (WANG; SHI, 2001). Além disso, o estímulo para iniciar a apoptose vai depender da dose e do tempo de exposição. Logo, esses elementos químicos tóxicos podem levar ao aumento do estresse celular, consequentemente, este estresse elevado pode ser capaz de exacerbar outros efeitos deletérios, como o dano a estrutura do DNA (SCANU et al., 2015). Nossos resultados foram semelhantes aos achados de Rebok et al. (2107), onde todos os tipos de anormalidades nucleares examinadas estavam presentes nos grupos testados, mesmo nos indivíduos pertencentes ao grupo controle, embora com baixa frequência.

As alterações obtidas nesse trabalho com relação à apoptose de células estão de acordo com os dados verificados por Mohamed et al. (2016), após a análise do DNA nuclear de células hepáticas de peixes da espécie *Variola louti*, presentes em áreas poluídas, em que os pesquisadores demonstraram um aumento significativo no número de células apoptóticas, sugerindo que este evento celular possivelmente esteja associado ao acúmulo de elementos

químicos tóxicos presente no ambiente aquático. Assim, como os hemócitos de *B. glabrata* também apresentaram um aumento significativo de células apoptóticas após exposição ao lodo. Estes dados reforçam os resultados obtidos neste trabalho, pois a indução de células binucleadas e micronúcleo é um indicativo dos danos ocasionados ao DNA nuclear, possivelmente em decorrência da exposição ao lodo de esgoto industrial.

Olvera-Néstor et al. (2016) demonstraram que biomarcadores como Caspase-3, micronúcleos e células apoptóticas aumentaram quando peixes da espécie *Cyprinus carpio* foram expostos a amostras de águas residuais com a presença de baixas concentrações de elementos químicos tóxicos, na região de Toluca, México, evidenciando, assim, um aumento significativo na atividade citotóxica, genotóxica e apoptótica das células expostas, além de demonstrarem uma correlação positiva entre o aumento da atividade da caspase-3 e o dano genotóxico. Estes achados foram condizentes com os resultados obtidos após a realização do ensaio do micronúcleo com hemócitos de *B. glabrata* expostos a lodo de esgoto. Foi demonstrado um aumento da quantidade de células hemocitárias apresentando micronúcleos e em estado de apoptose.

Análises da genotoxicidade em diferentes locais do córrego Mumbuca e do rio Perdizes, ambos localizados no estado de Minas Gerais, Brasil demonstraram por meio do teste de micronúcleo em amostras coletadas de *Tradescantia pallida*, que várias células da espécie utilizada como modelo experimental apresentou uma alta frequência de micronúcleos com potencial genotóxico e mutagênico. A redução da qualidade da água nestes locais provavelmente está fortemente correlacionada com o despejo de efluentes oriundos de esgoto industrial. Ademais, efluentes de origem industrial, doméstica, agrícola e pluvial podem se misturar, originando aglomerados de substâncias complexas que atuam como potencializadores dos efeitos genotóxicos da água presentes nas amostras coletadas (CAMPOS et al., 2015). Em um estudo realizado no rio Bregalnica na Macedônia também foi observado um aumento na frequência de micronúcleos de peixes da espécie *Barbus peloponnesius*. Esta maior quantidade de micronúcleos pode estar correlacionada a uma elevação nos níveis de elementos químicos tóxicos como os metais pesados, principalmente, nos pontos onde existe uma elevada presença de efluentes de esgoto industrial, doméstico e escoamento agrícola. Ainda, segundo os autores, as análises sugerem que o aumento da concentração de metais pesados bem como de contaminantes orgânicos nos sedimentos, provavelmente, foi um dos principais fatores para o aumento no número de micronúcleos (REBOK et al., 2017).

Células das brânquias de mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* quando expostos a água do Golfo de Patras na Grécia apresentaram, assim como obtido nos ensaios desse trabalho, aumento na frequência de micronúcleos (KALPAXIS et al., 2004). Além disso, glândulas digestivas dos mesmos espécimes demonstraram reduzida estabilidade da membrana lisossomal. Ambas as alterações foram significantes, implicando um acúmulo excessivo de poluentes orgânicos e inorgânicos nessa região, com atividade clastogênica e mutagênica. Ademais, os autores realizaram análises do teor de metalotioneína nas células glandulares digestivas, onde foi possível evidenciar que o Golfo de Patras apresenta elevadas concentrações de metais pesados, estando estes, juntamente com os compostos orgânicos, possivelmente correlacionados com os efeitos genotóxicos pela indução de micronúcleos e por alterar a permeabilidade da membrana lisossomal. Do mesmo modo, Yazici e Sişman (2014) observaram um aumento na frequência de micronúcleos em células branquiais, hepatócitos e eritrócitos das espécies de peixes *Leuciscus cephalus* e *Capoeta capoetade* encontrados no rio Karasu, localizado na Turquia. Os autores associaram a maior quantidade de micronúcleos as elevadas concentrações de metais presente no meio, assim como, estas alterações nucleares também podem estar correlacionadas a presença de produtos químicos genotóxicos.

Como a presença de células binucleadas pode ser observada como consequência da inibição do processo de formação de placas celulares durante o processo de divisão celular, que possivelmente é influenciado pela supressão da síntese do fragmento no período inicial da telófase (NJOKU et al., 2015), os resultados obtidos neste trabalho foram contundentes, com altas frequências desse tipo de alteração em todos as concentrações dos lodos estudados. Em *Allium cepa* e peixes da água do rio Corrente, localizado no estado do Piauí no Brasil, foi demonstrada uma elevada quantidade de células binucleadas, decorrentes de uma mistura complexa de compostos químicos clastogênicos e aneugênicos, ricos em elementos químicos tóxicos, originários da indústria automotiva, resíduos urbanos e da agricultura familiar. Essas substâncias foram responsáveis por ocasionar citotoxicidade e falha na citocinese. Estes resultados podem ser correlacionados aos observados neste trabalho, pois a citotoxicidade foi evidenciada pelo aumento na presença de apoptose celular, assim como, a falha na citocinese pode ser um dos processos relacionado com a indução de danos genotóxicos (BATISTA et al., 2016).

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho podem ser verificados em um estudo realizado com cultura de células hepáticas humanas. Após serem expostas ao extrato

aquoso de lodo doméstico, às células apresentaram uma maior quantidade de micronúcleos, em que a indução dessas mutações esteve diretamente ligada a uma possível ação aneugênica do lodo (SOMMAGGIO et al., 2018). Segundo os autores do estudo, não foi possível confirmar que os danos celulares observados estejam relacionados exclusivamente à presença de metais em níveis tóxicos, pois o lodo doméstico utilizado é uma mistura complexa composta por diversas substâncias sendo difícil atribuir os efeitos toxicológicos verificados a um composto ou substância específica, uma vez que, inúmeras reações químicas podem ocorrer entre as substâncias presentes no material testado (SOMMAGGIO et al., 2018).

Outros estudos demonstraram a presença de alterações nucleares, tais como micronúcleos e células binucleadas em eritrócitos de peixes oriundos do Rio Bregalnica, localizado na Macedônia, um rio é conhecido por receber um grande volume de efluentes de esgoto domésticos. Os pesquisadores descartaram a influência da estação e do sexo dos peixes na frequência dos eritrócitos contendo micronúcleos e binucleação. No entanto, as avaliações mostraram que os resultados mais significativos com relação à presença de alterações nucleares parecem estar fortemente relacionados com os pontos de coleta de água examinados, devido a uma maior concentração de poluentes nestes locais, tais como os metais manganês, cádmio e ferro (REBOK et al., 2017). Nestes pontos, substâncias genotóxicas tendem a ficarem adsorvidas no material particulado, e assim, o compartimento sedimentar é o receptor intermediário ou final de poluentes insolúveis ou ligeiramente solúveis. Em adição, o aumento incidental de contaminantes orgânicos e inorgânicos, além da poluição por elevadas concentrações de metais, poderia contribuir para o aumento do número de micronúcleos e células binucleadas. Portanto, os resultados obtidos após a realização do ensaio do micronúcleo reforçam a hipótese de que a frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares podem ser utilizadas como biomarcadores sensíveis e adequados para avaliação de poluentes genotóxicos quando utilizados em estudos de monitoração (ROCHA et al. 2009; BOETTCHER et al., 2010; OSSANA; SALIBIÁN, 2013).

A avaliação da toxicidade de efluentes de esgoto lixiviado demonstrou um aumento significativo na frequência de micronúcleos em testes feitos *in vitro* com a utilização de linfócitos humanos, as amostras testadas apresentaram um potencial genotóxico para os linfócitos, sendo capaz de induzir efeitos adversos em uma população humana. Também foi demonstrado que eritrócitos policromáticos de ratos após 15 dias de exposição a baixas concentrações de efluentes domésticos apresentaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos. Assim, esses efeitos possivelmente estavam correlacionados com a ação

combinada de contaminantes presentes nas amostras do lodo de esgoto lixiviado (TEWARI et al., 2005; GAJSKI et al., 2011)

Segundo Yazıcı e Şişman (2014), após um estudo realizado em peixes das espécies *Leuciscus cephalus* e *Capoeta capoeta* para avaliar os efeitos genotóxicos da água do rio Karasu, localizado na Turquia, os pesquisadores demonstraram que estas espécies apresentaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos e células binucleadas. Além disso, foi observado que o esse ecossistema aquático apresentou altas concentrações dos elementos químicos cádmio, alumínio, arsênio, chumbo, cromo, manganês, cobre, ferro, níquel, zinco, todos eles oriundos do despejo de efluentes de águas residuais, principalmente efluentes de esgoto doméstico. Assim, os autores sugerem que estes poluentes, possivelmente, podem ser os responsáveis pelo aumento dos efeitos genotóxicos ocasionados nos peixes.

Estudos realizado com peixes a fim de determinar o potencial genotóxico do córrego Nilufer que deságua no Mar de Mármara, no noroeste da Turquia, os autores determinaram a frequência de micronúcleos e de células binucleadas presentes nas amostras de sangue de *Oreochromis niloticus* após serem expostas a água do Nilufer. A quantidade de micronúcleos e de células binucleadas foram significativamente elevadas nos peixes submetidos à água de áreas poluídas com esgoto doméstico, industrial e agrícola. Efluentes domésticos podem conter concentrações elevadas de metais e que estes elementos podem induzir a formação de micronúcleos e células binucleadas (SUMMAK et al., 2010).

Salem et al. (2014) avaliaram os danos genotóxicos em peixes *Rutilus rutilus* originados por metais presentes em resíduos domésticos lixiviados. Os autores observaram que ao término do período de exposição ao composto testado, o DNA genômico apresentou trechos com fragmentações internucleossômicas, que provavelmente podem estar relacionadas com a indução dos processos de apoptose e necrose. Além disso, é sugerido que os metais ferro, cobre e zinco possivelmente desempenham um papel regulador na atividade das endonucleases e nos mecanismos relacionados a apoptose. Portanto, é possível que os resultados obtidos após os moluscos de *B. glabrata* serem expostos aos lodos de esgoto, possam estar correlacionado com a indução dos mecanismos de apoptose celular, por meio da interação com os elementos químicos tóxicos presentes nos lodos.

As lesões no DNA em locais específicos do genoma podem induzir alterações na sequência de nucleotídeos por meio dos processos como síntese translesional ou através da

recombinação, provocando mutagênese e respostas celulares que podem levar a apoptose (Spivak et al., 2009). Dessa forma, após a coleta de amostras da água do rio Jialu, localizado no norte da China, um grupo de pesquisadores submeteram uma cultura bacteriana de *Salmonella typhimurium* e peixes da espécie *Danio rerio* para avaliarem os efeitos genotóxicos e citotóxicos, com base nos danos oxidativos ocasionados ao DNA e através da análise e quantificação das células em processo de apoptose, respectivamente. Com base nos resultados obtidos, os autores do estudo sugerem que a influência de águas municipais residuais ricas em chumbo, além de outros contaminantes, podem ser uma das possíveis justificativas para os danos oxidativos provocados no material genético e o aumento na quantidade de células em estado apoptótico (SUN et al., 2017).

Poluentes ambientais com elevado potencial de induzir efeitos tóxicos, como metais, atuam pela ativação da via apoptótica intrínseca. A exemplo do cádmio, que induz a apoptose em células branquiais de *Mytilus edulis* e em hemócitos de ostras através de uma via independente da atividade mitocondrial e enzimática da caspases. Além disso, concentrações abaixo da dose letal de cádmio também ocasionaram uma elevação na quantidade de apoptoses presentes nas células do hepatopâncreas do molusco pulmonado *Helix pomatia*, sugerindo que a apoptose é o principal modo de eliminação de células danificadas do hepatopâncreas desse caracol. A apoptose também foi descrita em hemócitos do gastrópode *Lymnaea stagnalis* em resposta a outros tipos poluentes ambientais, tendo sido demonstrado que os mecanismos de morte celular foram mediados por lectinas e pela produção de espécies reativas do oxigênio (ROMERO et al., 2015).

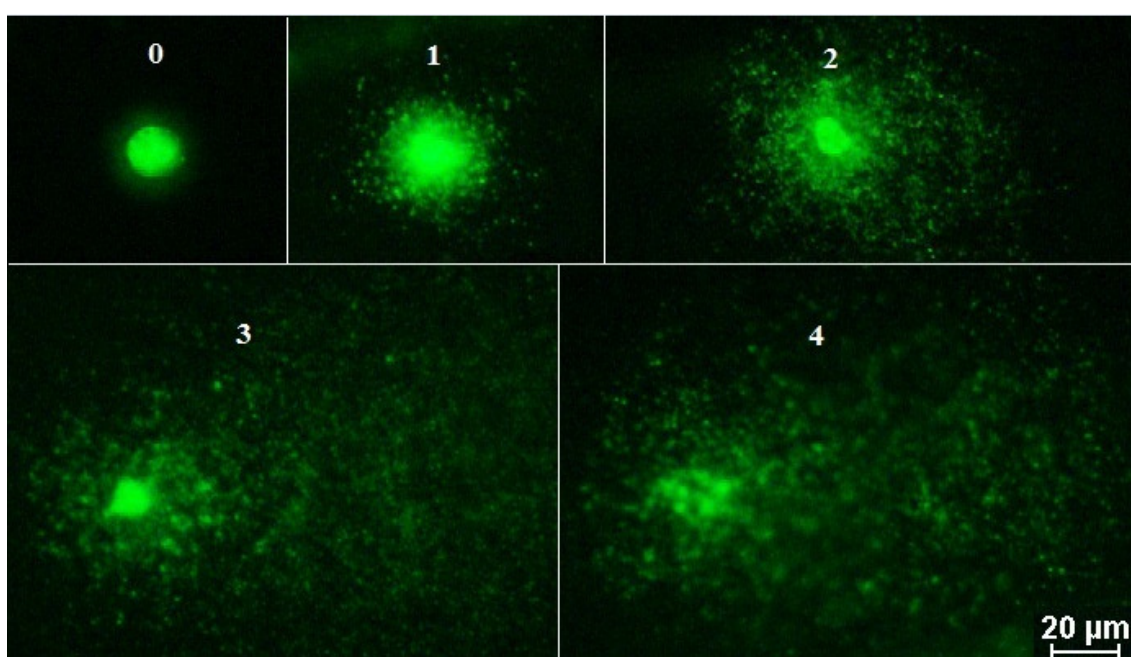
Segundo Panfoli et al. (2000), diferentes tipos de evidências sugerem que a indução de distúrbios celular nos íons Ca^{2+} poderia ter um papel primário na ocorrência de efeitos citotóxicos ocasionados pela exposição aos metais. A maquinaria complexa para a regulação do Ca^{2+} celular pode estar relacionado com a alta sensibilidade dos organismos vivos aos metais. Portanto, este distúrbio na regulação dos íons Ca^{2+} pode ser uma das possíveis explicações para a compreensão dos mecanismos relacionados com o processo de apoptose celular.

Em todos os trabalhos, elementos químicos tóxicos foram diretamente associados à alta frequência MN nas análises citológicas, com potenciais efeitos deletérios envolvidos na instabilidade genética (MORAIS et al., 2018).

4.6 Ensaio cometa

Na Figura 29 pode ser observada a classificação do grau de dano (0 - 4) dos nucleóides analisados após exposição aguda e crônica dos caramujos ao lodo doméstico e posterior realização do ensaio do cometa.

Figura 29 - Imagens de nucleóides de hemócitos de *B. glabrata* expostos ao lodo doméstico, com os variados graus de danos (0 - 4).

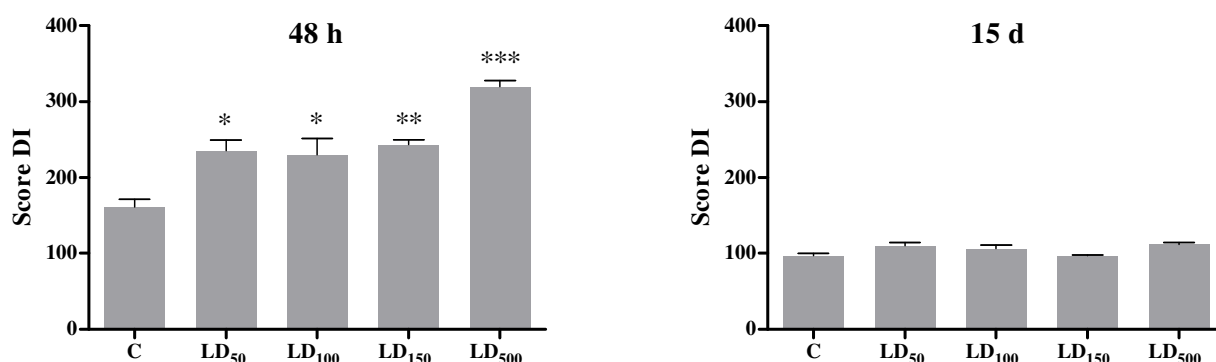


Fonte: O autor.

Na Figura 30, é possível observar o dano genotóxico ocasionado aos nucleóides dos hemócitos de *B. glabrata* expostos durante 48 horas e 15 dias ao lodo de esgoto doméstico. Após a realização do ensaio do cometa e posterior análise das lâminas, foi verificado que todos os grupos expostos ao lodo (LD₅₀, LD₁₀₀, LD₁₅₀ e LD₅₀₀) de forma aguda apresentaram uma quantidade de nucleóides estatisticamente superior quando comparado com o número de nucleóides presentes no grupo C. Entretanto, diferentemente do que foi demonstrado no experimento realizado para avaliar os danos nucleares após exposição aguda ao lodo, os resultados da exposição crônica não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos submetidos ao lodo doméstico quando comparados ao grupo controle.

Com base na análise e quantificação do grau de dano observado nos nucleóides (Figura 30), é possível sugerir que após o intervalo de 48 horas, o elevado número de danos nucleares evidenciado nas células do *B. grabrata* possivelmente está relacionado com a presença de elementos químicos tóxicos na composição do lodo de esgoto. Dentre eles, os metais podem acarretar um elevado estresse oxidativo a estrutura do DNA, prejudicando suas funções ou mesmo induzindo a quebra da estrutural da molécula, consequentemente, ocasionando um efeito genotóxico. Entretanto, após um período crônico de exposição às substâncias presentes no composto, órgãos como o hepatopâncreas podem ter intensificado sua atividade para depurar as substâncias tóxicas as quais os moluscos foram submetidos. Além disso, é sugerido as células possivelmente aumentaram a produção e atividade das enzimas antioxidantes no meio intracelular.

Figura 30 - Dano ao DNA dos hemócitos de *B. glabrata* determinado pelo ensaio do cometa após exposição aguda e crônica ao lodo de esgoto doméstico. C = Controle e LD = Lodo Doméstico.



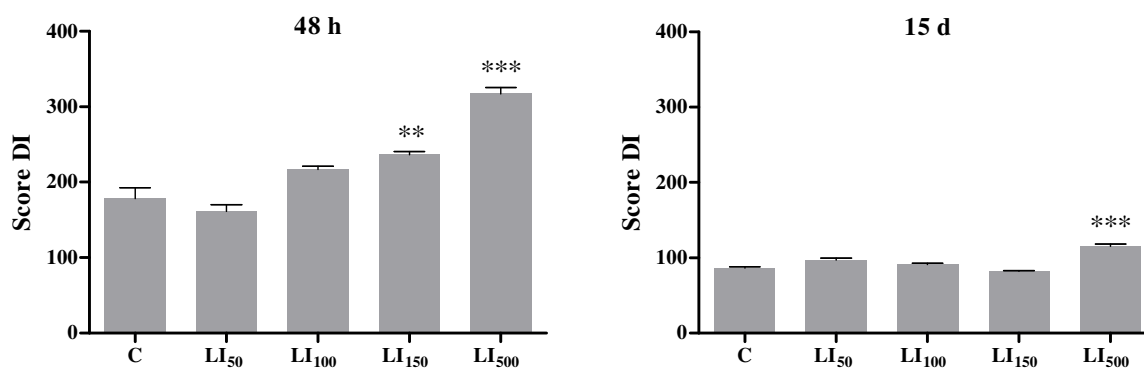
Fonte: O autor.

Para avaliar o grau de dano ocasionado ao DNA das células hemocitárias após exposição dos moluscos ao lodo industrial, o ensaio do cometa foi realizado nos intervalos de 48 horas e 15 dias (Figura 31). Os grupos LI₁₅₀ e LI₅₀₀ apresentaram um quantidade significativamente elevada de nucleóides danificados quando ambos são comparados com o grupo C. No entanto, após análise dos nucleóides (Figura 32) presentes nas células dos animais submetidos ao lodo de forma crônica, apenas o grupo exposto a concentração de

500 mg/L demonstrou diferença estatisticamente significativa em nível de 95% de confiança quando relacionado ao grupo controle.

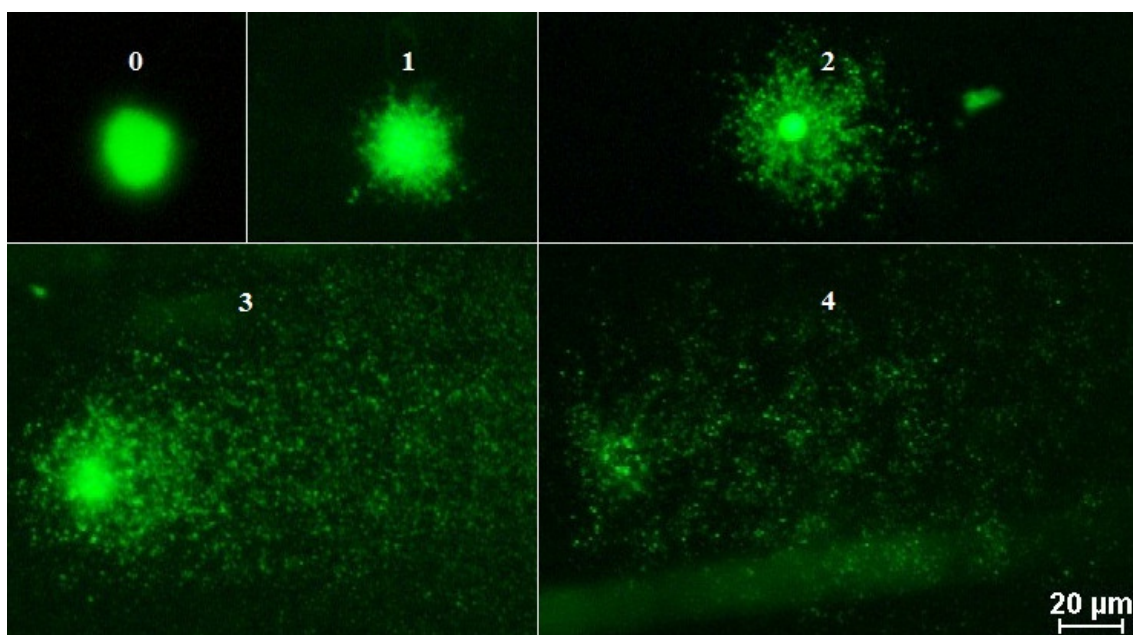
De acordo com os resultados demonstrados na Figura 31, a quantidade de danos produzidos no material genético dos caramujos submetidos a 500 mg/L foi mais elevada com relação aos outros grupos, possivelmente, em decorrência da exposição a maiores níveis de elementos químicos tóxicos. Desse modo, é sugerido que estes elementos podem ter sobrecarregado a glândula hepatopâncreas alterando a atividade das enzimas antioxidantes presentes no molusco, e consequentemente, prejudicando o processo de reparação dos danos ocasionados a estrutura do DNA.

Figura 31 - Dano ao DNA dos hemócitos de *B. glabrata* determinado pelo ensaio do cometa após exposição aguda e crônica ao lodo de esgoto industrial. C = Controle e LI = Lodo Industrial.



Fonte: O autor.

Figura 32 - Imagens de nucleóides de hemócitos de *B. glabrata* expostos ao lodo industrial com diferentes graus de danos (0 - 4).



Fonte: O autor.

Foi observado neste trabalho utilizando o hemócitos de *B. glabrata*, após quantificação dos danos relacionados a exposição ao lodo de esgoto, foi observado que os danos genotóxicos nos grupos submetidos ao lodo de forma crônica foram menores quando comparados com os danos da exposição aguda. Yáñez-Rivera et al. (2018), após análises de caranguejos da espécie *Uca princeps* expostos a água contendo sedimentos poluídos com rejeitos urbanos, observaram que os animais submetidos as amostras durante um período menor apresentaram os índices mais elevados de danos genotóxicos quando relacionados com o grupo dos crustáceos expostos aos mesmos compostos presentes na água. Dessa forma, os autores sugerem que os organismos provavelmente conseguiram diminuir os danos ao DNA ao longo do tempo. Em testes de genotoxicidade realizados com moluscos da espécie *Corbicula fluminea* para monitorar os contaminantes presentes nas águas do córrego Cambé localizado em Londrina, Brasil, foi demonstrado utilizando o ensaio cometa, que a maioria dos locais onde as amostras foram coletadas apresentou uma elevada concentração de poluentes com ação genotóxica. Em todos os locais amostrados com presença de poluentes, as influências antrópicas foram sugeridas como as principais causas da introdução de poluentes no meio ambiente, como os compostos xenobióticos e elementos químicos tóxicos, tais como chumbo e cobre. Logo, o escoamento doméstico representou um grande perigo genotóxico

para o ambiente aquático e a biota presente no meio, onde amostras contaminadas com materiais de origem doméstica foram consideradas muito prejudiciais, produzindo uma elevada quantidade de células com danos no DNA (RIGONATO et al., 2010). Resultados semelhantes foram demonstrados para exposição aguda ao lodo doméstico. Os nucleóides dos hemócitos submetidos ao lodo apresentaram um elevado índice de dano quando correlacionado com o grupo controle.

Efeitos deletérios responsáveis por induzir genotoxicidade também foram comprovados após o estudo da influência de ambientes aquáticos poluídos sobre peixes das espécies *Oreochromis niloticus* e *Mugil cephalus*. Células do fígado e das guelras foram avaliadas por serem originárias de órgãos metabolicamente ativos que acumulam mais metais quando comparados a outros órgãos. O DNA das células analisadas apresentou um alto grau de fragmentação, possivelmente, em decorrência da exposição aos níveis elevados de metais tóxicos. Estes podem ser responsáveis por catalisarem reações que geram espécies reativas do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, ânions superóxido e radicais hidroxila, promovendo o estresse oxidativo celular e danos nas macromoléculas, como DNA. Assim, os autores sugerem que a ação dos radicais livres possa atuar estimulando a atividade de endonucleases responsáveis pela fragmentação do DNA (OMAR et al., 2012).

Como obtido por esse trabalho, Klee et al. (2004) demonstraram, após realizarem testes de genotoxicidade e citotoxicidade, que compostos orgânicos tóxicos presentes no lodo de esgoto industrial, mesmo após passarem por tratamento em biorreatores, também contribuam para promover um aumento do dano no DNA das células. Ghisi et al. (2017), após análise das águas na jusante do Rio Campo, localizado no Estado do Paraná no Brasil, constatou que efluentes de atividades industriais e de estação de tratamento de esgoto podem ser responsáveis pelos altos índices de degenerações observadas em níveis genético e histológico em peixes da espécie *Astyanax paranae*.

Os resultados de exposição aguda ao lodo de esgoto industrial ocasionaram danos genotóxicos. Análises realizadas com peixes encontrados em locais poluídos por resíduos industriais e de descartes de estações de tratamento de esgoto apresentaram maior prevalência de alterações toxicopatológicas e pré-neoplásicas, bem como maior taxa de danos hepáticos em comparação com peixes retirados do local controle (DYK et al. al., 2012). Substâncias encontradas nos efluentes de atividades industriais e da estação de tratamento de esgoto podem ser responsáveis pelo alto índice de danos observados nos níveis genético e histológico

em peixes da jusante (GHISI et al., 2017). Em outro trabalho realizado com peixes, a maior fragmentação do DNA foi observada em *Cirrhinus mrigala*, coletado da área poluída do Rio Chenab, seguido pelo *Labeo rohita* naquela área. *Catla catla* apresentou menor dano ao DNA quando comparado com as outras duas espécies de peixes. Esses resultados concordaram com os achados de Pavlica et al. (2011), cujo ensaio cometa demonstrou que os maiores danos ao DNA foram registrados nos locais mais poluídos.

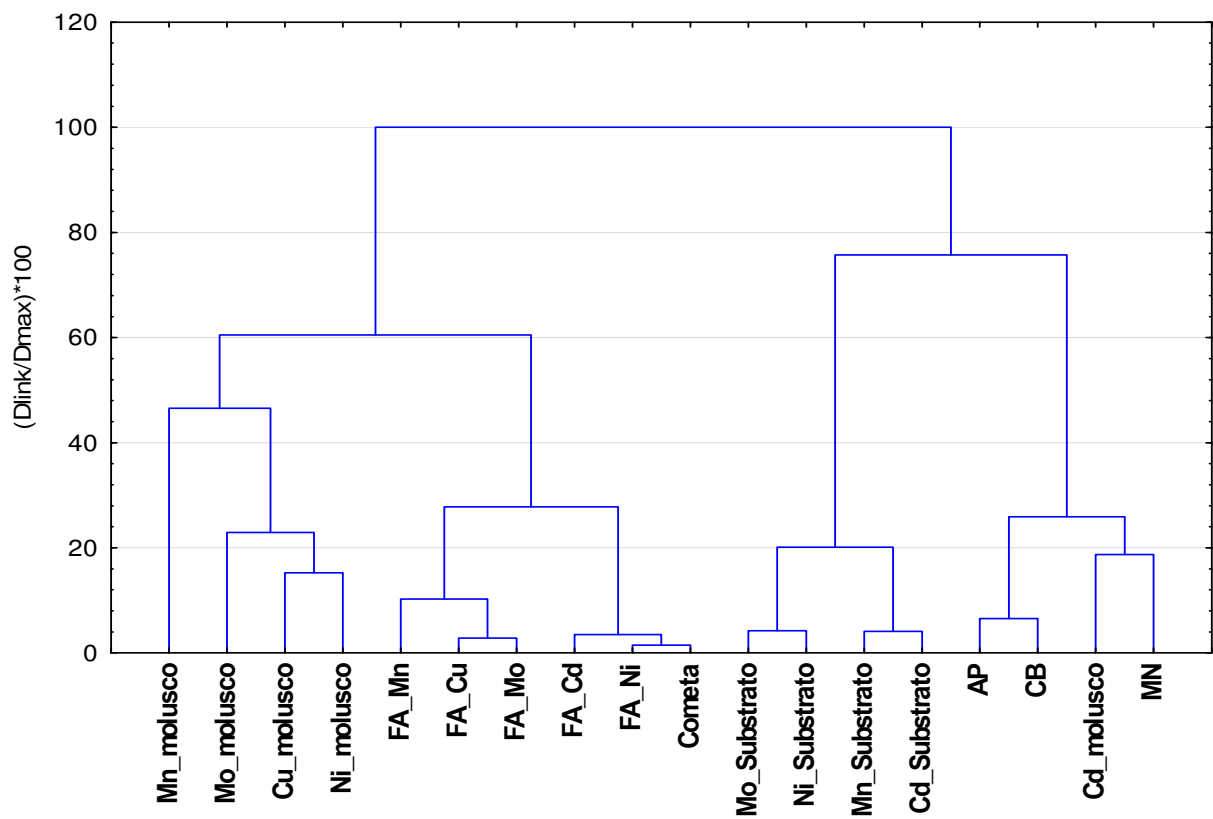
Portanto, a resposta da maioria dos biomarcadores, possivelmente, não está relacionada com um contaminante específico, mas associada à complexa mistura de substâncias presentes no ambiente. Por esse motivo, os biomarcadores devem ser analisados em conjunto (GHISI et al., 2017) e por meio da utilização de diferentes técnicas para aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos.

4.7 Agrupamento dos resultados de bioacumulação e dos ensaios genotóxicos

Foi construído um dendrograma (Figura 33) utilizando o método de ligação de Ward's a fim de agrupar os resultados obtidos no estudo com os lodos de esgoto doméstico e industrial. A análise de agrupamento leva em consideração a semelhança entre os vetores das médias, permitindo diferenciar os resultados obtidos nos testes de bioacumulação e genotoxicidade.

É possível observar na distribuição dos grupos estabelecidos no dendrograma (Figura 33) que os resultados obtidos para o fator de acumulação do cádmio (FA_Cd), fator de acumulação do níquel (FA_Ni) e ensaio cometa (Cometa) estão fortemente agrupados, assim como, os resultados das análises de apoptose (AP), células binucleadas (CB), concentração de cádmio no molusco (Cd_molusco) e micronúcleos (MN).

Figura 33 - Dendrograma sintetizando agrupamento dos resultados da bioacumulação e ensaios genotóxicos de acordo com suas semelhanças.



Fonte: O autor

5 CONCLUSÕES

A partir dos experimentos realizados neste trabalho e por meio dos resultados obtidos, conclui-se:

- Os testes de toxicidade e embriotoxicidade demonstraram que os lodos de esgoto doméstico (SRM 2781) e industrial (SRM 2782) não apresentaram danos visualizados macroscopicamente, como letalidade e malformações;
- A viabilidade celular dos hemócitos apresentou um percentual acima de 95% tanto para o lodo doméstico quanto para o lodo industrial;
- Os danos genotóxicos puderam ser visualizados por meio do teste do micronúcleo, onde foi constatado elevação no número de apoptose celular, binucleação e micronúcleo em todos os grupos expostos aos lodos de esgotos, sendo um bom parâmetro para análise ambiental;
- A análise dos nucleóides pelo ensaio do cometa demonstrou que os lodos doméstico e industrial originaram efeitos genotóxicos para os hemócitos de *B. glabrata*, podendo ser um teste viável para análise ambiental;
- Foi demonstrado que o molusco da espécie *Biomphalaria glabrata* apresentou bioacumulação para os elementos químicos quantificados pelas técnicas espectrométricas empregadas.

REFERÊNCIAS

AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical Chemistry.**, v. 238, p. 1-7, 2018.

AHMAD, W.; NAJEEB, U.; ZIA, M. H. Soil contamination with metals: sources, types and implications. In: HAKEEM, K. R. et al. (Org). **Soil Remediation and Plants**. Academic Press. 2015, p. 37-61.

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.

ALLAH, A. T. A.; WANAS, M. Q. A.; THOMPSON, S. N. Dissolved heavy metals, lead, cadmium and mercury, accumulate in the body of the schistosome vector, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata). **Journal of Molluscan Studies.**, v. 69, n. 1, p. 35-41, 2013.

ANSALDO, M.; NAHABEDIAN, D. E.; DI FONZO, C.; WIDER, E. A. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. **Science of The Total Environment.**, v. 407, n. 6 p. 1923-1928, 2009.

ASHOMORE, M. Air Pollution. In SIMON, L. (Org.). **Encyclopedia of Biodiversity**. Saint Louis: Academic Press. 2013, p. 136-147.

BARAKAT, A. O.; KHAIRY, M. A.; MAHMOUD, M. R. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in sewage sludge from Egypt. **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering.**, v. 52, n. 8, p. 750-756, 2017.

BARNES, R. D.; RUPPERT, E. E. **Zoologia dos invertebrados**. 6ª ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029 p.

BAT, L.; ARIRI, E. Heavy metal levels in fish, mollusks, and crustacea from Turkish seas and potential risk of human health. **Food Quality: Balancing Health and Disease**, p. 159–196, 2018. doi:10.1016/b978-0-12-811442-1.00005-5

BAT, L.; OZTEKIN, H. C. Heavy metals in *Mytilus galloprovincialis*, *Rapana venosa* and *Eriphia verrucosa* from the Black Sea coasts of Turkey as bioindicators of pollution. **Walailak Journal of Science and Technology.**, v. 13, n. 9, p. 715–728, 2016.

BATISTA, N. J.; CAVALCANTE, A. A. C. M., OLIVEIRA, M. G.; MEDEIROS, E. C.; MACHADO, J. L.; EVANGELISTA, S. R.; DIAS, J. F.; SANTOS, C. E.; DUARTE, A.; SILVA, F. R.; SILVA, J. Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. **Chemosphere.**, v. 164, p. 134-141, 2016.

BELLIARDO, C.; GIORGIO, C. D.; CHASPOUL, F.; GALLICE, P.; BERGÉ-LEFRANC, D. Direct DNA interaction and genotoxic impact of three metals: Cadmium, nickel and aluminum. **The Journal of Chemical Thermodynamics.**, v. 125, p. 271-277, 2018.

BERTRAND, L.; ASIS, R.; MONFERRÁN, M. V.; AMÉ, M. V. Bioaccumulation and biochemical response in South American native species exposed to zinc: Boosted regression trees as novel tool for biomarkers selection. **Ecological Indicators**., v. 67, p. 769-778, 2016a.

BERTRAND, L.; MOFERRÁN, M. V.; MOUNEYRAC, C.; BONANSEA, R. I.; ASIS, R.; AMÉ, M. V. Sensitive biomarker responses of the shrimp *Palaemonetes argentinus* exposed to chlorpyrifos at environmental concentrations: Roles of alpha-tocopherol and metallothioneins. **Aquatic Toxicology**., v. 179, p. 72-81, 2016b.

BILLIONNET, C.; SHERRILL, D.; ANNESI-MAESANO, I. Estimating the Health Effects of Exposure to Multi-Pollutant Mixture. **Annals of Epidemiology**., v. 22, n. 2, p. 126-141, 2012.

BLOEM, E.; ALBIHN, A.; ELVING, J.; HERMANN, L.; LEHMANN, L.; SARVI, M.; SCHAAF, T.; SCHINCK, J.; TURTOLA, E.; YLIVAINIO, K. Contamination of organic nutrient sources with potentially toxic elements, antibiotics and pathogen microorganisms in relation to P fertilizer potential and treatment options for the production of sustainable fertilizers: A review. **Science of the Total Environment**., v. 607-608, p. 225-242, 2017.

BOETTCHER, M.; GRUND, S.; KEITER, S.; KOSMEHL, T.; REIFFERSCHIED, G.; SEITZ, N.; ROCHA, P. S.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**., v. 700, n. 1-2, p. 11-17, 2010.

BOLUND, P.; HUNHAMMAR, S. Ecosystem services in urban areas. **Ecological Economics**., v. 29, n. 2, p. 293-301, 1999.

BRACK, W.; AIT-AISSA, S.; BURGESS, R. M.; BUSCH, W.; CREUSOT, N.; PAOLO, C. D.; ESCHER, B. I.; HEWITT, L. M.; HILSCHEROVA, K.; HOLLENDER, J.; HOLLERT, H.; JONKER, W.; KOOL, J.; LAMOREE, M.; MUSCHKET, M.; NEUMANN, S.; ROSTKOSKI, P.; RUTTKIES, C.; SCHOLLEE, J.; SCHYMANSKI, E. L.; SCHULZE, T.; SEILER, T-B.; TINDALL, A. J.; UMBUZEIRO, G. A.; VRANA, B.; KRAUSS, M. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. **Science of The Total Environment**., v. 544, p. 1073-1118, 2016.

BROOK, R. D.; RAJAGOPALAN, S.; POPE, C. A.; BROOK, J. R.; BHATNAGAR, A.; DIEZ-ROUX, A. V.; HOLGUIN, F.; HONG, Y.; LUEPKER, R. V.; MITTLEMAN, M. A.; PETERS, A.; SISCOVICK, D.; SMITH, S. C. Jr.; WHITSEL, L.; KAUFMAN, J. D. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**., v. 121, p. 2331-2378, 2010.

CACHADA, A.; SILVA, E. F.; DUARTE, A. C.; PERREIRA, R. Risk assessment of urban soils contamination: The particular case of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Science of the Total Environment**., v. 551-552, p. 271-284, 2016.

CALLENDER, E. Heavy metals in the environment – historical trends. In: HOLLAND, H.D. e TUREKIAN, K.K. (Org.). **Treatise on Geochemistry**. Elsevier Science. 2014, p. 59-89.

CAMPOS, C. F.; PEREIRA, B. B.; CAMPOS JUNIOR, E. O.; SOUSA, E. F.; SOUTO, H. N.; MORELLI, S. Genotoxic evaluation of the river paranaíba hydrographic basin in Monte

Carmelo, MG, Brazil, by the *Tradescantia* micronucleus. **Genetics and Molecular Biology.**, v. 38, p. 507-512, 2015.

CANTINHA, R. S.; BORRELY, S. I.; NAKANO, E.; AMARAL, A.; SILVA, L. R. S.; MELO, A. M. M. A. Effects of high dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata*. **International Journal of Low Radiation.**, v. 7, p. 245-252, 2010.

CANTINHA, R. S.; BORRELY, S. I.; OGUIURA, N.; PEREIRA, A. C. B.; RIGOLON, M. M.; NAKANO, E. HSP70 expression in *Biomphalaria glabrata* snails exposed to cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety.**, v. 140, p. 18-23, 2017.

CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L. Identificação morfológica de *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. Belo Horizonte: **Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz**, 2004. 1 CD (Série esquistossomose, 6).

CASCIO, W. E. Proposed pathophysiologic framework to explain some excess cardiovascular death associated with ambient air particle pollution: Insights for public health translation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.**, v. 1860, n. 12, p. 2869-2879, 2016.

CHEUNG, C. C. C.; LAM, P. K. S. Effect of cadmium on the embryos and juveniles of a tropical freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). **Water Science & Technology.**, v. 38, p. 263-270, 1998.

CIEŚLIK, B. M.; NAMIEŚNIK, J.; KONIECZKA, P. Review of sewage sludge management: standards, regulations and analytical methods. **Journal of Cleaner Production.**, v. 90, p. 1-15, 2015.

CILIBERTI, A.; CHAUMOT, A.; RECOURA-MASSAQUANT, R.; CHANDESRI, A.; FRANÇOIS, A.; COQUERY, M.; FERRÉOL, M.; GEFFARD, O. Caged Gammarus as biomonitors identifying thresholds of toxic metal bioavailability that affect gammarid densities at the French national scale. **Water Research.**, v. 118, p. 131-140, 2017.

CIMERMAM, B.; CIMERMAM, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 216-219, 2001.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; ŠTĚTINA. The Comet assay: topical issues. **Mutagenesis.**, v. 23, p. 143-151, 2008.

COLOSIMO, E. A.; GIOLO, S.R. **Análise de sobrevivência aplicada**. São Paulo: Edgar Blücher, 2006. 392 p.

DIAS, G. M. F.; BEVILACQUA, P. D.; BASTOS, R. K. X.; OLIVEIRA, A. A.; CAMPOS, G. M. M. *Giardia spp.* and *Cryptosporidium spp.* in a fresh water supply source contaminated with human and animal excreta and waste water. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 60, n. 6, p. 1291-1300, 2008.

DORNE, J. L. C. M.; KASS, G. E. N.; BORDANJANDI, L. R.; AMZAL, B.; BERTELSEN, U.; CASTOLDI, A. F.; HEPPNER, C.; ESKOLA, M.; FABIANSSEN, S.; FERRARI, P.; SCARAVELLI, E.; DOGLIOTTI, E.; FUERST, P.; BOOBIS, A. R.; VERGER, P. Metal Ions

in Life Sciences. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. (Org.). **Organometallics in Environment and Toxicology**. Cambridge: RSC Publishing. 2011, Cap. 2, p. 27-60.

DUAN, W.; MENG, F.; CUI, H.; LIN, Y.; WANG, G.; WU, J. Ecotoxicity of phenol and cresols to aquatic organisms: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**., v. 157, p. 441-456, 2018.

FRANÇOIS, G.; MÉLANIE, D.; MARLÈNE, F.; MICHEL, F. Effects of a municipal effluent on the freshwater mussel *Elliptio complanata* following challenge with *Vibrio anguillarum*. **Journal of Environmental Sciences**., v. 37, p. 91-9, 2015.

FUGIEL, A.; BURCHART-KOROL, D.; CZAPLICKA-KOLARZ, K.; SMOLIŃSKIA, A. Environmental impact and damage categories caused by air pollution emissions from mining and quarrying sectors of European countries. **Journal of Cleaner Production**., v. 143, p. 159-168, 2017.

GAGNAIRE, B.; BADO-NILLES, A.; SANCHEZ, W. Depleted uranium disturbs parâmetros imunes no zebrafish, *Danio rerio*: uma experiência *ex vivo/in vivo*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**., v. 67, n. 3, p. 426-435, 2014.

GAJSKI, G.; ŽEGURA, B.; LADEIRA, C.; POURRUT, B.; DEL BO', C.; NOVAK, M.; SRAMKOVA, M.; MILIĆ, M.; GUTZKOW, K. B.; COSTA, S.; DUSINSKA, M.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**., v. 779, p. 82-113, 2019.

GAJSKI, G.; OREŠČANIN, V.; GARAJ-VRHOVAC, V. Cytogenotoxicity of sewage sludge leachate before and after calcium oxide-based solidification in human lymphocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**., v. 74, p. 1408-1415, 2001.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; GUILOSKI, I. C.; LIMA, S. B.; ASSIS, H. C. S.; LONGHI, S. J.; PRIOLI, A. J. Multivariate and integrative approach to analyze multiple biomarkers in ecotoxicology: A field study in Neotropical region. **Science of the Total Environment**., v. 609, p. 1208-1218, 2017.

GOMES, T.; ARAÚJO, O.; PEREIRA, R.; ALMEIDA, A. C.; CRAVO, A.; BEBIANO, M. J. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**., v. 84, p. 51-59, 2013.

GOMES, T.; PINHEIRO, J. P.; CANDIO, I.; PEREIRA, C. G.; CARDOSO, A.; BEBIANNO, M. J. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Science & Technology**., v. 45, n. 21, p. 9356-9362, 2011.

GRANT, W. F. The present status of higher-plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GRAZEFFE, V. S.; TALLARICO, L. F.; PINHEIRO, A. S.; KAWANO, T.; SUZUKI, F. M.; OKAZAKI, K.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**., v. 654, n. 1, p. 58-63, 2008.

GUERRERO, N. R. V.; NAHABEDIAN, D. E.; WIDER, E. A. Analysis of some actors that may modify the bioavailability of cadmium and lead by *Biomphalaria glabrata*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 2762-2768, 2000.

GYAMFI, E.; APPIAH-ADJEI, E. K.; ADJEI, K. A. Potential heavy metal pollution of soil and water resources from artisanal mining in Kokoteasua, Ghana. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 8, p. 450-456, 2019.

HABIB, M. R.; MOHAMED, A. Z.; OSMAN, G. Y.; MOSSALEM, H. S.; EL-DIN, A. T. S.; CROLL, R. P. *Biomphalaria alexandrina* as a bioindicator of metal toxicity. **Chemosphere**, v. 157, p. 97-106, 2016.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTOS, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v.11, p. 714-719, 1977.

HEIJERICK, D. G.; REGOLI, L.; STUBBLEFIELD, W. The chronic toxicity of molybdate to marine organisms. I. Generating reliable effects data. **Science of The Total Environment**, v. 430, p. 260-269, 2012.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 277, n. 2, p.91-138, 1992.

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

JURBERG, P.; SCHALL, V. T.; BARBOSA, J. V.; GATTI, M. J., SOARES, M. S. Behavior of *Biomphalaria glabrata* the intermediate host snail of *Schistosoma mansoni*, at different depths in water in laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 197-208, 1987.

KALPAXIS, D. L.; THEOS, C.; XAPLANTERI, M. A.; DINOS, G. P.; CATSIKI, A. V.; LEOTSINIDIS, M. Biomonitoring of Gulf of Patras, N. Peloponnesus, Greece. Application of a biomarker suite including evaluation of translation efficiency in *Mytilus galloprovincialis* cells. **Environmental Research**, v. 94, n. 2, p. 211-220, 2004.

KATSUMITI, A.; THORLEY, A. J.; AROSTEGUI, I.; REIP, P.; VALSAMI-JONES, E.; TETLEY, T. D.; CAJARAVILLE, M. P. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells in vitro and comparative sensitivity with human cells. **Toxicology in Vitro**, v. 48, p. 146-158, 2018.

KLEE, N.; GUSTAVSSON, L.; KOSMEHL, T.; ENGWALL, M.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T.; HOLLERT, H. Changes in toxicity and genotoxicity of industrial sewage sludge samples containing nitro- and amino-aromatic compounds following treatment in bioreactors with different oxygen regimes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 11, n. 5, p. 313-320, 2004.

KOCHHANN, D.; PAVANATO, M. A.; LLESUY, S. F.; CORREA, L. M.; RIFFEL, A. P. K.; LORO, V. L.; MESKO, M. F.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish

(*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. **Chemosphere.**, v. 77, n. 3, p. 384-391, 2009.

KOPP, B.; ZALKO, D.; AUDEBERT, M. Genotoxicity of 11 heavy metals detected as food contaminants in two human cell lines. **Environmental and Molecular Mutagenesis.**, v. 59, n. 3, p. 202-210, 2018.

KORTEN, I.; RAMSEY, K.; LATZIN, P. Air pollution during pregnancy and lung development in the child. **Paediatric Respiratory Reviews.**, v. 21, 38-46, 2017.

KUBRAK, O. I.; HUSAK, V. V.; ROVENKO, B. M.; POIGNER, H.; KRIEWS, M.; ABELE, D.; LUSHCHAK, V. I. Antioxidant system efficiently protects goldfish gills from Ni²⁺ induced oxidative stress. **Chemosphere.**, v. 90, p. 971-976, 2013.

LADHAR-CHAABOUNI, R.; HAMZA-CHAFFAI, A. The cell cultures and the use of haemocytes from marine molluscs for ecotoxicology assessment. **Cytotechnology.**, v. 68, n. 5, p. 1669-1685, 2015.

LE BIHAN, E.; PERRIN, A.; KOUETA, N. Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda): effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.**, v. 309, n.1, p. 47-66, 2004.

LEE, J. W.; WON, E-J.; RAISUDDIN, S.; LEE, J-S. Significance of adverse outcome pathways in biomarker-based environmental risk assessment in aquatic organisms. **Journal of Environmental Sciences.**, v. 35, n.1, p. 115-127, 2015.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – A case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEONARD, M. E.; WOOD, C. M. Acute toxicity, critical body residues, Michaelis–Menten analysis of bioaccumulation, and ionoregulatory disturbance in response to waterborne nickel in four invertebrates: *Chironomus riparius*, *Lymnaea stagnalis*, *Lumbriculus variegatus* and *Daphnia pulex*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.**, v. 158, p. 10-21, 2013.

LEVY, R. J. Carbon monoxide pollution and neurodevelopment: A public health concern. **Neurotoxicology and Teratology.**, v. 49, p. 31-40, 2015.

LIMA, M. V.; SIQUEIRA, W. N.; SILVA, H. A. M. F.; LIMA FILHO, J. M.; FRANÇA, E. J.; MELO, A. M. M. A. Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Environmental Science and Pollution Research.**, v. 26, n. 4, p. 3350-3356, 2019.

LÓPEZ-DOVAL, J. C.; CASTRO-CATALÀ, N.; ANDRÉS-DOMÉNECH, I.; BLASCO, J.; GINEBREDÀ, A.; MUÑOZ, I. Analysis of monitoring programmes and their suitability for ecotoxicological risk assessment in four Spanish basins. **Science of the Total Environment.**, v. 440, p. 194-203, 2012.

LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. **Methods in Molecular Biology**., v. 740, p. 7-12, 2011.

MANOJ, K.; PADHY, P. K. Oxidative stress and heavy metals: an appraisal with reference to environmental biology. **International Journal of Biological Sciences**., v. 2, p. 91–101, 2013.

MANZANO, B. C.; ROBERTO, M. M.; HOSHINA, M. M.; MENEGÁRIO, A. A.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Science and Pollution Research**., v. 22, n. 2, p. 1399–1407, 2015.

MARTIN, K.; HUGGINS, T.; KING, C.; CARROLL, M. A.; CATAPANE, E. J. The neurotoxic effects of manganese on the dopaminergic innervation of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**., v. 148, n. 2, p. 152-159, 2008.

MEBANE, C. A. **Cadmium Risks to Freshwater Life: Derivation and validation of low-effect criteria values using laboratory and field studies**. US Department of the Interior, US Geological Survey, pp.142, 2006.

MCCRINK-GOODE, M. Pollution: A global threat. **Environment International**., v. 68, p. 162-170, 2014.

MELERO, J. A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, R.; VASILIADOU, I. A.; CASTILLEJO, F. M.; BAUTISTA, L. F.; IGLESIAS, J.; MORALES, G. MOLINA, R. Municipal sewage sludge to biodiesel by simultaneous extraction and conversion of lipids. **Energy Conversion and Management**., v. 103, p. 111-118, 2015.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Effluent biomonitoring. In: WEXLER, P. (Org.). **Encyclopedia of Toxicology**. Academic Press. 2014, p. 312-315.

MOHAMED, S. A.; ELSHAL, M. F.; KUMOSANI, T. A.; MAL, A. O.; AHMED, Y. M.; ALMULAIKY, Y. Q.; ASSERI, A. H.; ZAMZAMI, M. A. Heavy metal accumulation is associated with molecular and pathological perturbations in liver of *Variola louti* from the Jeddah coast of Red Sea. **International Journal of Environmental Research and Public Health**., v. 13, n. 3, p. 342, 2016.

MOK, J. S.; KWON, J. Y.; SON, K. T.; CHOI, W. S.; SHIN, K. B.; LEE, T. S.; KIM, J. H. Distribution of heavy metals in muscles and internal organs of Korean cephalopods and crustaceans: risk assessment for human health. **Journal Food Protection**., v. 77, p. 2168-2175, 2014.

MORAIS, C. R.; BONETTI, A. M.; MOTA, A. A.; CAMPOS, C. F.; SOUTO, H. Z.; NAVES, M. P. C.; SANTOS, V. S. V.; CAMPOS JÚNIOR, E. O.; PAVANIN, L. A.; REZENDE, A. A. A.; SPANÓ, M. A.; PEREIRA, B. B. Evaluation of toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of samples from domestic and industrial sewage. **Chemosphere**., v. 201, p. 342-350, 2018.

NIKINMAA, M. Bioindicators and Biomarkers. In: _____. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Academic Press. 2014, Cap. 12, p. 147-155.

NJOKU, K. L.; AKINOLA, M. O.; TOMMY, I. O. Genotoxicity of industrial paint effluent on the root meristem of *Allium Cepa*. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**., v. 9, n. 2, p. 11-17, 2015.

NOGAWA, K.; SUWAZONO, Y.; NISHIJO, M.; SAKURAI, M.; ISHIZAKI, M.; MORIKAWA, Y.; WATANABE, Y.; KIDO, T.; NAKAGAWA, H. Increase of lifetime cadmium intake dose-dependently increased all cause of mortality in female inhabitants of the cadmium-polluted Jinzu River basin, Toyama, Japan. **Environmental Research**., v. 164, p. 379-384, 2018.

NORDBELG, M.; NORDBELG, G. Trace element research-historical and future aspects. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**., v.38, p. 46-52, 2016.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Molluscs as bioindicators. In: MARKERT, et al., (Org.). **Trace Metals and Other Contaminants in the Environment**. Pergamon. 2003, Cap. 17, p. 577-635.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**., v. 567, p. 109–149, 2004.

OMAR, W. A.; ZAGHLOUL, K. H.; ABDEL-KHALEK, A. A.; ABO-HEGAB, S. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**., v. 746, n. 1, p. 7-14, 2012.

OSSANA, N. A.; SALIBIÁN, A. Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**., v. 8, n. 1, p. 67–74, 2013.

PALACIOS, Ò.; CAPDEVILA, M. Toxicology (Pb, Hg, Cd, As, Al, Cr, and Othres). In: REEDIJK, J.; POEPELMEIER, K. (Org.). **Comprehensive Inorganic Chemistry II**. Elsevier. 2013, p. 51-63.

PALERMO, F. F.; RISSO, W. E.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. R. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**., v. 116, p. 19-28, 2015.

PANAHI, Y.; MELLATYAR, H.; FARSHBAF, M.; SABET, Z.; FATTAHI, T.; AKBARZADEHE, A. Biotechnological applications of nanomaterials for air pollution and water/wastewater treatment. **Materials Today: Proceedings 5**., v. 5, p. 15550–15558, 2018.

PANFOLI, I.; BURLANDO, B.; VIARENGO, A. Effects of heavy metals on phospholipase C in gill and digestive gland of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**., v. 127, p. 391-397, 2000.

PARAENSE, W. L. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A. S (Org.). **Esquistossomose Mansonii: Por um grupo de colaboradores especializados**. São Paulo, Sarvier/Edups, 1970. 1-30 p.

PARAENSE, W. L. Os locais de cruz e adubação auto em planorbídeos. **Revista Brasileira de Biologia**., v. 36, p. 535-539, 1976.

PAVLICA, M.; KLOBUČAR, G. I. V.; VETMA, N.; ERBEN, R.; PAPEŠ, D. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, v. 465, p. 145-150, 2000.

PAVLICA, M.; ŠTAMBUK, A.; MALOVIC, L.; MLADINIC, M.; GORAN, I.; KLOBU, V. C. DNA integrity of chub erythrocytes (*Squalius cephalus* L.) as an indicator of pollution related genotoxicity in the River Sava. **Environmental Monitoring and Assessment.**, v. 77, n. 1-4, p. 85-94, 2011.

PAUGET, B.; VILLENEUVE, A.; REDON, P. O.; CURVIER, A.; VAUFLEURY, A. Assessment of the bioavailability and depuration of uranium, cesium and thorium in snails (*Cantareus aspersus*) using kinetics models. *Journal of Hazardous Materials.*, v. 335, p. 75-83, 2017.

RAHEEM, A.; SIKARWAR, A. S.; HE, J.; DASTYAR, W.; DIONYSIOU, D. D.; WANG, W.; ZHAO, M. Opportunities and challenges in sustainable treatment and resource reuse of sewage sludge: A review. **Chemical Engineering Journal.**, v. 337, p. 616-641, 2018.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, v. 418, p. 113-119, 1998.

RAO, N. V.; RAJASEKHAR, M.; RAO, G. C. Detrimental effect of air pollution, Corrosion on building materials and historical structures. **American Journal of Engineering Research.**, v. 3, p. 359-364, 2014.

REBOK, K.; JORDANOVA, M.; SLAVEVSKA-STAMENKOVIĆ, V.; IVANOVA, L.; KOSTOV, V.; STAFILOV, T.; ROCHA, E. Frequencies of erythrocyte nuclear abnormalities and of leucocytes in the fish *Barbus peloponnesius* correlate with a pollution gradient in the River Bregalnica (Macedonia). **Environmental Science and Pollution Research.**, v. 24, n. 11, p. 10493-10509, 2017.

REVEL, M.; FOURNIER, M.; ROBIDOUX, P. Y. Immunotoxicity and genotoxicity of single-walled carbon nanotubes co-exposed with cadmium in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. **Environmental Toxicology and Pharmacology.**, v. 62, p. 177-180, 2018.

RICH, D. Q. Accountability studies of air pollution and health effects: lessons learned and recommendations for future natural experiment opportunities. **Environment International.**, v. 100, p. 62-78, 2017.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M. S.; JORDÃO, B. Q. Detection of genotoxicity of water from an urbanized stream, in *Corbicula fluminea* (Mollusca) (*in vivo*) and CHO-K1 cells (*in vitro*) using comet assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology.**, v. 59, n. 1, p. 31-38, 2010.

ROCHA, E.; ROCHA, J. M.; GALANTE, H. M.; SILVA, W. M.; MONTEIRO, A. F. R. The hepatocytes of the brown trout (*Salmo trutta* F. *fario*): a stereological study of their number and size during the breeding cycle. **Ichthyological Research.**, v. 56, p. 43-54, 2009.

- RODRÍGUEZ, M. C.; DUPONT-COURTADE, L.; OUESLATI, W. Air pollution and urban structure linkages: Evidence from European cities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.**, v. 53, p. 1-9, 2016.
- ROMERO, A.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update. **Fish & Shellfish Immunology.**, v. 46, n. 1, p. 79-87, 2015.
- SALEM, Z. B.; CAPELLI, N.; GRISEY, E.; BAURAND, P. E.; AYADI, H.; ALEYA, L. First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: The advantage of using the RAPD-PCR technique. **Ecotoxicology and Environmental Safety.**, v. 101, p. 90-96, 2014.
- SANTOS, F. T. J.; SIQUEIRA, W. N.; SANTOS, M. L. O.; SILVA, H. A. M. F.; SÁ, J. L. F.; FERNANDES, T. S.; SILVA, N. H.; FRANÇA, E. J.; SILVA, E. B.; MELO, A. M. M. A. Radiosensitizer effect of usnic acid on *Biomphalaria glabrata* embryos. **International Journal of Radiation Biology.**, v. 94, n. 9, p. 838-843, 2018.
- SAUVÉ, S.; BROUSSEAU, P.; PELLERIN, J.; MORIN, Y.; SENÉCAL, L.; GOUDREAU, P.; FOURNIER, M. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). **Aquatic Toxicology.**, v. 58, n. 3-4, p. 189-200, 2002.
- SAVA, F.; CARLSTEN, C. Respiratory Health Effects of Ambient Air Pollution : An Update. **Clinics in Chest Medicine.**, v. 33, n. 4, p. 759-769, 2012.
- SCANU, S.; SOETEBIER, S.; PIAZZOLLA, S.; TIRALONGO, F.; MANCINI, E.; ROMANO, N.; MARCELLI, M. Concentrations of As, Cd, Cr, Ni, and Pb in the echinoid *Paracentrotus lividus* on the coast of Civitavecchia, northern Tyrrhenian Sea, Italy. **Regional Studies in Marine Science.**, v. 1, p. 7-17, 2015.
- SIDDIQUI, M. A.; SAQUIB, Q.; AHAMED, M.; FARSHORI, N. N.; AHMAD, J.; WAHAB, R.; KHAN, S. T.; ALHADLAQ, H. A.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; PANT, A. B. Molybdenum nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress, G2/M arrest, and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 125, p. 73-81, 2015.
- SILVA, R. C.; MOTTA, M. A.; AMÂNCIO, F. F.; MELO, A. M. M. A. Efeitos do oxifluorfen na fecundidade e no Teor de proteínas do caramujo *Biomphalaria glabrata*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente.**, v. 18, p. 73-82, 2008.
- SOGORB, M. A.; ESTÉVEZ, J.; VILANOVA, E. Biomarkers in biomonitoring of xenobiotics. In: GUPTA, R. C. (Org.). **Biomarkers in Toxicology.** Academic Press. 2014, Cap. 57, p. 965-973.
- SOMMAGGIO, L. R. D.; MAZZEO, D. E. C.; PAMPLONA-SILVA, M. T.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. **Chemosphere.**, 199:10-15, 2018.
- SONG, Q.; LI, J. A review on human health consequences of metals exposure to e-waste in China. **Environmental Pollution.**, v. 196, p. 450-461, 2015.

SPARLING, D. W. Bioindicators of contaminant exposure. In: _____ (Org.). **Ecotoxicology Essentials**. Academic Press. 2016, Cap. 3, p. 45-66.

SPIVAK, G.; COX, R. A.; HANAWALT, P. C. New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 681, n. 1, p. 44–50, 2009.

STRUNGARU, S.; NICOARA, M.; TEODOSIU, C.; BALTAG, E.; CIOBANU, C.; PLAVAN, G. Patterns of toxic metals bioaccumulation in a cross-border freshwater reservoir. **Chemosphere**, v. 207, p. 192-202, 2018.

SUMMAK, S.; AYDEMIR, N. C.; VATAN, Ö.; YILMAZ, D.; ZORLU, T.; BILALOĞLU, R. Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2443–2447, 2010.

SUN, J.; ZHANG, R.; QIN, L.; ZHU, H.; HUANG, Y.; XUE, Y.; AN, S.; XIE, X.; LI, A. Genotoxicity and cytotoxicity reduction of the polluted urban river after ecological restoration: a field-scale study of Jialu River in northern China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 7, p. 6715-6723, 2017.

SYED-HASSAN, S. S. A.; WANG, Y.; HU, S.; SU, S.; XIANG, J. Thermochemical processing of sewage sludge to energy and fuel: fundamentals, challenges and considerations. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 888-913, 2017.

SZEFER, P.; WENNE, R. Concentration of uranium and thorium in molluscs inhabiting Gdańsk Bay, Baltic sea. **Science of The Total Environment**, v. 65, p. 191-202, 1987.

TAGLIAFERRO, M.; GONÇALVES, A. M. M.; BERGMAN, M.; SOBRAL, O.; GRAÇA, M. A. S. Assessment of metal exposure (uranium and copper) by the response of a set of integrated biomarkers in a stream shredder. **Ecological Indicators**, v. 95, p. 991-1000, 2018.

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

TARAZONA, J. V. Pollution, Soil. In: WEXLER, P. (Org.). **Encyclopedia of Toxicology**. Academic Press. 2014a. p. 1019-1023.

TARAZONA, J. V. Pollution, Water. In: WEXLER, P. (Org.). **Encyclopedia of Toxicology**. Academic Press. 2014b. p. 1024-1027.

TCHOUNWOU, P. B. Genotoxic stress. In: BRENNER, S.; MILLER, J. H. (Org.). **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. Academic Press. 2013, p. 313-317.

TEWARI, A.; CHAUHAN, L. K. S.; KUMAR, D.; GUPTA, S. K. Municipal sludge leachate induced genotoxicity in mice - a subacute study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 587, p. 9-15, 2005.

TEZEL, A.; TANDUKAR, M.; PAVLOSTATHIS, S. G. Anaerobic biotreatment of municipal sewage sludge. In: MOO-YOUNG, M. (Org.). **Comprehensive Biotechnology**. Academic Press. 2011, p. 447-461.

THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A. MOLUSCOS. In: AMARAL R. S. (Org.). **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2008. p. 13-35.

TURAK, E.; HARRISON, I.; DUDGEON, D.; ABELL, R.; BUSH, A.; DARWALL, W.; FINLAYSON, C. A.; FERRIER, S.; FREYHOF, J.; HERMOSO, V.; JUFFE-BIGNOLI, D.; LINKE, S.; NEL, J.; PATRICIO, H. C.; PITTOCK, J.; RAGHAVAN, R.; REVENGA, C.; SIMAIKA, J. P.; WEVERA, D. Essential Biodiversity Variables for measuring change in global freshwater biodiversity. **Biological Conservation**, v. 213, p. 272-279, 2017.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1161-1208, 2005.

VALLERO, D. A. Scale and complexity of air pollution. In: _____. **Fundamentals of Air Pollution**. Amsterdam and Boston: Academic Press. 2014, Cap. 16, p. 381-412.

VAZ, A. F. M., COSTA, R. M. P. B.; MELO, A. M. M. A.; OLIVA, M. L. V.; SANTANA, L. A.; SILVA-LUCCA, R. A.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*; **Food Chemistry**, v. 119, p. 1507–1513, 2010.

WANG, F. Y.; RUDOLPH, V.; ZHU, Z. H. Sewage sludge technologies. In: JORGENSEN, S. E.; FATH, B. (Org.). **Encyclopedia of Ecology**. Elsevier Science. 2008, p. 3227-3242.

WILHELM, F. M. Pollution of aquatic ecosystem I. In: LIKENS G. E. (Org.). **Encyclopedia of Inland Waters**. Academic Press. 2009, p. 110-119.

WILSON-SANDERS, S. E. Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v. 52, n. 2, p. 126-152, 2011.

WU, J.; LI, M. The use of freshwater planarians in environmental toxicology studies: Advantages and potential. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 45-56, 2018.

WU, S.; LIU, F.; HUANG, S.; WU, Y.; GAO, J. Direct n-hexane extraction of wet sewage sludge at thermal and pressurized conditions: A preliminary investigation on its process and product characteristics. **Fuel Processing Technology**, v. 156, p. 90-97, 2017.

XU, K.; TANG, Z.; SHUOBO, L.; LIAO, Z.; XIA, H.; LIU, L.; WANG, Z.; QI, P. Effects of low concentrations copper on antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel *Mytilus coruscus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 82, p. 77-83, 2018.

YÁÑEZ-RIVERA, B.; GARCÍA-GASCA, A.; CORONA-VADILLO, D.; AGUILAR-ZÁRATE, G.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, I.; HERNÁNDEZ-CORNEJO, R.; MÁRQUEZ-ROCHA, F. J.; GARCÍA-RICO, L.; BETANCOURT-LOZANO, M. Multiple biomarker

approach in the fiddler crab to assess anthropogenic pollution in tropical coastal environments. **Biomarkers.**, 2018. doi: 10.1080/1354750X.2018.1523228

YAZICI, Z.; ŞİŞMAN, T. Genotoxic effects of water pollution on two fish species living in Karasu River, Erzurum, Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment.**, v. 186, n. 11, p. 8007-8016, 2014.

YOKEL, R. A. Manganese flux across the blood-brain barrier. **NeuroMolecular Medicine.**, v. 11, n. 4, p.297-310, 2009.

ZAKER, A.; CHEN, Z.; WANG, X.; ZHANG, Q. Microwave-assisted pyrolysis of sewage sludge: A review. **Fuel Processing Technology.**, v. 187, p. 84-104, 2019.

ZHANG, H.; REYNOLDS, M. Cadmium exposure in living organisms: A short review. **Science of the Total Environmental.**, v. 678, p. 761-767, 2019.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta.**, v. 606, n. 2, p. 135-150, 2008.

ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO MATERIAL DE REFERÊNCIA SRM 2781 – Domestic Sludge



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 2781

Domestic Sludge

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in the evaluation of methods used for the analysis of sludges and other materials of a similar matrix. Certified values are provided for elements. Reference values are provided for elements, synthetic polycyclic musks, and perfluorinated compounds (PFCs) as Perfluorinated Alkyl Acids (PFAAs) and Hexabromocyclododecanes (HBCDs). Information values are provided for PFAAs. SRM 2781 is a dried, pulverized domestic sludge. A unit of SRM 2781 consists of a bottle containing 40 g of dried, pulverized domestic sludge.

Certified Mass Fraction Values: The certified mass fraction values for elements are listed in Table 1; analytical methods are provided in Table 7. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1]. The measurands are the certified mass fractions listed in Table 1 and are metrologically traceable to the SI unit for mass expressed as percentages or as milligrams per kilogram, as indicated in the table.

Reference Mass Fraction Values: Reference mass fraction values for elemental and organic constituents are provided in Tables 2 through Table 5; analytical methods are provided in at the end in Table 7. Reference values are noncertified values that are the best estimate of the true values based on available data. The values do not meet NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement reproducibility, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods [1]. The measurands are the mass fractions listed in Tables 2 through 5 as determined by the methods indicated and are metrologically traceable to the SI unit for mass fraction expressed as percentages or as micrograms per kilogram, as indicated in the tables.

Information Mass Fraction Values: Information mass fraction values for organic constituents are provided in Table 6. An information value is considered to be a value that will be of interest to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value or only a limited number of analyses were performed [1]. Information values may not be used to assess metrological traceability.

Expiration of Certification: The certification of SRM 2781 is valid, within the measurement uncertainty specified, until 31 August 2025, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see "Instructions for Storage and Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet or register online) will facilitate notification.

Overall direction and coordination of technical measurements for the original characterization of this SRM was performed by J.D. Fassett of the NIST Chemical Sciences Division. Coordination and certification of additional elements and organic constituents were performed by J.L. Reiner of the NIST Chemical Sciences Division and D.J. O'Kelly formerly of NIST.

Statistical consultation was provided by L.M. Gill and N.A. Heckert of the NIST Statistical Engineering Division.

Carlos A. Gonzalez, Chief
Chemical Sciences Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 15 September 2015
Certificate Revision History on Page 6

Robert L. Watters, Jr, Director
Office of Reference Materials

SRM 2781

Page 1 of 8

Analytical measurements were performed at NIST by M.H. Ahsan, E.S. Beary, C.M. Beck II, D.A. Becker, M.S. Epstein, K. Garrity, R.R. Greenberg, R.M. Lindstrom, E.A. Mackey, J.L. Molloy, J.R. Moody, M.S. Nocun, B.R. Norman, D.J. O'Kelly, P.J. Paulsen, A. Peck, S.A. Rabb, M.S. Rearick, J.L. Reiner, T.A. Rush, R. Saraswati, J.M. Smeller, R.L. Watters, Jr., and L.J. Wood.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

INSTRUCTIONS FOR STORAGE AND USE

Storage: SRM 2781 must be stored in its original bottle at temperatures less than 30 °C.

Use: A minimum sample mass of 100 mg (dry mass; see "Instructions for Drying") should be used and sample preparation procedures should be designed to effect complete dissolution for analytical determinations to be related to the certified values provided.

Instructions for Drying: When nonvolatile elements are to be determined, samples should be vacuum dried at room temperature for 24 h or oven dried for 2 h at 110 °C. Volatile elements (e.g., arsenic, mercury, and selenium) and organic constituents should be determined on samples as received; separate samples should be dried according to these instructions to obtain a correction factor for moisture. Moisture corrections are then made to measurement values before comparing them to the certified values. [Note that the mass loss on drying at the time of certification was found to be in the range of 4.7 % to 6.6 % when using the recommended drying procedures.]

PREPARATION AND ANALYSIS⁽¹⁾

Source and Preparation of Material: The U.S. Geological Survey (USGS), under contract to NIST, obtained partially dehydrated sewage cake material from the Metropolitan Denver Sewage Disposal District No. 1. The material (approximately 182 kg) was placed in plastic-lined drums and transported to the USGS facilities (Lakewood, CO) for processing. It was dried at ambient temperature in a forced air chamber, ground to pass a 74 µm (200 mesh) sieve, blended for 24 h to assure homogeneity of the pulverized material. Test samples were taken from the blender for preliminary homogeneity analyses. The material was then radiation sterilized. The sterilized material was shipped in bulk to NIST, where the material was bottled in 40 g units after reblending for 4 h.

Analysis: The homogeneity was assessed at USGS on 10 replicate samples of bulk material for over 40 elements using x-ray fluorescence (XRF) and/or inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). Homogeneity was further assessed during certification analysis. At sample sizes of 100 mg or greater, no sample-to-sample variations in excess of those expected from the analytical measurements performed at USGS were detected.

Value Assignment: Analyses for value assignment were performed by NIST and collaborating laboratories where appropriate. Values were reported on a dry-mass basis in mass fraction units and are based on measurements using a sample mass of at least 100 mg. Analytical methods are provided in Table 7.

⁽¹⁾ Certain commercial equipment, instruments, or materials are identified in this report to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

Table 1. Certified Mass Fractions for Elements

Element	Mass Fraction (mg/kg)	Element	Mass Fraction (%)
Arsenic (As)	7.81 ± 0.67 ^(a)	Nitrogen (N)	4.78 ± 0.16 ^(b)
Cadmium (Cd)	12.78 ± 0.63 ^(a)		
Chromium (Cr)	202 ± 14 ^(a)		
Copper (Cu)	627.8 ± 18.4 ^(b)		
Lead (Pb)	200.8 ± 4.2 ^(b)		
Mercury (Hg)	3.68 ± 0.14 ^(b)		
Molybdenum (Mo)	46.6 ± 5.4 ^(a)		
Nickel (Ni)	80.2 ± 1.8 ^(b)		
Selenium (Se)	16.0 ± 1.5 ^(a)		
Silver (Ag)	97.6 ± 6.5 ^(b)		
Zinc (Zn)	1273 ± 68 ^(a)		

^(a) The certified mass fraction value is a weighted mean of the mass fractions determined by the methods indicated for each analyte [1]. The uncertainty listed with each value is an expanded uncertainty about the mean [1,2], with coverage factor, k , based on the t -interval where the degrees of freedom is the number of methods minus one and calculated by combining a pooled within-method variance with a between-method variance [3] following the ISO/JCGM Guide [4,5]. The certified values are reported on a dry-mass basis. For certified values to be valid, the material must be dried according to the instructions provided above.

^(b) The certified mass fraction value is a weighted mean of the mass fractions determined by the methods indicated for each analyte [1]. The expanded uncertainty is the half-width of a symmetric 95 % parametric bootstrap confidence interval [6], which is consistent with the ISO/JCGM Guide [4,5]. The effective coverage factor, k , is 2. The certified values are reported on a dry-mass basis. For certified values to be valid, the material must be dried according to the instructions provided above.

Reference Mass Fraction Values: Each reference mass fraction value, expressed as a mass fraction on a dry-mass basis, is an equally weighted mean of results provided by NIST and/or collaborating laboratories.

Table 2. Reference Mass Fractions for Elements

Element	Mass Fraction (µg/kg)	Element	Mass Fraction (%)
Beryllium (Be)	613.3 ± 24.7 ^(a)	Aluminum (Al)	1.6 ± 0.1 ^(b)
		Calcium (Ca)	3.9 ± 0.1 ^(c)
		Iron (Fe)	2.8 ± 0.1 ^(c)
		Magnesium (Mg)	0.59 ± 0.02 ^(b)
		Phosphorus (P)	2.43 ± 0.04 ^(b)
		Potassium (K)	0.49 ± 0.03 ^(b)
		Silicon (Si)	5.1 ± 0.2 ^(a)
		Sodium (Na)	0.21 ± 0.01 ^(b)
		Titanium (Ti)	0.31 ± 0.01 ^(b)

^(a) The reference mass fraction value was calculated from a single measurement method. The expanded uncertainty is the half width of a 95 % Student's t -confidence interval for μ . The reference values are reported on a dry-mass basis. For reference values to be valid, the material must be dried according to the instructions provided above.

^(b) The reference mass fraction value is a weighted mean of the mass fractions determined by the methods indicated for each analyte [1]. The reference values are reported on a dry-mass basis. The expanded uncertainty is the half-width of a symmetric 95 % parametric bootstrap confidence interval [6], which is consistent with the ISO/JCGM Guide [4,5]. The effective coverage factor, k , is 2. For reference values to be valid, the material must be dried according to the instructions provided above.

^(c) The reference mass fraction value is a weighted mean of the mass fractions determined by the methods indicated for each analyte [1]. The uncertainty listed with each value is an expanded uncertainty about the mean [1,2], with coverage factor, k , based on the t -interval where the degrees of freedom is the number of methods minus one and calculated by combining a pooled within-method variance with a between-method variance [3] following the ISO/JCGM Guide [4,5]. For reference values to be valid, the material must be dried according to the instructions provided above.

Table 3. Reference Mass Fractions for Polycyclic Musks

	Mass Fraction ($\mu\text{g/kg}$)
1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexa-methyl-cyclopenta-(γ)-2-benzopyran (HHCB)	9200 $\pm$ 1220 ^(a)
7-Acetyl-1,1,3,4,6-hexamethyltetralin (AHTN)	19700 $\pm$ 900 ^(a)
5-Acetyl-1,1,2,6-tetramethyl-3-isopropylindan (ATII)	2260 $\pm$ 90 ^(a)
4-Acetyl-1,1-dimethyl-6-tert-butylindan (ADBI)	1140 $\pm$ 60 ^(a)
6-Acetyl-1,1,2,3,3,5-hexamethylindan (AHMI)	142 $\pm$ 6 ^(b)

^(a) The reference mass fraction value is a weighted mean of the mass fractions determined by the methods indicated for each analyte [1]. The uncertainty listed with each value is an expanded uncertainty about the mean [1,2], with coverage factor, $k=2$, calculated by combining a pooled within-method variance with a between-method variance [3] following the ISO/JCGM Guide [4,5]. The reference values are reported on a dry-mass basis. For reference values to be valid, the material must be dried according to the instructions provided above.

^(b) The reference mass fraction value is a weighted mean of the mass fractions determined by the methods indicated for each analyte [1]. The expanded uncertainty is the half-width of a symmetric 95 % parametric bootstrap confidence interval [6], which is consistent with the ISO/JCGM Guide [4,5]. The effective coverage factor, k , is 2. The reference values are reported on a dry-mass basis. For reference values to be valid, the material must be dried according to the instructions provided above.

Table 4. Reference Mass Fractions for Selected Perfluorinated Alkyl Acids (PFAAs)

	Mass Fraction ^(a) ($\mu\text{g/kg}$)
Perfluorohexanoic Acid (PFHxA)	13.0 $\pm$ 2.0
Perfluoroheptanoic Acid (PFHpA)	7.96 $\pm$ 1.50
Perfluorooctanoic Acid (PFOA)	28.5 $\pm$ 3.3
Perfluorohexanesulfonic Acid (PFHxS)	9.39 $\pm$ 1.76
Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS)	225 $\pm$ 41
Perfluorooctane Sulfonamide (PFOSA)	6.31 $\pm$ 0.97

^(a) The reference mass fraction value is a weighted mean of the mass fractions determined by the methods indicated for each analyte [1]. The uncertainty listed with each value is an expanded uncertainty about the mean [1,2], with coverage factor, $k=2$, calculated by combining a pooled within-method variance with a between-method variance [3] following the ISO/JCGM Guide [4,5]. The reference values are reported on a dry-mass basis. For reference values to be valid, the material must be dried according to the instructions provided above.

Table 5. Reference Mass Fractions for Hexabromocyclododecanes (HBCD)

	Mass Fraction ($\mu\text{g/kg}$)
α -hexabromocyclododecane (α -HBCD)	17.8 $\pm$ 1.7 ^(a)
β -hexabromocyclododecane (β -HBCD)	1.65 $\pm$ 0.39 ^(a)
γ -hexabromocyclododecane (γ -HBCD)	9.73 $\pm$ 0.77 ^(b)

^(a) The reference mass fraction value is a weighted mean of the mass fractions determined by the methods indicated for each analyte [1]. The uncertainty listed with each value is an expanded uncertainty about the mean [1,2], with coverage factor, $k=2$, calculated by combining a pooled within-method variance with a between-method variance [3] following the ISO/JCGM Guide [4,5]. The reference values are reported on a dry-mass basis. For reference values to be valid, the material must be dried according to the instructions provided above.

^(b) The reference mass fraction value is a weighted mean of the mass fractions determined by the methods indicated for each analyte [1]. The expanded uncertainty is the half-width of a symmetric 95 % parametric bootstrap confidence interval [6], which is consistent with the ISO/JCGM Guide [4,5]. The effective coverage factor, k , is 2. The reference values are reported on a dry-mass basis. For reference values to be valid, the material must be dried according to the instructions provided above.

Table 6. Information Mass Fraction Values for Selected Perfluorinated Alkyl Acids (PFAAs)

	Mass Fraction ($\mu\text{g/kg}$)
Perfluorononanoic Acid (PFNA)	5.09
Perfluorodecanoic Acid (PFDA)	4.76

Table 7. Methods used for the Analysis of SRM 2781

Analyte	Method ^(a)	Analyte	Method ^(a)
Aluminum	INAA, ICP-AES, XRF	Musks	GC-MS
Arsenic	RNAA, Hyd. AAS, INAA	Nickel	ICP-AES, ID-ICPMS, INAA, TXRF
Beryllium	ICP-MS	Nitrogen	PGAA
Cadmium	ID-ICPMS, PGAA, RNAA, INAA, TXRF	PFAAs	LC-MS/MS
Calcium	INAA, TXRF, ICP-AES, XRF	Phosphorus	Color, ICP-AES, XRF
Chromium	INAA, ICP-OES	Potassium	INAA, TXRF, ICP-AES
Copper	ID-ICPMS, RNAA, INAA, TXRF	Selenium	Hyd. AAS, RNAA, INAA, TXRF
HBCDs	LC-MS/MS	Silicon	XRF
Iron	INAA, TXRF, ICP-AES, XRF	Silver	INAA, ICP-OES
Lead	ICP-AES, ID-ICPMS, TXRF	Sodium	INAA, ICP-AES, XRF
Magnesium	INAA, ICP-AES, XRF	Titanium	INAA, TXRF, XRF
Mercury	FIA-CV-AAS, RNAA, INAA	Zinc	ICP-AES, ID-ICPMS, INAA, TXRF
Molybdenum	ID-ICPMS, ICP-AES, TXRF, INAA		

^(a) Methods used for establishment of certified mass fraction values are shown in bold-face type; methods used for reference mass fraction values or to corroborate certified mass fraction values are not in bold.

Methods Key:

INAA: Instrumental Neutron Activation Analysis
 ICP-AES: Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy
 XRF: X-Ray Fluorescence
 RNAA: Radiochemical neutron activation analysis
 Hyd AAS: Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy
 ICP-MS: Inductively Coupled plasma – mass spectrometry
 ID-ICPMS: Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
 PGAA: Prompt Gamma Activation Analysis
 TXRF: Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry
 ICP-OES: Inductively Coupled plasma
 LC-MS/MS: Liquid chromatography – Mass Spectroscopy Mass Spectroscopy
 FIA-CV-AAS: Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy
 GC-MS: Gas chromatography – Mass Spectroscopy
 Color: Colorimetry

Cooperating Analysts and Laboratories:

University of Illinois, Nuclear Engineering Department, Champaign, IL, S. Landsberger and D. Wu.
 USGS, Lakewood, CO, S.A. Wilson, D. Siems, and P. Briggs.
 GKSS Research Center, Institute of Physical and Chemical Analytics, Geesthacht, Germany, A. Prange, U. Reus, and R. Neidigesäss.
 3M Company, St. Paul, MN.
 Colorado School of Mines.
 US Environmental Protection Agency, Athens, GA.
 Wageningen IMARES, Ijmuiden, The Netherlands.

REFERENCES

- [1] Rukhin, A.L.; *Weighted Means Statistics in Interlaboratory Studies*; Metrologia, Vol. 46, pp. 323–331 (2009).
- [2] Dersimonian, R.; Laird, N.; *Meta-Analysis in Clinical Trials*; Control Clin. Trials, Vol. 7, pp. 177–188 (1986).
- [3] Horn, R.A.; Horn, S.A.; Duncan, D.B.; *Estimating Heteroscedastic Variance in Linear Models*, J. Am. Stat. Assoc., Vol. 70, pp. 380–385 (1975).
- [4] JCGM 100:2008; *Evaluation of Measurement Data — Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM 1995 with Minor Corrections); Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) (2008); available at http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf (accessed Sep 2015); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*, NIST Technical Note 1297; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://www.nist.gov/pml/pubs/index.cfm> (accessed Sep 2015).
- [5] JCGM 101:2008; *Evaluation of Measurement Data – Supplement 1 to the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement – Propagation of Distributions Using a Monte Carlo Method*, JCGM (2008); available at http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_101_2008_E.pdf (accessed Sep 2015).
- [6] Efron, B.; Tibshirani, R.J.; *An Introduction to the Bootstrap*; Chapman & Hall (1993).
- [7] Kane, J.S.; *Leach Data vs Total: Which is Relevant for SRMs*, Fresenius J. Anal. Chem. Vol. 352; pp 209–213, (1995).
- [8] U.S. EPA 1991 Code of Federal Regulations, Title 40, Part 136, Paragraph 33.
- [9] Federal Register SW-846, *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods*; available at www.epa.gov (accessed Sep 2015).
- [10] New Jersey Administrative Code, N.J.A.C., 7:14-4 (1994).

Certificate Revision History: 15 September 2015 (Change from reference to certified mass fractions and the addition of reference mass fractions for several inorganic and organic constituents; addendum changed to appendix; change of expiration date; editorial changes); 25 October 1996 (Addition of Addendum); 22 June 1995 (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the Certificate of Analysis in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program: telephone (301) 975-2200; fax (301) 948-3730; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet <http://www.nist.gov/srm>.

APPENDIX A

Leachable Mass Fractions Using U.S. EPA and NJDEP Methods for Flame Atomic Absorption Spectrometry and Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry

To obtain total mass fractions, either subsamples of the SRM must be completely decomposed, or the sample must be analyzed directly in its solid form. For mixed acid dissolution, hydrofluoric acid must be included in the acid mixture to totally dissolve siliceous material present in sludge.

For a number of environmental monitoring purposes, acid extractable mass fractions of elements are often used rather than total mass fractions. Acid extractable methods do not necessarily result in total decomposition of the sludge. It should be noted that results obtained using acid leach conditions are often depicted in reports as total results. However, reported acid labile or extractable mass fractions of elements are generally lower than total mass fractions. Results are often presented as measured mass fractions in the leachate in comparison to the total or certified mass fractions. The recovery of an element as a percent of total is a function of several factors such as the mode of occurrence in the sample, leach medium, leach time, temperature conditions, and pH of the sample-leach medium mixture [7].

In its monitoring programs, the U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) has established a number of leach methods, such as Methods 3015, 3050, and 3051 [8,9] for the determination of acid labile or extractable mass fractions of elements. The New Jersey Department of the Environment (NJDEP) has developed its own leach method, NJDEP 100 for state use [10]. The NJDEP and the U.S. EPA prepared samples of SRM 2781 using the NJDEP 100 method and EPA Methods 3050 and 3051 and analyzed the resulting leachates by FAAS and ICP-AES.

Reference values have been established for the acid-leachable mass fractions of several elements in SRM 2781. These values are the means of all results from the different leach measurement methods and combinations used. The reference values are listed in Table A1, along with their uncertainties which are based on 95 % confidence intervals of the means of results. For some of the elements (copper, iron, silver, vanadium), no statistically significant differences were found among results from the two laboratories using three or four combinations of sample preparation and instrumental measurement techniques (NJDEP 100 - FAAS; NJDEP 100 - ICP-AES; EPA 3050 - ICP-AES; EPA 3051 - ICP-AES). For all other elements, statistically significant between-laboratory differences were identified and are included in the stated uncertainties. These differences are small in comparison to control limits for many environmental monitoring programs. Therefore, the reference values are meaningful, despite the between-laboratory differences found.

Reference Values: The reference values given in Table A1 are not NIST certified but are provided as a reference for U.S. EPA 3050 and 3051, and NJDEP 100 methods. The uncertainties are based on a 95 % confidence interval for the mean and include an allowance for differences between the analytical methods used.

$$\text{Leach Recovery (\%)} = 100 \times \frac{\text{Leach Value}}{\text{Certified or Reference Value}}$$

Table A1. Reference Leach Values for SRM 2781

Element	Leachable Mass Fraction (mg/kg)		Leach Recovery (%)
Aluminum (Al)	8040	± 980	50
Barium (Ba)	570	± 65	-- ^(a)
Cadmium (Cd)	11	± 2	86
Calcium (Ca)	36440	± 1830	93
Chromium (Cr)	143	± 14	71
Copper (Cu)	601	± 16	96
Iron (Fe)	24300	± 2100	87
Lead (Pb)	183	± 15	91
Magnesium (Mg)	4850	± 290	82
Manganese (Mn)	745	± 33	--
Nickel (Ni)	72.3	± 6.3	90
Silver (Ag)	86.3	± 1.7	88
Vanadium (V)	81.9	± 3.8	--
Zinc (Zn)	1120	± 34	88

^(a) -- indicates that a certified or reference total mass fraction value was not available for the element.

Cooperating Analysts and Laboratories:

S.J. Nagourney; New Jersey Department of the Environment, Trenton, NJ.
J. Birri, K. Peist; U.S. Environmental Protection Agency, Edison, NJ.

ANEXO B – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO MATERIAL DE REFERÊNCIA SRM

2782 – *Industrial Sludge*

National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 2782

Industrial Sludge

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in the evaluation of methods used for the analysis of sludges and other materials of a similar matrix. A unit of SRM 2782 consists of 70 g of dried, pulverized, and radiation sterilized industrial sludge.

Certified Mass Fraction Values: The certified values, expressed as mass fractions on a dry basis, for ten elements are reported in Table 1. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or accounted for by NIST [1]. The certified values in this SRM are based on either a single NIST primary method or on concordant results from NIST and two or more collaborating laboratories. A certified value is the present best estimate of the true value.

Reference Mass Fraction Values: Reference values, expressed as mass fractions on a dry basis, for 16 additional elements are reported in Table 2. A NIST reference value is a noncertified value that is the present best estimate of the true value; however, the value does not meet NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement reproducibility and may not include all sources of uncertainty or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods [1]. The reference values in this SRM are based on a combination of results from collaborating laboratories.

Information Mass Fraction Values: Information values are listed in Table 3. These values may be of interest to the SRM user and represent results from one or more collaborating laboratories. Insufficient information is available to adequately assess the uncertainty associated with these values [1].

Analytical methods used for the characterization of this SRM are given in Table 4. All values are reported as mass fractions [2], on a dry mass basis and are based on measurements using a sample mass of at least 100 mg.

Leachable Mass Fractions: Reference values for 14 acid-leachable mass fractions using U.S. Environmental Protection Agency (EPA) 3050, 3051, and New Jersey Department of the Environment (NJDEP) 100 methods are contained in Appendix A. These values are the means of all results supplied by cooperating EPA and NJDEP laboratories for the different leach and measurement methods used.

Expiration of Certification: The certification of SRM 2782 is valid, within the measurement uncertainty specified, until 1 October 2023, provided the SRM is handled and stored in accordance with instructions given in this certificate (See "Instructions for Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated or otherwise modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet or register online) will facilitate notification.

Statistical consultation was provided by L.M. Gill of the NIST Statistical Engineering Division.

Overall direction and coordination of the analyses were under the chairmanship of J.D. Fassett and G.C. Turk of the NIST Chemical Sciences Division.

Carlos A. Gonzalez, Chief
Chemical Sciences Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 20 September 2015
Certificate Revision History on Page 5

Robert L. Watters, Jr., Director
Office of Reference Materials

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

Source and Preparation of Material: The base material for SRM 2782 was obtained as effluence from an industrial site in northern New Jersey involved in pharmaceutical research and was collected before treatment with the assistance of the New Jersey Department of Environmental Protection. The base material was freeze dried at a commercial facility under contract to NIST, and transferred to the U.S. Geological Survey (USGS) in Denver, CO. At USGS the material was ball milled to pass a 75 μm (200 mesh) sieve and then blended into a single lot using a 0.2832 m^3 (10 ft^3) blender. The blended material was radiation sterilized and then bottled at USGS.

Analysis: The homogeneity was assessed at USGS on replicate samples of bulk material for over 40 elements using x-ray fluorescence (XRF) and/or inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). Homogeneity was further assessed during certification analysis with sample sizes of 100 mg or greater. No sample-to-sample variations in excess of those expected from the analytical measurements were detected.

Instructions for Use: A minimum sample mass of 100 mg (dry mass - see "Instructions for Drying") should be used and sample preparation procedures should be designed to effect complete dissolution for analytical determinations to be related to the certified values provided.

Instructions for Drying: When nonvolatile elements are to be determined, samples should be vacuum dried at room temperature for 24 h or oven dried for 2 h at 110 $^{\circ}\text{C}$. Volatile elements (e.g., arsenic, mercury, and selenium) should be determined on samples as received; separate samples should be dried according to these instructions to obtain a correction factor for moisture. Moisture corrections are then made to measurement values before comparing them to the certified values. [Note: The mass loss on drying at the time of certification was found to be in the range of 2.1 % to 3.2 % when using the recommended drying procedures.]

Certified Values and Uncertainties: The measurands are the total mass fractions of selected elements in industrial sludge. The certified values are metrologically traceable to the SI unit for mass. The certified values for Cd, Cu, Pb, Mo and Ni are based on a primary NIST method. The certified values for the remaining elements are the results from two or more independent analytical methods as described by Schiller and Eberhardt [3]. The uncertainty in the values certified by a NIST primary method is expressed as an expanded uncertainty, U , and is calculated according to the method described in the ISO Guide [4]. The expanded uncertainty is calculated as $U = k u_c$, where u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of uncertainty components associated with the measurement uncertainty and basis weight uncertainty. The coverage factor, k , is determined from the Student t -distribution corresponding to the appropriate associated degrees of freedom and 95 % confidence for each method. The uncertainty in the values certified from combined independent method data is calculated as, $U = k u_c + B$. The quantity, u_c , is the combined standard uncertainty calculated according to ISO Guide [4], which accounts for the combined effect of the within variance for all participating laboratories at one standard deviation. The bias adjustment, B , is for the difference between methods, which is the maximum difference between the certified value and the method means [3].

Table 1. Certified Concentrations for Selected Inorganic Constituents (Dry-Mass Basis)

Element	Mass Fraction (mg/kg)		
Arsenic	166	$\pm$	20
Cadmium	4.17	$\pm$	0.09
Chromium	109	$\pm$	6.0
Copper	2594	$\pm$	52
Lead	574	$\pm$	11
Mercury	1.10	$\pm$	0.19
Molybdenum	10.07	$\pm$	0.20
Nickel	154.1	$\pm$	3.1
Selenium	0.44	$\pm$	0.11
Zinc	1254	$\pm$	196

Reference Values and Uncertainties: The measurands are the mass fractions of selected elements in industrial sludge as determined by the methods indicated in Table 4. The reference values are metrologically traceable to the SI unit for mass. The reference values are the means of the results from two or more independent analytical methods. The uncertainty in the reference values is expressed as an expanded uncertainty, U , and is calculated according to the method described in the ISO *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* [4]. The expanded uncertainty is calculated as $U = k u_c$, where u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of between-laboratory and within-laboratory components of uncertainty. The coverage factor, k , is determined from the Student t -distribution corresponding the appropriate associated degrees of freedom and 95 % confidence for each element. As the accuracy of the measurements could not be assessed from the data, the uncertainty associated with a reference value may fail to include all sources of uncertainties and may represent only a measure of the precision of the measurement methods.

Table 2. Reference Concentrations for Selected Inorganic Constituents (Dry-Mass Basis)

Element	Mass Fraction (mg/kg)	Element	Mass Fraction (%)
Barium	254 ± 24	Aluminum	1.37 ± 0.09
Cerium	1240 ± 110	Calcium	0.67 ± 0.06
Cobalt	66.3 ± 4.8	Iron	26.9 ± 0.7
Gallium	35 ± 10	Magnesium	0.26 ± 0.02
Indium	238 ± 70	Phosphorus	0.50 ± 0.06
Lanthanum	58.1 ± 2.4	Potassium	0.32 ± 0.01
Silver	30.6 ± 4.7	Sodium	1.30 ± 0.05
Titanium	880 ± 90		
Vanadium	80 ± 10		

Information Values: Additional data from collaborating laboratories are provided as information to the SRM user. These values represent results from one laboratory, two or more laboratories that used non-independent methods, or from two or more laboratories using different methods with significant differences in their results [1]. Information values cannot be used to establish metrological traceability.

Table 3. Information Concentrations for Selected Inorganic Constituents (Dry-Mass Basis)

Element	Mass Fraction (mg/kg)	Element	Mass Fraction (%)
Antimony	2.0	Carbon	2.1
Europium	0.34	Silicon	20.3
Gold	2.2	Sulfur	0.2
Hafnium	0.77		
Lithium	5.0		
Manganese	300		
Rubidium	23		
Samarium	1.3		
Scandium	3.4		
Tantalum	0.73		
Terbium	0.48		
Thorium	2.4		
Uranium	8.3		
Ytterbium	0.74		
Yttrium	10		

Table 4. Methods Used for the Analysis of SRM 2782^(a)

Aluminum	ICP-AES, INAA, XRF	Mercury	CV-AAS, INAA
Antimony	INAA	Molybdenum	ICP-AES, ID-ICPMS , INAA, TXRF
Arsenic	HG-AAS, ICP-AES, INAA, TXRF	Nickel	ICP-AES, ID-ICPMS , INAA, TXRF
Barium	ICP-AES, INAA, TXRF	Phosphorus	ICP-AES, XRF
Cadmium	ID-ICPMS , INAA, TXRF	Potassium	ICP-AES, INAA, TXRF, XRF
Calcium	ICP-AES, TXRF, XRF	Rubidium	INAA, TXRF
Carbon	RF-CIR	Samarium	INAA
Cerium	ICP-AES, INAA, TXRF	Scandium	ICP-AES, INAA
Chromium	FAAS, ICP-AES, INAA, TXRF	Selenium	HG-AAS, INAA
Cobalt	ICP-AES, INAA	Silicon	XRF
Copper	ICP-AES, ID-ICPMS , INAA, TXRF	Silver	ICP-AES, INAA, TXRF
Europium	INAA	Sodium	ICP-AES, NAA, XRF
Gallium	ICP-AES, INAA	Sulfur	TXRF, RF-SIR
Gold	AAS, INAA	Tantalum	INAA
Hafnium	INAA	Terbium	INAA
Indium	INAA, TXRF	Thorium	INAA
Iron	ICP-AES, INAA, TXRF, XRF	Titanium	ICP-AES, XRF
Lanthanum	ICP-AES, INAA	Uranium	INAA
Lead	ICP-AES, ID-ICPMS , TXRF	Vanadium	ICP-AES, INAA
Lithium	ICP-AES	Yttrium	ICP-AES, TXRF
Magnesium	ICP-AES, XRF	Ytterbium	INAA
Manganese	ICP-AES, INAA, TXRF, XRF	Zinc	ICP-AES, ID-ICPMS, INAA, TXRF

^(a) Methods used for establishment of certified values are shown in bold-face type; methods used for reference and information values or to corroborate certified values are not in bold.

Methods

AAS	Atomic absorption spectrometry
FAAS	Flame atomic absorption spectrometry
RF-CIR	Resistance furnace with carbon infrared detector
RF-SIR	Resistance furnace with sulfur infrared detector
CV-AAS	Cold vapor atomic absorption spectrometry
HG-AAS	Hydride generation atomic absorption spectrometry
ICP-AES	Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry
ID-ICPMS	Isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry
INAA	Instrumental neutron activation analysis
TXRF	Total reflectance x-ray fluorescence
XRF	Wavelength dispersive x-ray fluorescence

NIST Analysts

E.S. Beary
M.S. Epstein
R. Saraswati

Cooperating Analysts and Laboratories:

S. Landsberger and D. Wu; University of Illinois, Nuclear Engineering Department, Champaign, IL.
S.A. Wilson, D. Siems, and P. Briggs; USGS, Lakewood, CO.
A. Prange, U. Reus, and R. Neidergesäß; GKSS Research Center, Institute of Physical and Chemical Analytics, Geesthacht, Germany.

REFERENCES

- [1] May, W.; Parris, R.; Beck II, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; Definition of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements; NIST Special Publication 260-136 (2000); available at <http://www.nist.gov/srm/upload/SP260-136.PDF> (accessed Aug 2015).
- [2] Thompson, A.; Taylor, B.N.; *Guide for the Use of the International System of Units (SI)*; NIST Special Publication 811; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2008); available at: <http://physics.nist.gov/cuu/pdf/sp811.pdf> (accessed Aug 2015).
- [3] Schiller, S.B. and Eberhardt, K.R., *Combining Data from Independent Analysis Methods*, Spectrochim. Acta, Vol 46B, pp. 1607–1613 (1991).
- [4] JCGM 100:2008; *Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (ISO GUM 1995 with Minor Corrections); Joint Committee for Guides in Metrology (2008); available at http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf (accessed Aug 2015); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://www.nist.gov/pml/pubs/tn1297/index.cfm> (accessed Aug 2015).
- [5] Federal Register SW-846 (1995); available at <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/frn.htm> (accessed Aug 2015).
- [6] New Jersey Administrative Code, 1994. N.J.A.C. 7:14-4.
- [7] Kane, J.S.; *Leach Data vs Total: Which is Relevant for SRMs*, Fresenius' J. Anal. Chem. Vol. 352: pp 209-213, (1995).

Certificate Revision History: 20 August 2015 (Change of expiration date; editorial changes); 09 September 2011 (Editorial changes); 10 December 1998 (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the Certificate of Analysis in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program: Telephone (301) 975-2200, Fax (301) 948-3730, e-mail srminfo@nist.gov, or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.

APPENDIX A

Leachable Mass Fractions Using U.S. EPA and NJDEP Methods

The U.S. EPA in its monitoring programs, has established a number of leach methods such as Methods [5] for the determination of acid labile or extractable mass fractions of elements. The New Jersey Department of the Environment (NJDEP) has developed its own leach method for state use [6]. The NJDEP and the U.S. EPA prepared samples of SRM 2782 using the NJDEP 100 method and EPA Methods 3050 and 3051 and analyzed the resulting leachates by FAAS, flame emission spectrometry (FES), and ICP-AES. Based upon these results, method dependent reference values have been developed for EPA 3050, 3051, and NJDEP 100 methods.

SRM 2782 has been certified for total mass fractions of constituent elements and thereby requires complete sample decomposition. However, for a number of environmental monitoring purposes, acid extractable mass fractions of elements are often used rather than total mass fractions. Acid extractable methods do not necessarily result in total decomposition of the sludge. It should be noted that results obtained using acid leach conditions are often depicted in reports as "total" results or total recoverable results. However, reported acid labile or extractable mass fractions of elements are generally lower than total mass fractions (see Table A1, Percentage Leach Recovery). Results are often presented as measured mass fractions in the leachate in comparison to the total or certified mass fractions. The recovery of an element as a percent of total is a function of several factors such as the mode of occurrence in the sample, leach medium, leach time, temperature conditions, and pH of the sample-leach medium mixture [7].

Reference Values and Uncertainties: Reference values have been established for the acid-leachable mass fractions of fourteen elements in SRM 2782. These values are the means of all results from the different leach and measurement methods used. Please note that because EPA method 3051 did not provide useable results for silver, its results were excluded. In addition, variation in arsenic, cadmium, and vanadium data prevented their use as reference values. The reference values given in Table 1 are not NIST certified but are provided as a reference for U.S. EPA 3050, 3051, and NJDEP 100 methods. The reference values along with their uncertainties are based on 95 % confidence intervals of the means of results. The uncertainties include within-laboratory and between-laboratory differences, which were significant for some elements.

Table A1. Mass Fractions Reference Concentrations Leach Values for SRM 2782

Element	Leachable Mass Fraction (mg/kg)		Leach Recovery ^(a) (%)
Aluminum ^(b,c)	1553	± 82	11
Barium ^(b,c)	152	± 11	60
Calcium ^(c,d)	4740	± 220	71
Chromium ^(b,c)	66.1	± 9.3	61
Cobalt ^(b,c)	54.5	± 4.6	82
Copper ^(b,c)	2435	± 47	94
Iron ^(b,c)	254 000	± 16 000	94
Lead ^(b,c,e)	554	± 36	97
Magnesium ^(b,c)	484	± 28	19
Manganese ^(b,c)	258	± 15	86
Nickel ^(b,c)	95.9	± 4.7	62
Potassium ^(b,c)	87	± 33	3
Sodium ^(b,c)	2620	± 330	20
Zinc ^(b,c)	1167	± 57	93

^(a) Percentage is calculated as leach value divided by certified (or non certified) value then multiplying it by one hundred.

^(b) FAAS.

^(c) ICP-AES.

^(d) FES.

^(e) Graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS).

Cooperating Analysts and Laboratories:

S.J. Nagourney, N. Tumillo; New Jersey Department of Environmental Protection, Trenton, NJ.
J. Birri, K. Peist; U.S. Environmental Protection Agency, Edison, NJ.