



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS  
E NUCLEARES

KATARINE MIZAN BARBOSA SANTOS

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA ACUMULAÇÃO DE CU E ZN EM *Littoraria  
angulifera***

Recife

2021

KATARINE MIZAN BARBOSA SANTOS

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA ACUMULAÇÃO DE CU E ZN EM *Littoraria angulifera***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio-Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

Recife

2021

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

- S237a Santos, Katarine Mizan Barbosa.  
Aspectos biológicos da acumulação de Cu e Zn em *Littoraria angulifera*. /  
Katarine Mizan Barbosa Santos. – 2021.  
94 f.: il.
- Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.  
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de  
Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2021.  
Inclui referências e apêndice.
1. Engenharia nuclear. 2. Bioacumulação. 3. Citotoxicidade. 4. Absorção  
atômica. 5. Hemolinfa. 6. *Littoraria angulifera*. I. França, Elvis Joacir de (orientador).  
II. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque (coorientadora).

621.48 CDD (22. ed.)

UFPE  
BCTG/2022-92

KATARINE MIZAN BARBOSA SANTOS

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA ACUMULAÇÃO DE CU E ZN EM *Littoraria angulifera***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio-Ambiente.

Aprovado em: 29/10/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. Thiago Oliveira dos Santos (Examinador Externo) Comissão Nacional de Energia Nuclear –  
CRCN/CNEN-NE

---

Dra. Hianna Arely Milca Fagundes Silva (Examinador Externo) Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Dra. Maíra de Vasconcelos Lima (Examinador Externo) Comissão Nacional de Energia Nuclear –  
CRCN/CNEN-NE

---

Dra. Julyanne Torres Bezerra de Mélo (Examinador Externo) Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico esse trabalho a minha filha, minha “Caramujinha” e ao meu companheiro de aventuras. Também a minha rede de apoio, meus familiares, principalmente a minha mãe, a meus colegas de laboratório e de trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e meu mentor espiritual pelo acolhimento e iluminação durante o processo de gerar e parir esse trabalho. Agradeço a toda minha família, especialmente a minha mãe por ser e estar comigo por toda a minha vida e especialmente durante as três cirurgias a que me submeti durante esse Doutorado. Ela foi o meu primeiro porto seguro e se faz assim até hoje, que eu siga seu exemplo e seja o porto seguro da minha filha. É a quem eu confio minha filha durante meus dias de trabalho, com a certeza de que será bem cuidada e muito amada. Robson, meu marido, meu companheiro, meu amor. Você foi meus braços quando eu não pude coletar caramujos de dois manguezais, quando grávida. Foi meu IC quando só eu conseguia extrair a hemolinfa dos caramujos e aprendeu para me ajudar. Foi meu orientador durante meus momentos de pressão e estresse. Você é o motivo pelo qual essa Tese saiu, muito obrigada pelo companheirismo, pelo apoio, pelo cuidado, zelo e amor. Obrigada por ser responsável pela metade da melhor coisa que já aconteceu na minha vida. Nossa Lua. Luazinha, você é Luz. É a inspiração da minha resiliência, meu incentivo a me tornar uma pessoa melhor, mesmo sem ter a menor ideia do que faz, muito obrigada. Ao pessoal do CRCN/NE, tantos passaram e tantos ficaram durante os 6 anos que estive lá, desde 2014, no mestrado a 2020. Vou agradecer nominalmente a alguns, mas lembrarei sempre de todos, pois me ensinaram tanto. Mariana Mari e Paulo Papito que a nossa amizade perdure e passe para a próxima geração, obrigada por todos os ensinamentos no âmbito profissional e pessoal. Julyanne July, Marcelo Tchelo, Crescêncio, Alesx e Ana Cláudia, obrigada por me ajudarem com análises, resultados e resolução de situações burocráticas, vocês foram os alicerces dessa tese e eu serei para sempre grata a vocês. Márcia, Dona Ana, Margarete, Fabiana, Gilberto, Quirino e Lindomar, obrigada pelas conversas durante as manhãs, nos almoços, confraternizações e coletas. Essas conversas me acolheram no CRCN/NE e eu me senti pertencendo àquele lugar que se tornou um lar para mim por tantos anos. Ednaldo, Ed, Rauana, Rau, Ian e Maíra, obrigada pelo companheirismo durante o preparo de amostras e reagentes e pelas palavras trocadas nos últimos anos, vocês foram meus guias por muitas vezes. Aos companheiros da Biofísica, vocês tornaram meus dias leves, nas saídas das sextas, nos cafés com molusco e no apoio para finalização desse trabalho, muito obrigada. Vou citar alguns muito especiais, que são minhas fontes de informações, são eles:

Hianna, Will, Luís, Dewson, Douglas, Vinícius e novamente Maíra obrigada por criarem, juntamente com a Profa. Ana, um ambiente exemplo, o lugar que gostaria de criar para meus alunos um que se estende à família, um que acolhe. Obrigada por me ensinar que ainda tenho muito o que aprender. Por fim e não menos importante aos meus orientadores. O Dr. Elvis e a Dra./Profa. Ana, vocês nunca mediram esforços para ajudar orientandos e eu espero ter aprendido da forma que esperavam. Vocês estavam lá, em meu casamento, chá de bebê, inclusive carregaram minha Lua no colo e posso afirmar de coração que foram uma extensão da minha família, muito obrigada, já sinto saudades da nossa convivência.

Obrigada as agências de fomento pelas concessões das verbas de pesquisa e especialmente obrigada a CNEN, que forneceu a bolsa que me proveu durante a realização desse doutorado.

## RESUMO

O molusco da espécie *Littoraria angulifera* é bioacumulador de Cu e Zn, esses elementos químicos essenciais, em excesso podem se tornar tóxicos ao organismo. Dessa forma nesse trabalho foram analisados os efeitos biológicos do excesso de Cu e Zn em *L. angulifera* por testes morfométricos, citotóxicos e genotóxicos bem como, esses foram quantificados em Sedimento em Suspensão de manguezais, Hemolinfa e órgãos da espécie por meio de técnicas analíticas nucleares. Por fim, foi realizado estudo de caso da bioacumulação desses elementos químicos na espécie estudada. Os manguezais em que as coletas ocorreram foram nos estados de Pernambuco (Barra de Catuama, Carne de Vaca, Maria Farinha e Rio Formoso) e da Paraíba (Barra de Camaratuba, Barra de Mamanguape, Pontinhas e Rio Abiaí). As técnicas analíticas utilizadas foram a Absorção Atômica em Forno de Grafite (para quantificação em hemolinfa) e Absorção Atômica por Chama (nos órgãos e Sedimento em Suspensão). Na análise da genotoxicidade fez-se o teste do micronúcleo. A citotoxicidade foi observada pelo ensaio cometa, porém foi aplicado nos animais do estudo de caso da Bioacumulação. Dos resultados encontrados destaca-se as elevadas concentrações de Cu e Zn nos órgãos e hemolinfa de animais de Pontinhas (PB) e de Maria Farinha (PE). Foram respectivamente nesses mesmos manguezais que no Sedimento em Suspensão altos valores de Zn e Cu, foram quantificados. Por isso, acredita-se que a disponibilidade e acumulação de Zn interferem no crescimento dos espécimes. Ao ser comparado aos demais locais estudados quanto a presença de células micronucleadas, os indivíduos de pontinhas apresentaram diferença significativa dos demais animais estudados do estado da Paraíba. Em todos os manguezais estudados a presença tanto de micronúcleo quanto de células binucleadas e apoptóticas demonstraram toxicidade elevada. Os animais machos e fêmeas são morfometricamente diferentes. No ensaio de bioacumulação foi observado que o dano ao DNA de *L. angulifera* pode estar relacionado ao excesso de Zn presente no manguezal e que o Sedimento em Suspensão é o estoque desse Zn acumulado pela espécie.

**Palavras-chave:** bioacumulação; citotoxicidade; absorção atômica; hemolinfa; *Littoraria angulifera*.

## ABSTRACT

The mollusk of the species *Littoraria angulifera* bioaccumulates Cu and Zn, these essential chemical elements, in excess can become toxic to the organism. Thus, in this work, the biological effects of excess Cu and Zn in *L. angulifera* were analyzed by morphometric, cytotoxic and genotoxic tests, as well as these were quantified in suspended sediment of mangroves, hemolymph and organs of the species through nuclear analytical techniques. Finally, a case study of the bioaccumulation of these chemical elements in the studied species was carried out. The mangroves in which collections took place were in the states of Pernambuco (Barra de Catuama, Carne de Vaca, Maria Farinha and Rio Formoso) and Paraíba (Barra de Camaratuba, Barra de Mamanguape, Pontinhas and Rio Abiaí). The analytical techniques used were Graphite Furnace Atomic Absorption (for quantification in hemolymph) and Flame Atomic Absorption (in organs and suspended sediment). In the analysis of genotoxicity, the micronucleus test was performed. Cytotoxicity was observed by the comet assay, but it was applied to the animals of the Bioaccumulation case study. From the results found, the high concentrations of Cu and Zn in the organs and hemolymph of animals from Pontinhas (PB) and Maria Farinha (PE) stand out. It was in these same mangroves that in the suspended sediment, high values of Zn and Cu were quantified. Therefore, it is believed that the availability and accumulation of Zn interfere with the specimens' growth. When compared to the other places studied in terms of the presence of micronucleated cells, the tipped individuals showed a significant difference from the other animals studied in the state of Paraíba. In all mangroves studied, the presence of both micronucleus and binucleate and apoptotic cells showed high toxicity. Male and female animals are morphometrically different. In the bioaccumulation assay it was observed that the damage to the DNA of *L. angulifera* may be related to the excess of Zn present in the mangrove and that the suspended sediment is the stock of this Zn accumulated by the species.

**Keywords:** bioaccumulation; cytotoxicity; atomic absorption; hemolymph; *Littoraria angulifera*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sistema Biológico dos Elementos	20
Figura 2 - Esquema de funcionamento de Espectrômetro de Absorção Atômica	22
Figura 3 - Representação frontal de caramujo do gênero <i>Littoraria</i>	24
Figura 4 - Morfologia de parte mole de macho da espécie <i>Littoraria angulifera</i>	24
Figura 5 - Processo de formação de célula micronucleada.	34
Figura 6 - Ilustração do dano que produz os fragmentos de DNA observados no Teste do cometa.	35
Figura 7 - Mapa da área de estudo com os locais de coleta nos estados da Paraíba e Pernambuco	38
Figura 8 - Extração de Hemolinfa em <i>L. angulifera</i> para montagem de lâmina de microscopia	40
Figura 9 - Equipamento GFAAS modelo 240 Zeeman com Forno de Grafite GTA120.	41
Figura 10 - Estruturas dissecadas do caramujo <i>Littoraria angulifera</i> para análise dos elementos químicos Cu e Zn	42
Figura 11 - Equipamentos utilizados para separação de alíquota e digestão das amostras de caramujo <i>Littoraria angulifera</i> .	42
Figura 12 - Etapas de preparação para análise das amostras de Sedimento em Suspensão.	44
Figura 13 - Equipamento SpectrAA 220 da Varian/Agilent.	45
Figura 14 - Etapas do Ensaio de Bioacumulação de Cu e Zn no manguezal do Espaço Ciência no caramujo <i>L. angulifera</i>	48
Figura 15 - Imagens dos danos celulares encontrados nas células analisadas.	53
Figura 16 - Intervalo de confiança de Wilson a 95% de confiança dos danos citotóxicos observados nos espécimes dos manguezais da Paraíba-PB.	58
Figura 17 - Intervalo de confiança de Wilson a 95% de confiança dos danos observados nos espécimes dos manguezais da Paraíba-PE.	59
Figura 18 - Dendograma das cargas fatoriais para os órgãos de <i>Littoraria angulifera</i> : Demais componentes da massa visceral (DCMV), Glândula deigestiva (GD) e Pênis (P).	66
Figura 19 - Dendograma das cargas fatoriais dos manguezais da Paraíba Barra de Camaratuba (BC), Barra de Mamanguape (BM), Rio Abiaí (RA) e Pontinhas (PO) e de Pernambuco Barra de Catuama (BT), Carne de Vaca (CV), Maria Farinha (MF) e Rio Formoso (RF).	67
Figura 20 - Concentrações médias (mg.kg <sup>-1</sup> ) de Cu e Zn de sedimentos em suspensão em função dos manguezais da Paraíba e de Pernambuco analisados.	69
Figura 21 - Histograma do teste de normalidade Shapiro Wilk agrupados por gênero de cada variável dependente analisada nos animais de PE e PB.	73

Figura 22 -	Matriz de correlação de Serman relacionando Cu e Zn com órgãos, hemolinfa, micronúcleo, binucleação e apoptose em células de <i>Littoraria angulifera</i> .	76
Figura 23 -	Distribuição dos cometas em Frequência e Índice de Dano causadas pela exposição dos hemócitos de <i>Littoraria angulifera</i> em manguezal antropizado. As categorias estão indicadas pelos números e sombreamento, a partir do branco (categoria 0) até a cor cinza escuro (categoria 4).	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Equipamento digestor utilizado e técnicas analíticas aplicadas para quantificação de elementos químicos em matrizes líquidas	31
Tabela 2 - Frações de massa obtida em mg.kg <sup>-1</sup> de elementos químicos acumulados em Sedimento em Suspensão e em gastrópodes de manguezal no Rio Beberibe	32
Tabela 3 - Frações de massa obtida em mg.kg <sup>-1</sup> de elementos químicos acumulados em Sedimento em suspensão e em gastrópodes de manguezal Rio Ipojuca	33
Tabela 4 - Frequência de micronúcleos em hemócitos observadas em trabalhos de monitoração ambiental.	34
Tabela 5 - Localização das coletas em Pernambuco e na Paraíba e a identificação de altas e baixas concentrações dos elementos químicos.	37
Tabela 6 - Concentração de Cu e Zn em <i>Littoraria angulifera</i> de manguezal da Paraíba - Rio Abiaí e de Pernambuco – Memorial Arcoverde e Espaço Ciência.	47
Tabela 7 - Valores obtidos e certificados (mg.kg <sup>-1</sup> ), incertezas analíticas expandidas para 95% de confiança e valores de Número En para os materiais de referência analisados por FAAS	52
Tabela 8 - Frequência de alterações celulares como: micronúcleo, binucleação e apoptose nos hemócitos de <i>Littoraria angulifera</i> de manguezais dos estados da Paraíba e Pernambuco.	54
Tabela 9 - Resultados do intervalo de confiança em nível de 95% de confiança (IC95%), para as variáveis micronúcleo – MN, binucleação – BN e apoptose – AP de Manguezais de PB e PE.	57
Tabela 10 - Concentrações médias dos elementos químicos em mg.kg <sup>-1</sup> , número de amostras (n) e incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança (em %) da hemolinfa de caramujos <i>Littoraria angulifera</i> de manguezais da Paraíba – PB (Barra de Camaratuba- BC, Barra de Mamanguape – BM, Pontinhas – PO e Rio Abiaí – RA) e Pernambuco – PE (Barra de Catuama – BT, Carne de Vaca – CV, Maria Farinha – MF e Rio Formoso – RF).	60
Tabela 11 - Estatística descritiva estratificada das concentrações de Cu e Zn em mg.kg <sup>-1</sup> nos órgãos Glândula Digestiva – GD e Demais Componentes da Massa Visceral - DCMV de <i>Littoraria angulifera</i> nos manguezais estudados do estado de Pernambuco e da Paraíba.	63
Tabela 12 - Estatística estratificada das concentrações médias de Cu e Zn em mg.kg <sup>-1</sup> no Pênis - P de <i>Littoraria angulifera</i> nos manguezais estudados do estado de Pernambuco e da Paraíba.	65

Tabela 13 -	Concentração de Cu e Zn em Sedimento em Suspensão nos manguezais da Paraíba e Pernambuco estudados.	68
Tabela 14 -	Estatística descritiva estratificada por Estado, Local e Gênero das variáveis morfométricas utilizadas em <i>Littoraria angulifera</i> , Comprimento, Largura e Massa.	71
Tabela 15 -	Teste de Tukey para as variáveis massa e comprimento de conchas de caramujos <i>Littoraria angulifera</i> da Paraíba	75
Tabela 16 -	Concentração de Cu e Zn em corpo e avaliação de dano genético em hemócitos de <i>Littoraria angulifera</i> durante ensaio de bioacumulação de 226 dias.	77
Tabela 17 -	Valores de Cu e Zn em sedimento em suspensão nos manguezais do Rio Abiaí e no Espaço ciência.	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Apoptose
BC	Barra de Camaratuba
BM	Barra de Mamanguape
BN	Binucleação
BT	Barra de Catuama
CV	Carne de Vaca
DCMV	Demais Componentes da Massa Visceral
EC	Espaço Ciência
FAAS	Absorção Atômica por Chama
FD	Frequência de Dano
GD	Glândula Digestiva
GFAAS	Absorção Atômica por Forno de Grafite
ID	Índice de Dano
MF	Maria Farinha
MN	Micronúcleo
P	Pênis
PO	Pontinhas
RA	Rio Abiaí
RF	Rio Formoso
SS	Sedimento em Suspensão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>20</b>
2.1	ELEMENTOS QUÍMICOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS	20
2.2	TÉCNICAS ANALÍTICAS	21
<b>2.2.1</b>	<b>Espectrometria de Absorção Atômica</b>	<b>22</b>
2.3	ASPECTOS BIOLÓGICOS DE MOLUSCOS DA FAMÍLIA LITTORINIDAE	23
2.4	IMPACTOS AMBIENTAIS EM MOLUSCOS DA FAMÍLIA LITTORINIDAE E SEU USO COMO BIOINDICADOR/BIOMONITOR DE QUALIDADE AMBIENTAL	26
2.5	ESTUDOS DE MONITORAÇÃO AMBIENTAL ENVOLVENDO CONCENTRAÇÕES DE ELEMENTOS QUÍMICOS EM ÓRGÃOS DE INVERTEBRADOS	28
2.6	ELEMENTOS QUÍMICOS EM MATRIZES LÍQUIDAS	30
2.7	A MATRIZ SEDIMENTO EM SUSPENSÃO EM ESTUDOS AMBIENTAIS ENVOLVENDO ACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS	31
2.8	A MATRIZ HEMOLINFA EM ESTUDOS AMBIENTAIS ENVOLVENDO TESTES GENOTÓXICOS E CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS	33
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.1	ÁREA DE ESTUDO	37
3.2	AMOSTRAGEM DE CARAMUJOS DA ESPÉCIE <i>LITTORARIA</i> <i>ANGULIFERA</i> , DE SEDIMENTO EM SUSPENSÃO E MORFOMETRIA	38
3.3	ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE: TESTE DO MICRONÚCLEO E ENSAIO COMETA EM HEMOLINFA DE <i>L. angulifera</i>	39
3.4	ANÁLISE DA HEMOLINFA PELA TÉCNICA DE ABSORÇÃO ATÔMICA POR FORNO DE GRAFITE – GFAAS	40
3.5	DISSECAÇÃO E PRÉ-DIGESTÃO DAS AMOSTRAS DE ÓRGÃOS DE <i>L. ANGULIFERA</i>	41

3.6	COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO EM SUSPENSÃO	43
3.7	ANÁLISES PELA TÉCNICA DA ABSORÇÃO ATÔMICA POR CHAMA – FAAS	44
3.8	CONTROLE DA QUALIDADE DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	45
3.9	ÁREA DE ESTUDO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO DE CASO DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE CU E ZN NO MANGUEZAL DO ESPAÇO CIÊNCIA	46
3.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
<b>3.10.1</b>	<b>Genotoxicidade em <i>Littoraria angulifera</i> de diferentes manguezais</b>	<b>49</b>
<b>3.10.2</b>	<b>Cobre e Zinco em Sedimento em Suspensão, Órgãos e Hemolinfa de <i>Littoraria angulifera</i></b>	<b>50</b>
<b>3.10.3</b>	<b>Análise morfométrica dos espécimes coletados nos manguezais de Pernambuco e Paraíba</b>	<b>50</b>
<b>3.10.4</b>	<b>Correlação entre Cu e Zn e genotoxicidade em hemolinfa</b>	<b>51</b>
<b>3.10.5</b>	<b>Mutagenicidade pelo teste cometa no ensaio da contaminação de Cu e Zn.</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
4.1	QUALIDADE DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO	52
4.2	GENOTOXICIDADE DE CARAMUJOS DA ESPÉCIE <i>LITTORARIA ANGULIFERA</i> EM MANGUEZAIS DA PARAÍBA E PERNAMBUCO	53
4.3	CONCENTRAÇÕES DE CU E ZN EM HEMOLINFA DE CARAMUJOS <i>LITTORARIA ANGULIFERA</i> COLETADOS EM MANGUEZAIS DA PARAÍBA E PERNAMBUCO	60
4.4	CONCENTRAÇÕES DOS ELEMENTOS QUÍMICOS CU E ZN EM ÓRGÃOS DE <i>LITTORARIA ANGULIFERA</i> DE MANGUEZAIS DA PARAÍBA E PERNAMBUCO	62
4.5	SEDIMENTO EM SUSPENSÃO (SS) EM ESTUÁRIOS DOS MANGUEZAIS DA PARAÍBA E DE PERNAMBUCO	68

4.6	MORFOMETRIA DE MACHOS E FÊMEAS NOS MANGUEZAIS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA	70
4.7	CORRELAÇÃO ENTRE TESTES GENOTÓXICOS E CONCENTRAÇÃO DE CU E ZN EM CARAMUJOS <i>LITTORARIA ANGULIFERA</i>	75
4.8	ESTUDO DE CASO: CONTAMINAÇÃO DE CU E ZN EM CARAMUJOS <i>LITTORARIA ANGULIFERA</i> DO RIO ABIAÍ INTRODUZIDOS NO MANGUEZAL DO ESPAÇO CIÊNCIA	76
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>82</b>
	<b>APÊNDICE A – DIÁRIO DE CAMPO</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em trabalhos de análises ambientais de ecossistemas costeiros, espécies são utilizadas como bioindicadoras e/ ou biomonitoras devido a sua sensibilidade a poluentes e elementos químicos diversos, resultantes da interferência antrópica nesses ecossistemas. Essa elevada concentração de elementos químicos tem consequências para as espécies, podendo interferir em sua capacidade reprodutiva e resultar na extinção da população no ambiente (MERTZ, 2012). Assim, diversos estudos têm sido realizados, buscando compreender as consequências da bioacumulação de elementos químicos em órgãos e sistemas de animais, dentro do ambiente em que se encontram (PINHEIRO et al., 2013; GEREMIA 2015; SANTOS, 2016).

No ecossistema de manguezal, pouco é conhecido da capacidade de bioacumulação das espécies e as consequências desse fenômeno para os organismos acumuladores. Alguns dos poucos estudos realizados com essa temática foram desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa do Serviço de Monitoração Ambiental do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (SEAMB CRCN/NE), onde foi observado que a espécie *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822), presente em manguezais pernambucanos, possui tendência a bioacumular Cu e Zn (MÉLO, 2014, MÉLO, 2019) principalmente na glândula digestiva (SANTOS, 2016). Esses elementos químicos são essenciais para o metabolismo de alguns moluscos. O Cu está diretamente ligado à troca de gases em animais com sangue azul, enquanto o Zn está associado ao sistema imune (GIBSON et al., 2016). Contudo, pouco é conhecido sobre uma possível relação de genotoxicidade desses elementos químicos na espécie, nem quais seriam os valores de referência basais para Cu e Zn, devido à inviabilidade de sua criação em cativeiro (DAVID, 2019).

Em estudo de França et al. (2017) sobre o fluxo de Zn no parque Memorial Arcoverde com as matrizes ar, folhas, solo, Sedimento em Suspensão e animais como caramujos *L. angulifera* e *Melampus coffea*, foi observado que os animais endêmicos e o sedimento em suspensão foram os que mais concentraram Zn. Os Sedimentos em Suspensão são apontados como os grandes responsáveis pela exportação de matéria orgânica para os estuários (FRANÇA et al., 2010), e o seu estudo permite compreender o fluxo de elementos químicos em sistemas ecológicos,

assim como verificar a disponibilidade desses elementos resultantes de impactos antropogênicos nesse ambiente (MONTEIRO et al., 2004; SILVA et al., 2018; LI et al., 2019). Devido à grande influência da água estuarina sobre os moluscos desse ecossistema, e, conseqüentemente, do Sedimento em Suspensão, analisar as concentrações de elementos químicos nesta matriz pode auxiliar na compreensão da origem do Cu e Zn acumulados nos tecidos dos caramujos que habitam esses locais.

Os Caramujos *L. angulifera* são estudados no Nordeste do Brasil e, recentemente, estudos morfométricos estão sendo publicados, tentando traçar um perfil ecológico desses animais (TANAKA et al., 2006; DAVID 2019, ZEIDAN et al., 2020), onde o tamanho da concha tem sido relacionado ao impacto ambiental. No entanto, não foi encontrado na literatura científica dados relacionando essas variáveis aos caramujos encontrados em manguezais de Pernambuco e da Paraíba.

Visando preencher as lacunas existentes, este trabalho tem como objetivo geral analisar os efeitos genotóxicos da bioacumulação de Cu e Zn na hemolinfa de moluscos *Littoraria angulifera*, bem como avaliar a morfometria dos moluscos e a concentração desses elementos químicos em Sedimento em Suspensão de manguezais de Pernambuco e da Paraíba, além de compreender o processo de acumulação de Cu e Zn nesses animais.

Tendo como objetivos específicos:

- Analisar a concentração de Cu e Zn em hemolinfa de *L. angulifera* residentes nos manguezais Barra de Camaratuba, Barra de Mamanguape, Pontinhas e Rio Abiaí na Paraíba e Barra de Catuama, Carne de Vaca, Maria Farinha e Rio Formoso em Pernambuco;
- Determinar o efeito da pressão antrópica da acumulação de Cu e Zn em *L. angulifera*, utilizando teste do micronúcleo e estudo de citotoxicidade;
- Quantificar Cu e Zn na glândula digestiva (GD), pênis (P) e nos demais componentes da massa visceral (DCMV) de *L. angulifera* de diferentes Manguezais nos estados da Paraíba e Pernambuco;
- Quantificar Cu e Zn em Sedimento em Suspensão dos manguezais estudados e comparar com a concentração encontrada nos órgãos dos animais;
- Estabelecer relação morfométrica entre a *L. angulifera* quanto ao seu gênero e ao manguezal a que pertence,

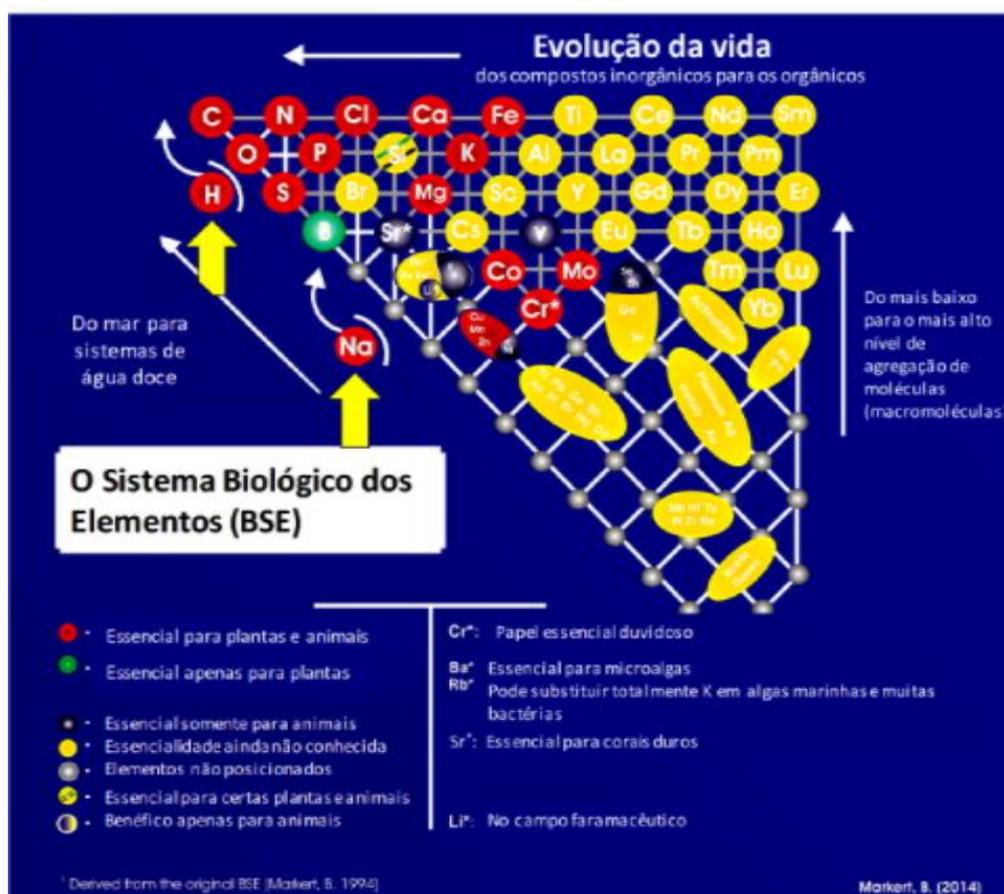
- Apresentar relação de contaminação de Cu e Zn em *L. angulifera* transferidos do manguezal do Rio Abiaí – PB para o manguezal do Espaço Ciência – PE (impactado antropicamente), com análises temporais da população por meio da quantificação desses elementos químicos em diferentes órgãos desses animais, concomitantemente com o teste de genotoxicidade, Ensaio cometa e sedimento em suspensão do manguezal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ELEMENTOS QUÍMICOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS

Os elementos químicos, de modo geral, exercem um relevante papel no desenvolvimento dos organismos vivos (FRÄNZLE; MARKERT, 2000). O Sistema Biológico dos Elementos (SBE) criado por Fränzele e Markert (2000) foi baseado nas correlações entre os elementos químicos e fatores evolutivos para determinar o diagrama da Figura 1.

Figura 1 – Sistema Biológico dos Elementos



Fonte: Adaptado de Markert (2014)

Segundo o SBE, elementos químicos como Sn, F, I, Ni, Se e V são essenciais apenas para as funções vitais dos animais (FRÄNZLE; MARKERT, 2000). Contudo, nem todos os elementos químicos encontram-se posicionados no SBE como ocorre para Cu, Mn, Zn, Ni, F, I, Se e Sn (nutrientes), além de As, Hg, Cd, Pb e Sb,

considerados tóxicos. Como é possível observar na Figura 1, Na e H não foram considerados fixos no sistema devido às suas características eletrolíticas.

Como consequência da interação entre os elementos químicos e os organismos, as concentrações nos tecidos podem estar em níveis acima dos estabelecidos como saudável para as espécies (MERTZ, 2012). Dentre os organismos utilizados em estudos que relacionam a disponibilidade de um elemento químico no ambiente e sua acumulação, encontram-se os gastrópodes, cuja utilização para a detecção de contaminação por metais traço em ambientes é justificada por suas especificidades como hemolinfa, tecido com a função de sangue e linfa, corpo envolto em membrana semi-permeável, com movimento que possibilita sua interação com o ambiente, e a circulação aberta, que permite a interação da hemolinfa com todo seu organismo (DALLINGER et al., 2001; OEHLMANN; OEHLMANN, 2003).

Assim, a quantificação dos elementos químicos no organismo como um todo ou nos tecidos separadamente é bastante utilizada em estudos de monitoração ambiental, visando à identificação de fontes de contaminação e os mecanismos de sequestro em que a concentração final de um metal no corpo do gastrópode, por exemplo, é provavelmente o resultado de um processo de acumulação que envolve a absorção, o armazenamento e a eliminação (DALLINGER, 1994).

Para a quantificação dos elementos químicos nas diferentes matrizes é necessário utilizar técnicas analíticas com qualidade atestada.

## 2.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Diferentes pesquisas têm empregado métodos analíticos como a Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia – EDXRF, a Espectrometria de Absorção Atômica – AAS e a Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente – ICP-MS. Neste trabalho foram utilizadas duas técnicas de Espectrometria de Absorção Atômica, por Chama (FAAS) e por grafite (GFAAS), devido à disponibilidade do equipamento e especificidade na aferição dos elementos cobre e zinco, pesquisados neste trabalho.

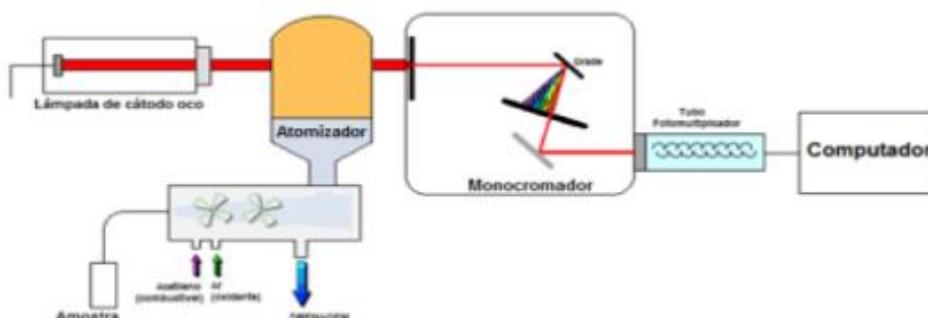
### 2.2.1 Espectrometria de Absorção Atômica

Esta técnica é muito utilizada na quantificação de elementos químicos em matrizes biológicas, ambientais e geológicas. Baseia-se na absorbância, a propriedade que os átomos possuem de absorver energia quando estão no estado fundamental. Para serem analisadas, as amostras devem passar por tratamento químico por meio de solubilização ácida dos elementos químicos presentes na amostra (WELZ; SPERLING, 1999).

As medições são realizadas após a obtenção de curvas analíticas a partir de soluções-padrão dos analitos. O controle da qualidade do procedimento analítico é realizado por meio de soluções de materiais de referência certificados, solubilizadas a partir da mesma metodologia aplicada às amostras (WELZ; SPERLING, 1999).

O processo de quantificação dos elementos químicos por essa técnica segue o esquema representado na Figura 2. A amostra solubilizada no queimador é atomizada, os átomos gasosos interagem com a radiação produzida pela lâmpada de cátodo oco produzida com o elemento químico de interesse e, assim, a medição da absorbância permite a determinação da concentração do elemento químico investigado. O conjunto de monocromador, detector e registrador finalizam o processo da leitura (KRUG et al., 2004).

Figura 2 – Esquema de funcionamento de Espectrômetro de Absorção Atômica.



Fonte: Mélo (2014)

Os atomizadores são os responsáveis pela transformação das soluções das amostras em espécies gasosas que serão quantificadas pelo equipamento, possibilitando a determinação da concentração do analito. Os sistemas de atomização são por chama (FAAS), em tubo aquecido acoplado a um gerador de hidretos (HGAAS), por meio da geração de vapor a frio (CVAAS) ou em forno de

grafite (GFAAS). Essa técnica permite a quantificação de elementos químicos na ordem de  $\text{mg.kg}^{-1}$  (FAAS) a  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (GFAAS) dependendo do atomizador que precede o equipamento (SKOOG, 2002; BARBOSA SANTOS, 2016; MÉLO, 2019<sup>(4)</sup>).

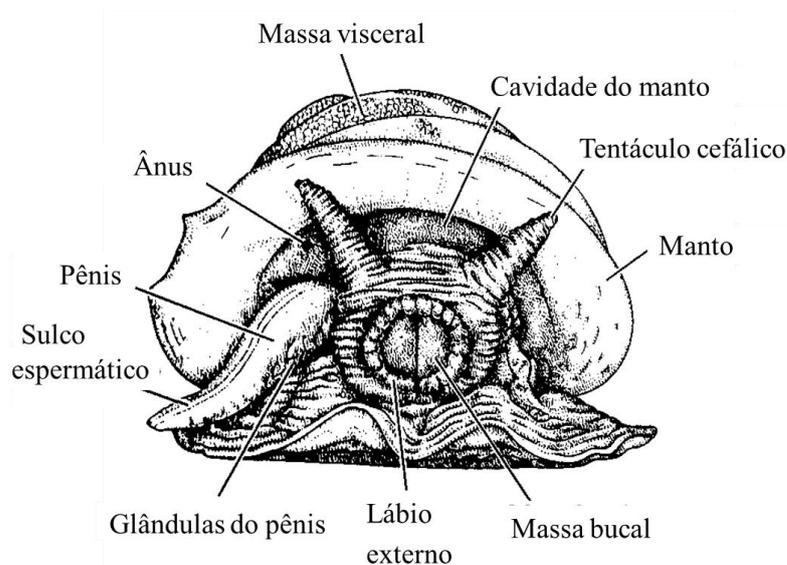
### 2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE MOLUSCOS DA FAMÍLIA LITTORINIDAE

Segundo o Registro Mundial de Espécies Marinhas (*World Register of Marine Species*) – WORMS (2021), encontra-se inserido no Reino Animalia, filo Mollusca, classe Gastrópoda, subclasse Caenogastropoda, ordem Littorinomorfa, superfamília Littorinoidea família Littorinidae subfamília Littorininae o gênero *Littoraria*. Este apresenta 42 espécies, todas marinhas, filogeneticamente, foram descrito por Reid (2010) e o ancestral comum mais próximo da espécie data do período Oligoceno (cerca de 23 a 34 milhões de anos atrás). É possível encontrar na literatura mais antiga, espécies do atual gênero *Littoraria* inseridas no antigo gênero *Littorina*. A reclassificação taxonômica aconteceu em decorrência de estudos gênicos observarem uma diversificação maior do que a esperada para espécies dos gêneros *Littoraria* e *Littorina* (JANSON, 1985). O gênero *Littoraria* pode ser observado desde o litoral do Atlântico Oriental até o Atlântico Ocidental (REID, 1989).

Esses gastrópodes apresentam concha espiralada em formato cônico com abertura em formato de ova e com coloração da concha variando de laranja a marrom. Os adultos de algumas espécies chegam a medir 30 mm (MATTHEWS-CASCON; DA CRUZ LOTUFO, 2006). É característico do gênero o fato dos olhos serem localizados na base do tentáculo cefálico, além de não apresentarem dimorfismo sexual. Contudo, é possível observar o pênis do macho, localizado ao lado direito da cabeça, próximo ao tentáculo cefálico e posicionado anteriormente ao ânus, conforme mostrado na Figura 3. Nas fêmeas, na região onde se encontra o pênis do macho, é possível observar o poro genital (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

A reprodução desse gênero é semelhante aos demais gêneros da família Littorinidae, apresentando fecundação interna com desenvolvimento larval completo. Os representantes do gênero são ovovivíparos incompletos, retendo os ovos até o estágio véliger, liberando-os durante a maré alta (GALLAGHER; REID, 1974; WARD, 1990).

Figura 3 – Representação frontal de caramujo do gênero *Littoraria*.



Fonte: Brusca e Brusca (2007).

A espécie *Littoraria angulifera* tem a morfologia semelhante aos demais representantes do gênero *Littoraria*, como pode ser observado na Figura 4. Contudo, apresenta brânquia pouco desenvolvida e muito vascularizada, permitindo uma maior absorção de ar e baixa resistência, quando submerso (GUTIERREZ, 1988).

Figura 4 – Morfologia de parte mole de macho da espécie *Littoraria angulifera*.



Fonte: AUTORA (2021)

Segundo Lenderking (1953), em revisão bibliográfica sobre *L. angulifera*, a maturidade sexual da espécie é atingida em cerca de dois anos, com um tamanho de aproximadamente 15 mm. Os adultos em idade fértil têm tamanho entre 15 mm e 26 mm e copulam durante período chuvoso. Os espermatozoides são expelidos por

espermatóforos e o pico das desovas no período chuvoso ocorre em intervalos de um mês. As larvas são lançadas sucessivamente, atingindo cerca de 760 unidades por fêmea no período reprodutivo. O autor também apontou que a mesma fêmea não reproduz em períodos reprodutivos seguidos, sugerindo que essa fêmea realize a ovoposição sete a oito vezes por ano, o que é determinado pelo grau de precipitação na área estudada. Em espécimes cultivados em laboratório, foi observado que as fases larvais de *L. angulifera* não ultrapassavam o estágio de véliger. Contudo, permaneciam vivos por três semanas. Os pênis dos jovens são transparentes, brancos e pequenos. Quando adquirem a maturidade, o órgão aumenta de tamanho e apresenta uma coloração amarelada, porém após o acasalamento o órgão sofre depleção, reduzindo seu tamanho. As fêmeas adultas também sofrem repleção após o período reprodutivo e, durante esse período, o aparelho reprodutor se assemelha ao do macho (oviduto inchado e coloração amarelada). A taxa de crescimento de caramujos jovens é rápida até atingir cerca de 8 a 10 mm, desacelerando abruptamente até atingir um tamanho de 14 mm. Mesmo com um ritmo desacelerado, o animal cresce durante toda a vida.

Exemplares de *L. angulifera* podem ser observados nas árvores de mangue *Rhizophora mangle*, *Avicenia* sp. E *Laguncularia racemosa* (REID, 1985). Entre os principais predadores de *L. angulifera*, estão os crustáceos, os peixes e as aves e como principais parasitas, têm-se algumas larvas de moscas (REID, 1985).

Alimentam-se, principalmente, de fungos e líquens (KOHLMEYER; BEBOUT, 1986), grupos propensos à acumulação de elementos químicos em suas estruturas. Sua ingestão pode gerar aumento na concentração de substâncias químicas nos organismos (KOHLMEYER; BEBOUT, 1986). Por pescadores sugerirem sua utilização entre caiçaras como alimento, a contaminação do espécime pode prejudicar não apenas indiretamente (principalmente pelo consumo de peixes e crustáceos), mas também de forma direta ao homem. De acordo com Andrade e Solferini (2006), a rádula de alguns organismos pode apresentar alterações morfológicas, levando à hipótese de que esse grupo pode apresentar fontes alimentares diferentes dependendo da disponibilidade de alimentos no ambiente.

Segundo Chaves (2002), os animais apresentam uma maior afinidade por regiões mais salinas dos manguezais, onde é possível encontrar maior abundância de espécimes de maior tamanho. Quanto à osmolalidade da hemolinfa, Phillip (2014) observou uma tendência dessa variável aumentar em altas temperaturas e baixas

umidades relativas, dando a entender que a espécie apresenta alguma forma de regulação com relação às frequentes pressões ambientais.

A hemolinfa desses invertebrados possui as características do sangue e linfa dos vertebrados e apresentam as mais diversas cores, como ocorre para alguns insetos, que podem apresentar a coloração verde, devido presença de  $\beta$ -caroteno-proteínas (cor amarela) com um pigmento azul (HACKMAN, 1952). Em outros grupos de invertebrados, a proteína carreadora de oxigênio é a responsável pela coloração da hemolinfa do animal. Quando essas proteínas apresentam ferro em sua composição (hemoglobina e hemeritina), a hemolinfa tende a apresentar uma coloração vermelha. Ao apresentar cobre em sua composição (hemocianina), a coloração da hemolinfa é azul (VAN HOLDE et al., 2001).

Quanto à composição celular, a hemolinfa é formada por hemócitos do tipo hialinócitos (células sem granulações) e granulócitos (células maiores que os hialinócitos dotadas de grânulos). Dentre as funções da hemolinfa e dos hemócitos, estão a capacidade de realizar fagocitose, encapsulamento de invasores, cicatrização, digestão e transporte de nutrientes, além de participar nos processos de reprodução, excreção, formação de conchas e resposta a estresse ambiental (CHANG et al., 2005).

#### 2.4 IMPACTOS AMBIENTAIS EM MOLUSCOS DA FAMÍLIA LITTORINIDAE E SEU USO COMO BIOINDICADOR/BIOMONITOR DE QUALIDADE AMBIENTAL

Segundo Bryan et al. (1986), em estudo no Estuário de Fall, em Cornwall, Inglaterra, a concentração de elementos químicos na espécie de caramujo *Littorina littorea* pode estar relacionada, indiretamente, com a presença de elementos químicos na água. Em seus experimentos, o potencial bioacumulador da espécie foi observado após serem transferidos para um ambiente mais impactado, resultando no aumento das concentrações de arsênio (As), cobalto (Co), cobre (Cu) e zinco (Zn) nos organismos após 2 meses de exposição. Os autores também analisaram a alga, *Fucus vesiculosus*, para inferir a contaminação aquática do estuário e, ao relacionar os resultados obtidos com a concentração de elementos químicos no caramujo, observaram a potencial capacidade biomonitora da espécie *L. littorea* para prata

(Ag), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e, possivelmente, arsênio (As), em ambientes aquáticos.

Ao analisar espécimes de *Littoraria brevicula* coletados de efluentes industriais na região de Onsan, Coréia do Sul, Kang et al. (1999) observaram maiores concentrações de Cd e Pb nos animais coletados em regiões mais próximas do complexo industrial, apontando a espécie como monitora da presença desses elementos químicos na região.

Em estudo com a espécie *Littoraria scabra* em manguezais de Dar es Salaam na Tanzânia, África, De Wolf et al. (2001) quantificaram no tecido mole dos espécimes os elementos químicos prata, arsênio, cádmio, cobalto, cromo, cobre, ferro, manganês, níquel, chumbo, estrôncio e zinco (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr, e Zn, respectivamente), nos locais estudados. Mesmo em região com maior impacto antropogênico, as concentrações dos elementos químicos observadas estavam semelhantes a estudos com gastrópodes de outros locais, incluindo ambientes não impactados, com exceção de Cr e Zn. Indicando uma possível tendência de acumulação desses elementos químicos pela espécie, característica que influi em seu crescimento e sobrevivência.

Estudos de biomonitoramento buscam analisar periodicamente a qualidade ambiental de diferentes ecossistemas utilizando diferentes organismos (FRANÇA, 2006). Por ser endêmica de manguezais, a utilização da espécie de caramujo *L. angulifera* como bioindicador/biomonitor vem aumentando ao longo dos tempos (GIBBS et al., 1987; CHAVES, 2002; MELO et al., 2012; COSTA et al., 2013; MÉLO, 2014; SANTOS, 2016).

Mélo et al. (2012) observaram relação entre o tamanho das conchas e a resistência aos impactos ambientais, baseando-se em pesquisas como a de Chaves (2002), que sugere o tamanho ou formato da concha da espécie como responsáveis pela reserva de água e, dessa forma, auxiliando na sobrevivência, prevenindo a desidratação. A partir disso, Melo et al. (2012) justificaram a presença de animais maiores nos ambientes mais impactados.

O imposex também pode ser utilizado como um bioindicador por se tratar de uma anomalia dependente da contaminação por compostos orgânicos de estanho (COEs), em que ocorre um pseudo-hermafroditismo nas fêmeas de forma não funcional, prejudicando a capacidade reprodutiva do organismo (GIBBS et al., 1987). Em estudo realizado por Costa et al. (2013), essa anomalia foi observada em

espécimes de *L. angulifera* coletados em manguezais no Porto de Vitória e na Baía da Região do Espírito Santo, indicando a presença desses contaminantes nas áreas estudadas.

Do ponto de vista de biomonitoramento, foram quantificadas altas concentrações dos elementos químicos Cu, P e Zn em *L. angulifera* por Mélo (2014) no manguezal do Parque Memorial Arcoverde, quando comparadas com os resultados de animais provenientes do manguezal do Rio Formoso, utilizado como referência por haver menos impacto antrópico. O fator de acumulação de P, Cu e Zn atingiu quatro, duas e dezenove vezes, respectivamente para os espécimes coletados no Parque Memorial Arcoverde, indicando a tendência da espécie *L. angulifera* em acumular especialmente Cu e Zn.

A sensibilidade de *L. angulifera* a variações ambientais tem sido usada para biomonitoração ambiental no Brasil. Características abióticas como variação da temperatura e umidade possuem oscilações entre os manguezais, bem como a poluição antropogênica e influenciam no crescimento da concha da espécie (MERKT; ELLISON, 1998). Assim, alguns trabalhos fizeram um levantamento morfométrico da concha de espécimes de *L. angulifera* em alguns manguezais e relacionaram com o gênero, traçando um perfil que aponta animais menores em manguezais mais antropofizados (TANAKA et al., 2006; DAVID 2019, ZEIDAN et al., 2020). Esses estudos aconteceram em manguezais do Nordeste do Brasil, nos estados do Ceará e Bahia, havendo lacunas quanto às informações sobre as relações morfométricas entre espécimes dos estados de Pernambuco e Paraíba.

## 2.5 ESTUDOS DE MONITORAÇÃO AMBIENTAL ENVOLVENDO CONCENTRAÇÕES DE ELEMENTOS QUÍMICOS EM ÓRGÃOS DE INVERTEBRADOS

Nem sempre a quantificação de elementos químicos em órgãos e tecidos é atividade de fácil realização devido à limitação para a obtenção de quantidades de amostras adequadas para a técnica analítica disponível, à dificuldade de preparação química e à sensibilidade e nível metrológico da técnica analítica a ser empregada (WELZ; SPERLING, 1999; KRUG et al., 2004).

Para a análise química, algumas técnicas não necessitam de tratamento químico prévio das amostras para serem utilizadas, como é o caso da Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia – EDXRF, que apresenta ampla faixa de elementos químicos identificáveis em uma mesma análise. Todavia, é possível quantificar apenas elementos químicos na ordem de  $\text{mg.kg}^{-1}$  (MELQUIADES et al., 2008). Embora outras técnicas analíticas possuam capacidade de determinar elementos químicos em níveis de  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ou até  $\text{ng.kg}^{-1}$ , elas necessitam de um preparo prévio com soluções ácidas para solubilizar a amostra e permitir a quantificação da concentração do elemento químico de interesse (BUSTAMANTE et al., 2000).

Dentre estas técnicas, estão a Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) e a Espectrometria de Absorção Atômica (AAS). ICP-MS é uma técnica sensível, com baixos limites de detecção, baixa emissão de radiação de fundo, alta seletividade, precisão e exatidão, podendo detectar elementos químicos em nível de  $\text{pg.g}^{-1}$ . AAS é monoelementar e possui variações de acordo com o tipo de atomização como por chama (FAAS) para a análise em níveis de  $\text{mg.kg}^{-1}$  ou forno de grafite (GFAAS) para a quantificação de elementos químicos em níveis de  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . O volume da amostra torna-se relevante para escolha do equipamento que quantifica a concentração do elemento químico de interesse (SKOOG, 2002).

Em experimento com o gastrópode *Nassarius reticulatus*, Santos et al. (2009) quantificaram por Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente por Ablação a Laser (LA – ICP – MS) elevadas concentrações de Cu, Cd, Hg, Pb e Zn em espécimes amostrados de três áreas com diferentes níveis de contaminação ao norte de Bretanha, França. A glândula digestiva foi o órgão que mais acumulou os elementos químicos analisados e quando comparado com outros órgãos o acúmulo de Cd e Hg foi exclusivo. No trato reprodutivo, em partes do testículo e oviduto, foi observado acúmulo de Cu e Zn. No rim, na glândula e no epitélio do manto, os autores quantificaram Cd, Cu e Pb.

Espécimes do bivalve *Pinctada radiata* foram coletados em dois pontos no Golfo Pérsico (Oriente Médio) para a análise química do músculo adutor e das brânquias (POURANG et al., 2014). Os autores observaram níveis de Cd, Cu, Ni e Zn maiores nas brânquias do que no músculo, seguindo os seguintes padrões para o músculo:  $(\text{Zn,Ni}) > (\text{Cd,Cu}) > (\text{Pb})$  e para brânquias:  $(\text{Zn,Ni,Cd}) > (\text{Cu, Pb})$ .

Diferentemente dos demais, o estudo de Bordean et al. (2014) expôs gastrópodes terrestres da espécie *Cantareus aspersus* a diferentes concentrações de Mn no solo de uma floresta localizada nas proximidades de uma indústria com manganês entre seus insumos. Os autores expuseram um grupo de animais às concentrações baixas por 30 dias e, em seguida, o mesmo grupo foi exposto a concentrações elevadas de Mn por mais 30 dias, totalizando 60 dias de exposição. Os níveis de acúmulo de Mn foram medidos no hepatopâncreas, pé e concha dos indivíduos em cada grupo. Para ambos (exposição de 30 e de 60 dias), o hepatopâncreas foi o órgão que mais acumulou o elemento químico estudado, fortalecendo, assim, a utilização de moluscos como biomonitores ambientais.

De acordo com Santos (2016), elevadas concentrações dos elementos químicos Zn e Cu foram quantificadas em glândulas digestivas e gônadas de *L. angulifera* de manguezais com diferentes impactos antropogênicos. Segundo o trabalho, ao comparar o local de maior impacto antropogênico com o local de menor impacto o hepatopâncreas apresentou, concentração vinte vezes maior para Zn e seis vezes maior para Cu; enquanto nas gônadas, a concentração de Zn atingiu valores sete vezes maiores e, para Cu os resultados foram 12 vezes maiores. Nesse trabalho fez-se estudos genotóxicos associados, contudo, as consequências dessa acumulação para os organismos não puderam ser devidamente esclarecidas, necessitando de estudos mais detalhados sobre a bioacumulação, a contribuição do sistema circulatório nessa acumulação e a resposta do animal aos impactos antropogênicos.

## 2.6 ELEMENTOS QUÍMICOS EM MATRIZES LÍQUIDAS

As matrizes líquidas são as substâncias em estado líquido presente no organismo, como sangue, plasma e urina. Essas matrizes apresentam dificuldades quanto à análise química referente à extração das amostras, à padronização da técnica de extração e ao tratamento químico das amostras. Para estabelecer o tratamento da amostra são relevantes a matriz, os elementos químicos que pretendem ser quantificados, o volume de amostra a ser estudado e a técnica a qual será submetida ao final da digestão (ARRUDA; SANTELLI, 1997). Na Tabela 1 podem ser observados o equipamento digestor e técnicas analíticas aplicadas para quantificação de elementos químicos em matrizes líquidas animais.

Tabela 1 – Equipamento digestor utilizado e técnicas analíticas aplicadas para quantificação de elementos químicos em matrizes líquidas

<b>Técnica</b>	<b>Elementos químicos</b>	<b>Equipamento digestor</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
<b>ICP-OES</b>	Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb, Zn.	Banho de ultrassom	Hemolinfa	Santos et al. (2005)
<b>ICP-MS</b>	Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb, Se.	Micro-ondas	Sangue bovino	Nunes (2009)
<b>ICP-MS</b>	As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Zn.	Micro-ondas	Tinta de lula	Bua et al. (2017)

Fonte: AUTORA (2021).

Esses trabalhos citados na Tabela 1 apresentaram metodologias eficientes para análise de matriz líquida. Santos et al. (2005) centrifugaram a hemolinfa e digeriu o material suspenso, enquanto Nunes (2009) refrigerou o sangue bovino, incubou com solução de hidróxido com tetrametilamônia, homogeneizou em vórtex e retirou uma alíquota, que preparou com Triton® para a digestão. Por sua vez, Bua et al., (2017) dissecaram os sacos de tinta do animal, extraíndo os conteúdos para realizar a digestão. Podendo ser observado as distintas metodologias aplicadas por cada estudo para quantificação de elementos químicos em uma mesma matriz por técnicas analíticas semelhantes. Para amostras líquidas há escassez de estudos utilizando a técnica a ser aplicada nesse trabalho (AAS).

## 2.7 A MATRIZ SEDIMENTO EM SUSPENSÃO EM ESTUDOS AMBIENTAIS ENVOLVENDO ACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS

O sedimento possui importante papel ecológico para organismos aquáticos, servem de habitat para comunidade bentônica e para seres decompositores, participando como estoque, na ciclagem de nutrientes da cadeia trófica (LI et al., 2019). O sedimento em suspensão (SS) possui a propriedade de adsorver substâncias químicas, interferindo na dinâmica de ecossistemas aquáticos (RITCHIE

et al., 1976). Nos manguezais, a sedimentação é favorecida, pois a fitofisionomia diferenciada é uma barreira natural contra as ações das marés, aumentando a capacidade de armazenamento de material particulado (THODSEN et al., 2019) e promovendo a expansão dos bancos de lama característicos do bioma (FURUKAWA; WOLANSKI, 1996).

Os elementos químicos se encontram biodisponíveis quando estão suspensos nos corpos d'água e o sedimento em suspensão atua como uma armadilha para poluentes, por isso o crescimento da sua utilização no diagnóstico de impactos ambientais em estudos de monitoração ambiental (NEWCOMB; MACDONALD, 1991; MARIANI, 2006; SILVA et al., 2018; LI et al., 2019).

Ao analisar elementos químicos nutrientes, a acumulação nos animais pode alcançar elevadas concentrações como ocorreu para Cu e Zn nos espécimes dos moluscos terrestres *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea*, do Manguezal do Parque Memorial Arcoverde, no complexo de Salgadinho, situado às margens do Rio Beberibe (MÉLO, 2014).

Relacionando estudos que quantificam elementos químicos em SS com a acumulação dos mesmos em espécies de gastrópodes, é possível observar uma tendência de alguns elementos químicos nutrientes serem acumulados pelos organismos, podendo atingir altíssimas concentrações nos indivíduos, como pode ser observado na Tabela 2 para K, Mg e Zn, e na Tabela 3 para todos os elementos químicos listados exceto Ni e Pb.

Tabela 2 – Frações de massa obtida em mg.kg<sup>-1</sup> de elementos químicos acumulados em Sedimento em Suspensão e em gastrópodes de manguezal no Rio Beberibe

<b>SS e Bioacumuladores</b>	<b>Fe</b>	<b>K</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Sr</b>	<b>Zn</b>
*SS em Rio Beberibe	55000	500	3500	553	26	100	153	248
**Caramujos Rio Beberibe	2800	7600	8700	148	0,8	1,6	70	4450

\*Resultados de Lyra (2016); \*\* Resultados de Mélo (2019)

Tabela 3 – Frações de massa obtida em mg.kg<sup>-1</sup> de elementos químicos acumulados em Sedimento em suspensão e em gastrópodes de manguezal Rio Ipojuca

SS e Bioacumuladores	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
*SS em Rio Ipojuca	0,89	0,018	2,92	2876	66	1,5	2821	19
**Caramujos do Rio Ipojuca	5	0,3	147	4400	89	0,7	1,4	180

\*Resultados de Silva, et al. (2015);

\*\* Resultados de Mélo (2019)

Esses estudos apontam uma relação entre a disponibilidade de elementos químicos no sedimento em suspensão e a afinidade desses com gastrópodes de manguezais. Em estudo com três espécies de gastrópodes de manguezais Mélo (2019) constatou que o gastrópode *Littoraria angulifera* é o mais sensível à acumulação de elementos químicos e Santos (2016) para essa espécie, observou essa acumulação em órgãos (Glândula Digestiva, Pênis e Demais Componentes da Massa Visceral) especialmente para os elementos químicos Cu e Zn.

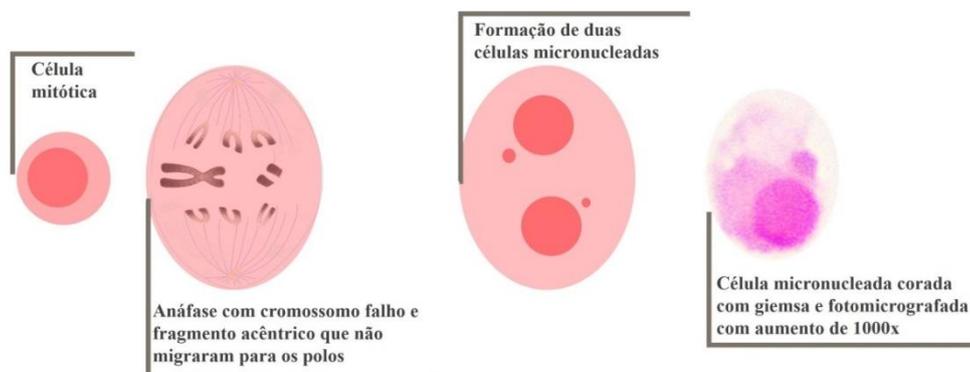
## 2.8 A MATRIZ HEMOLINFA EM ESTUDOS AMBIENTAIS ENVOLVENDO TESTES GENOTÓXICOS E CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS

A hemolinfa de moluscos e de outros animais que a possuem, pode ser um elemento precioso para fornecer informações acerca dos efeitos prejudiciais ao ecossistema oriundos de impactos ambientais antrópicos. Os trabalhos que realizam a análise de hemolinfa de moluscos e verificaram os danos genotóxicos causados por esses impactos utilizam o teste do micronúcleo (KLOBUCAR et al., 2003; PINHEIRO et al., 2013; SANTOS, 2016) e do cometa (KLOBUCAR et al. 2003; SILVEIRA et al., 2003; KOLAREVIĆ et al. 2013; CHELOMIN et al., 2017; D’COSTA et al., 2017; PANDA et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2021).

Para a monitoração de agentes mutagênicos que causam aberrações cromossômicas em células, o teste utilizado com maior frequência e de menor custo é o teste do micronúcleo (MN) (FLORES; YAMAGUSHI, 2009). Essa técnica de quantificação de micronúcleo foi inicialmente desenvolvida por Schmid e protocolada para moluscos por Bolognesi e Fenech (2012). Os micronúcleos são formados por cromossomos e fragmentos acêntricos que não migram para as regiões polares

durante a fase da anáfase da mitose, como pode ser observado na Figura 5 (FENECH, 2000).

Figura 5 – Processo de formação de célula micronucleada.



Fonte: Adaptado de Fenech (2000).

Essa malformação é originada por processos clastogênicos, que induzem a quebra do cromossomo, enquanto aneugênicos provocam a desorientação do cromossomo, resultando na não migração para as regiões dos polos (MATEUCA et al., 2006). A frequência observada nos diversos estudos apresenta uma relação entre a resposta do organismo ao dano citogenético e eficiência do mecanismo de defesa, atuando, assim, como marcadores biológicos de danos genéticos. Desse modo, essa análise em células hemocitárias de diversas espécies vem sendo amplamente utilizada em estudos como um instrumento de monitoração ambiental. A frequência de micronúcleo em hemócitos é de, aproximadamente, 1% para áreas mais impactadas como pode ser observado na Tabela 4.

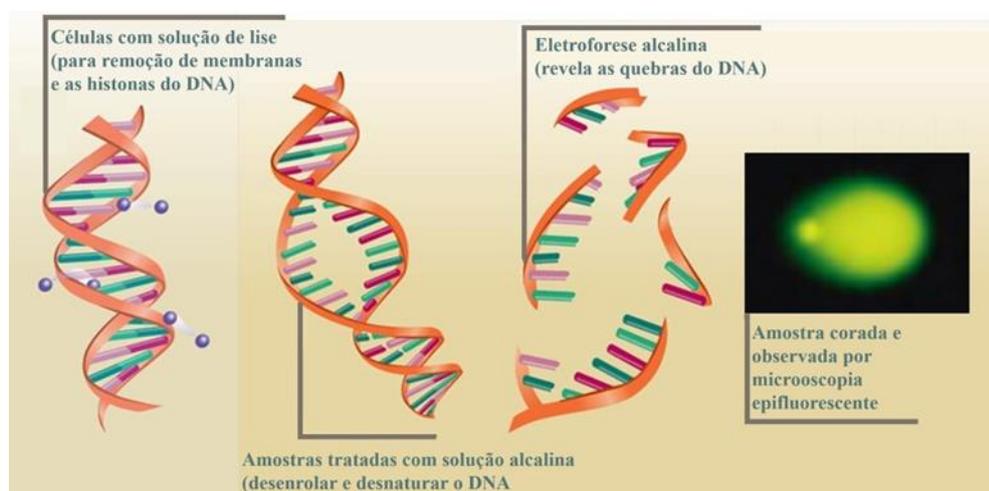
Tabela 4 – Frequência de micronúcleos em hemócitos observadas em trabalhos de monitoração ambiental.

Espécie	Área monitorada	Maior frequência de MN observada (%)	Referência
<i>Dreissena polymorpha</i>	Margem de Rio	0,5	Klobucar et al. (2003)
<i>Ucides cordatus</i>	Manguezal	0,9	Pinheiro et al. (2013)
<i>Littoraria angulifera</i>	Manguezal	0,7	Santos (2016)

Fonte: AUTORA (2021).

Outro teste genotóxico utilizado para estudos relacionados a impactos ambientais é o Ensaio do Cometa (DE LAPUENTE et al., 2015). Esse teste, também chamado de Ensaio de Gel em Célula Única (SCG) e Eletroforese com Microgel (MGE), foi introduzido pela primeira vez por Östling; Johanson (1984). A partir desse ensaio, é possível observar as rupturas na cadeia de DNA causadas por agentes estressores que reduzem o tamanho da molécula de dupla hélice, como pode ser observado na Figura 6 (FAIRBAIRN et al., 1995).

Figura 6 – Ilustração do dano que produz os fragmentos de DNA observados no Ensaio Cometa



Fonte: Adaptado de Creative Bioarray (2017)

Em estudos de biomonitoração ambiental o ensaio cometa permite observar a viabilidade celular para avaliar a capacidade genotóxica de um ambiente impactado, visto que danos no DNA ocorrem antes de se tornarem cromossômicos (SILVEIRA et al., 2003), como aconteceu no estudo de biomonitoração ativa às margens do Rio de Drava, Norte da Croácia realizado por Klobucar et al. (2003). Neste estudo, a espécie *Dreissena polymorpha* apresentou danos ao DNA em espécimes transferidas para regiões com diferentes níveis de contaminação. Porém, como a região controle também apresentou danos elevados, os autores concluíram não haver diferença significativa entre as áreas impactadas.

A capacidade genotóxica também pode ser utilizada para categorizar o impacto ambiental de uma região para uma determinada espécie (SILVEIRA et al., 2003). Foi determinado o potencial genotóxico de amostras de água superficial e sedimento da bacia do Lago Guaíba em Porto Alegre – RS para a espécie

*Limnoperna fortunei*, utilizando os ensaios do micronúcleo e cometa em hemócitos. Dentre os resultados obtidos, danos ao DNA celular foram observados em todos os pontos coletados, sugerindo a espécie como bioindicadora de contaminantes.

Por outro lado, Kolarević et al. (2013) aplicaram o teste do cometa em estudos com biomarcadores para avaliar o potencial uso do molusco *Sinanodonta woodiana* como biomonitor de contaminação ambiental de Rios em Velika Morava em Varvarin na Sérvia. Os autores observaram que a espécie apresenta bom desempenho para realizar a biomonitoração de ambientes aquáticos e uma boa resposta genotóxica quando os indivíduos foram submetidos a uma análise sazonal, a partir do ensaio cometa, com os maiores valores obtidos durante o verão.

Alguns estudos utilizam testes genotóxicos para avaliar a capacidade tóxica de elementos químicos disponíveis no meio. Estudos como o de Chelomin et al. (2017) apontaram que a exposição do mexilhão *Mytilus trossulus* a nanopartículas de Cu gerou dano ao DNA nas células branquiais. Estudo semelhante foi realizado por D'Costa et al. (2017) para avaliar a capacidade tóxica de Cd para a espécie de bivalve *Meretrix casta*. Durante 15 dias, grupos de animais foram expostos a diferentes concentrações de CdCl<sub>2</sub> (0.75 µg/L, 1.5 µg/L e 3 µg/L). Os autores observaram que o aumento no dano ao DNA da espécie estava relacionado ao aumento da concentração de Cd. Resultados positivos quanto à toxicidade foram observados tanto para o ensaio cometa quanto para o de micronúcleo. Em experimento expondo nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP-GS, ZnONP-S e Zn (CH<sub>3</sub>COO)<sup>2</sup>) em sementes germinantes da leguminosa *Lathyrus sativus*, Panda et al. (2017), por meio do ensaio cometa, observaram danos oxidativos sobre a molécula de DNA para todas as nanopartículas utilizadas.

Ensaio genotóxicos são bastante favorecidos quando combinados com técnicas analíticas pois possibilitam uma maior compreensão da interferência dos elementos químicos nos danos celulares por meio da análise da flutuação dos resultados. Também permitem avaliar se houve algum efeito indireto relativo ao contato do organismo com espécies químicas não alvo do estudo, levando assim à novas hipóteses científicas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os gastrópodes da espécie *Littoraria angulifera* foram coletados dos manguezais da Paraíba: Barra de Camaratuba – BC, Barra de Mamanguape – BM, Rio Abiaí – RA e Pontinhas – PO. Em Pernambuco, os manguezais foram: Barra de Catuama – BT, Carne de Vaca – CV, Maria Farinha – MF e Rio Formoso – RF. Um total de 184 animais foram analisados, e desses, 99 espécimes foram coletados em Pernambuco e 85 espécimes foram coletados na Paraíba.

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

Os locais de coleta, observados na Tabela 5, foram selecionados em decorrência de estudo prévio realizado por Mélo (2019). Os elementos químicos escolhidos foram Cobre (Cu) e Zinco (Zn).

Tabela 5 – Localização das coletas em Pernambuco e na Paraíba e a identificação de altas e baixas concentrações dos elementos químicos.

	Manguezais	*Altas concentrações	*Baixas concentrações	Localização GPS
PE	Barra de Catuama	–	Cd e Cu	-7.676009, - 34.838139
	Carne de Vaca	–	Cu e Pb	-7.571228, - 34.841722
	Maria Farinha	Cu Pb e Zn	As e Ni	-7.909374, - 34.843581
	Rio Formoso	As e Ni	Cd	-8.699833, - 35.104654
PB	Barra de Camaratuba	Cu, Ni e Pb	Cd e Zn	-6.602729, - 34.967391
	Barra de Mamanguape	–	As e Pb	-6.777636, - 34.930864
	Rio Abiaí	–	Cd, Cu e Zn	-7.441623, - 34.814533
	Pontinhas	As, Cu e Zn	–	-7.569048, - 34.839567

\*Valores obtidos em estudo realizado por Mélo (2019)

- Ausência dos elementos químicos selecionados como critério para escolha de manguezal.

Fonte: Adaptado de MÉLO (2019).

### 3.2 AMOSTRAGEM DE CARAMUJOS DA ESPÉCIE *L. ANGULIFERA*, DE SEDIMENTO EM SUSPENSÃO E MORFOMETRIA

Cada ponto de coleta na Paraíba e em Pernambuco foi georreferenciado por sistema de posicionamento global – GPS, podendo ser observados na Figura 7. As coletas dos caramujos nos quatro manguezais do estado da Paraíba e quatro do Pernambuco, dois que apresentaram maiores concentrações e dois com menores concentrações de elementos químicos ocorreram por busca ativa em 25 de novembro de 2018 na Paraíba, com temperatura média máxima de 25,63°C e mínima de 24,60°C; umidade relativa máxima de 85,33% e mínima de 80,67% (INMET, 2020) e em 10 de janeiro de 2019 em Pernambuco, com temperatura média máxima de 27,63°C e mínima de 26,75°C e umidade relativa máxima de 72% e mínima de 67,96% (INMET, 2020). Para análise de sedimento em suspensão foram coletados dos oito manguezais, água de estuário (4 amostras de 5 Litros, totalizando 20 Litros) durante o período da maré cheia. Em seguida, todas as amostras de molusco *in vivo* e os sedimentos nos galões foram conduzidas ao Serviço de Monitoração Ambiental (SEAMB) do Centro Regional de Ciência Nuclear do Nordeste – CRCN-NE.

Figura 7 – Mapa da área de estudo com os locais de coleta nos estados da Paraíba e Pernambuco



BC- Barra de Camaratuba; BM- Barra de Mamanguape; RA- Rio Abiaí; PO- Pontinhas

BT- Barra de Catuama; CV- Carne de Vaca; MF- Maria Farinha; RF- Rio Formoso

Fonte: Adaptado de SISCOM. IBAMA 2020 <http://siscom.ibama.gov.br/geoexplorer/composer/>

Chegando ao SEAMB-CRCN-NE, as amostras de água foram colocadas em refrigeração a uma temperatura de 4°C por, aproximadamente, 6 meses para a realização da análise do Sedimento em Suspensão, segundo técnica de análise utilizada por França (2010).

Os moluscos coletados e transportados vivos ao SEAMB em sacolas de polipropileno em caixa de isopor foram limpos com solução de Extran a 1%, para remoção de particulados, em seguida foram medidos comprimento e largura com paquímetro e identificados quanto a sexagem. Ao todo foram coletados 431 animais, 131 fêmeas e 85 machos na Paraíba, 116 fêmeas e 99 machos em Pernambuco. As variáveis independentes estudadas foram os manguezais (BT, CV, MF e RF em Pernambuco, BC, BM, PO e RA na Paraíba) e o sexo (M – macho, F – fêmea).

Desses, 240 foram analisados quanto a concentração de Cu e Zn em hemolinfa e seguiram para o teste do micronúcleo. A hemolinfa foi coletada dos mesmos animais para duas análises (n = 40), onde, aproximadamente, 50µL foi extraída para realização do teste do micronúcleo, realizado no SEAMB, e analisado no Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. Para a quantificação dos elementos químicos Cu e Zn por espectrometria de absorção atômica em Forno de Grafite (GFAAS) no SEAMB, dessa mesma matriz foi extraída aproximadamente 1mL.

Para análise da bioacumulação de elementos químicos por meio do teste em FAAS (Espectrometria de Absorção Atômica por Chama), 184 espécimes foram dissecados para separação da glândula digestiva, demais tecidos moles e pênis (apenas em machos), e submetidos também à análise no SEAMB.

### 3.3 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE: TESTE DO MICRONÚCLEO E ENSAIO COMETA EM HEMOLINFA DE *L. angulifera*

Para realização destes ensaios, a hemolinfa dos moluscos foi extraída (Figura 8) segundo a técnica adaptada para espécie, por Santos (2016).

Figura 8 – Extração de Hemolinfa em *L. angulifera* para montagem de lâmina de microscopia



A – Seta apontando região do Sinus Bucal, onde ocorre a punção; B- Punção e extração da Hemolinfa

Fonte: AUTORA (2021).

Para teste do micronúcleo, 50  $\mu$ L de hemolinfa foram depositadas em lâminas de microscopia com 50  $\mu$ L de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Em seguida, as lâminas foram colocadas em câmara umidificada a  $25 \pm 2$  °C por 30 minutos. Os hemócitos foram fixados com 100  $\mu$ L de gluteraldeído em solução de Ringer a 1% por 10 minutos e depois lavadas com solução de Ringer e, posteriormente, colocadas em posição inclinada para secar naturalmente. Após a secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa (10% v/v) por 5 minutos, e em seguida foram lavadas com água destilada e colocadas para a secagem a  $25 \pm 2$ °C (SILVA, 2013). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Medilux) com aumento de 1.000x. A frequência de micronúcleo (MN) foi avaliada a partir da metodologia sugerida por Flores e Yamaguchi (2009). Outras alterações celulares podem ser visualizadas com esta técnica são elas: apoptose e binucleação celular. Em duas lâminas de hemolinfa por animal foram contabilizadas 1000 células, essas compõem 1 leitura. Para cada manguezal estudado fez-se leitura em quintuplicata.

#### 3.4 ANÁLISE DA HEMOLINFA PELA TÉCNICA DE ABSORÇÃO ATÔMICA POR FORNO DE GRAFITE – GFAAS

Os animais dos manguezais de PE e PB utilizados no teste do micronúcleo tiveram a hemolinfa analisada pela Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS) para detectar presença de Cu e Zn (Figura 9). As leituras

aconteceram em duplicata. As curvas analíticas foram construídas com soluções-padrão da Merck, que possuem concentrações conhecidas do elemento químico de interesse. Alíquotas de 20 µL das amostras e do branco analítico foram analisadas.

Figura 9 – Equipamento GFAAS modelo 240 Zeeman com Forno de Grafite GTA120.



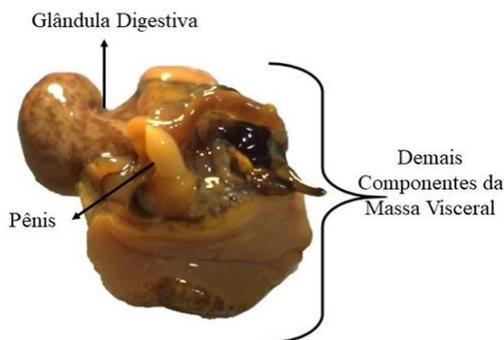
Fonte: A Autora.

A metodologia de preparo de hemolinfa para análise em GFAAS para gastrópodes é escassa na literatura. A padronização aplicada foi adaptada a partir de protocolos estabelecidos para fluidos como plasma sanguíneo, sangue reconstituído e sangue (WELZ; SPERLING, 1999). Para análise, foi homogeneizado em tubo de microcentrífuga de 2 mL na relação de 1:1 hemolinfa e 0,2% Triton X-100, detergente não iônico com propriedade de desestruturar a membrana e as proteínas celulares. A análise de Cu e Zn aconteceu por ingestão direta dessa solução.

### 3.5 DISSECAÇÃO E PRÉ-DIGESTÃO DAS AMOSTRAS DE ÓRGÃOS DE *L. ANGULIFERA*

Os animais dos manguezais da área de estudo em Pernambuco e Paraíba após lavados foram separados da concha e dissecados para separação da glândula digestiva (GD) e pênis (P), dos demais componentes da massa visceral (DCMV) (Figura 10).

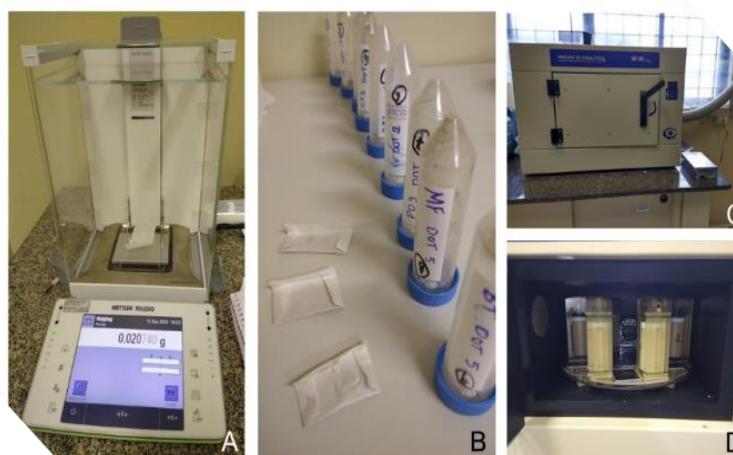
Figura 10 – Estruturas dissecadas do caramujo *L. angulifera* para análise dos elementos químicos Cu e Zn



Fonte: AUTORA (2021).

Essas estruturas seguiram para o liofilizador até massa constante, em seguida foram maceradas em almofariz de vidro até tamanho de 0,5 mm aferidos com uma peneira. O material de referência utilizado para verificar a exatidão da análise foi o Tecido de Mexilhão (PEN TM-1) (PETRONI, 2015). Tanto as amostras, quanto o material de referência foram pesados em balança analítica de 6 dígitos e digeridos com  $\text{HNO}_3$  P.A. em Forno Digestor por micro-ondas Provecto Analítica DGT 100 Plus, ilustrado na Figura 11. Esse forno digestor tem capacidade para 12 frascos, contudo, por se tratar de um equipamento que aquece por potência, optou-se por utilizar apenas 6 frascos.

Figura 11 – Equipamentos utilizados para separação de alíquota e digestão das amostras de caramujo *L. angulifera*.



A – Balança analítica com 6 casas decimais; B – Amostras pesadas; C- Forno digestor Provecto Analítica; D- Disposição dos frascos no forno micro-ondas.

Fonte: AUTORA (2021).

O volume de ácido utilizado na digestão foi de 8mL para os materiais de referência e para amostras com massa até 0,5 g, aquelas com massa inferior, o volume de ácido utilizado foi proporcional. Amostras com massa menor que 0,25 g foi adicionado 4mL de HNO<sub>3</sub>. O programa de aquecimento utilizado foi adaptado do manual do equipamento sugerido para digestão de rim bovino (PROVETTO, 2008) e a cada rodada da análise foi programada uma rodada de descontaminação com 5mL de HNO<sub>3</sub> por 5 minutos a 800W, a 0 e mais 800W para eliminação do efeito memória. Para minimização de interferências, brancos analíticos foram analisados juntamente com as amostras e o material de referência. Ao final, em capela de fluxo laminar, as soluções foram filtradas, avolumadas para 30mL com água Mili-Q e armazenadas em geladeira até a análise em FAAS.

### 3.6 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO EM SUSPENSÃO

O preparo das amostras para análise seguiu a metodologia descrita em França et al., (2010), a qual sugere sedimentação espontânea sob baixa temperatura. Para isso, as amostras ficaram por, no mínimo, 6 meses a 4°C. A remoção de água sobrenadante aconteceu por sifonação e o processamento foi em centrífuga para separação do sedimento. O excesso de água foi retirado com seringa e a amostra transferia à placa de Petri para secar em estufa. As etapas podem ser observadas na Figura 12.

A centrifugação para separação da mistura foi realizada a 2200 rpm por 5 minutos e a temperatura da estufa durante a secagem das amostras foi de 50°C. Após massa constante, as amostras foram pesadas (balança analítica com 5 casas decimais) e alíquotas de aproximadamente 0,1g das amostras foram encaminhadas para digestão.

Figura 12 – Etapas de preparação para análise das amostras de sedimento em suspensão.



A – Sifonação; B – Abertura do galão; C – Centrifugação; D- Secagem em estufa

Fonte: AUTORA (2021).

Juntamente com as amostras, para garantir a qualidade do procedimento analítico, o material de referência Montana Soil (NA 2710) também passou pelo processo de digestão química. Na digestão, utilizou-se o forno micro-ondas (Provecto Analítica) e 5 mL de ácido nítrico P.A (MERCK). O programa utilizado foi adaptado para o sedimento em suspensão, o qual ficou 5 minutos a 330W, 10 minutos a 640W e 10 minutos a 0W, para resfriamento da amostra. Ao final foram filtradas e um volume de 5 mL de HNO<sub>3</sub> a 5% utilizado para arrastar a amostra dos tubos da digestão e avolumadas para 30 mL com água Milli-Q. O procedimento aconteceu em capela de fluxo laminar. Posteriormente, as amostras foram colocadas em refrigeração (5 °C) até a análise em FAAS.

### 3.7 ANÁLISES PELA TÉCNICA DA ABSORÇÃO ATÔMICA POR CHAMA – FAAS

Para a obtenção da concentração dos elementos químicos Cu e Zn no Sedimento em Suspensão e nos órgãos dos moluscos *Littoraria* coletados de manguezais da Paraíba e Pernambuco foi utilizada a técnica de Absorção Atômica por Chama, modelo AA da Agilent, Figura 13.

Figura 13 – Equipamento SpectrAA 220 da Varian/Agilent.



Fonte: AUTORA (2021).

As curvas analíticas foram construídas com soluções-padrão da Merck, contendo concentrações conhecidas dos elementos químicos de interesse Cu e Zn. Primeiramente, foram feitas as leituras do material de referência e do branco analítico e em seguida foram feitas as leituras das amostras dos órgãos dos moluscos e sedimentos em suspensão. As leituras aconteceram em duplicata e os resultados obtidos foram colocados em tabelas para análise estatística dos dados.

### 3.8 CONTROLE DA QUALIDADE DOS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

A estimativa de incerteza analítica foi obtida a partir da soma quadrática das incertezas individuais referentes à precisão e à exatidão segundo o EURACHEM/CITAC Guide CG (ELLISON; WILLIAMS, 2012). Esses valores de incertezas foram expandidos em nível de 95% de confiança. Para validação do procedimento analítico, utilizou-se o Número Na. Para nível de confiança de 95%, a faixa adequada para os resultados do Número Na foi entre -1 e 1, conforme recomendação da NA 13528/2005.

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

na qual,

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

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

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

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

### 3.9 ÁREA DE ESTUDO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO DE CASO DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE CU E ZN NO MANGUEZAL DO ESPAÇO CIÊNCIA.

No Complexo de Salgadinho, o Parque Memorial Arcoverde apresenta 4 ilhas de manguezais. Na maior dessas, encontra-se o Museu de Ciência Espaço Ciência. No museu, esse manguezal é nomeado de Manguezal Chico Science e recebe influência indireta do canal do Derby – Tacaruna (CUNHA; GUIMARÃES, 2000; FIGUEIREDO et al., 2003; BRANDÃO et al., 2009; SANTOS, 2016).

Em razão desse estudo ter como hipótese as concentrações de Cu e Zn influenciarem nos danos celulares da espécie, os seguintes estudos foram levados em consideração: o realizado por Mélo (2019), que quantificou em *L. angulifera* dos animais do Rio Abiaí menores concentrações de Cu e Zn, quando comparado ao manguezal do Parque memorial Arcoverde analisado por Mélo (2015) e o de Santos (2016), que mediu danos genotóxicos e elementos químicos em órgãos de *L. angulifera* do manguezal do Espaço Ciência, quantificando altas concentrações de Cu e Zn (dados disponíveis na Tabela 6). E como os valores basais desses elementos químicos não são conhecidos, esse estudo de caso foi proposto. De forma complementar, houve a investigação em campo de hábitos e comportamento de *L. angulifera*, disponível no Apêndice I.

Tabela 6 – Concentração de Cu e Zn em *L. angulifera* de manguezal da Paraíba – Rio Abiaí e de Pernambuco – Memorial Arcoverde e Espaço Ciência.

Manguezais	Concentração em $mg\ kg^{-1}$	
	Cu	Zn
*Rio Abiaí	56	250
**Memorial Arcoverde	257	7797
***Espaço Ciência	393	20600

\*Resultados em parte mole (MÉLO, 2019);

\*\* Resultados em parte mole (MÉLO, 2014)

\*\*\* Resultados em glândula digestiva (SANTOS, 2021)

Fonte: AUTORA (2021)

Em 25 de novembro de 2018, um total de 50 animais foram coletados do manguezal do Rio Abiaí (RA) e levados para o manguezal do Espaço Ciência (EC). Contudo, apenas 28 animais foram analisados. Os animais foram pintados com tinta esmaltada em sua concha de modo a diferenciar de onde vieram e os gêneros (rosa fêmeas e azul machos). Dia 27 de novembro de 2018, todos foram transferidos para árvores entre o píer da área movimento do museu, de forma aleatória. Desde a coleta, o experimento durou 228 dias, e desses, 226 foram nos manguezais. Os dois dias entre a coleta e a introdução da espécie no manguezal se deu para limpeza do sistema digestivo (SANTOS, 2016). Algumas etapas do experimento podem ser observadas na Figura 14.

Figura 14 – Etapas do Ensaio de Bioacumulação de Cu e Zn no manguezal do Espaço Ciência no caramujo *L. angulifera*



Fonte: AUTORA (2021).

Os animais que compuseram a amostra chamada RA–EC1 ficaram expostos no manguezal EC por 37 dias. Os que foram denominados RA–EC2 ficaram no manguezal por 86 dias. Aqueles que compuseram o grupo RA–EC3 ficaram por 125 dias, o grupo RA-EC4 ficou exposto por 156 dias e o último grupo experimental, o RA–EC5 ficou exposto por 226 dias. Também foram coletados caramujos endêmicos do manguezal do EC para realização das análises. Para verificação de danos genéticos pela consequência da exposição ao EC, aplicou-se o ensaio cometa na hemolinfa dos caramujos de metodologia adaptada de Singn et al. (1988). O acompanhamento das concentrações de Cu e Zn nas amostras de parte mole do caramujo *L. angulifera* aconteceram por FAAS no CRCN/NE.

Para o ensaio Cometa foram utilizadas as soluções, Gel de agarose de baixo ponto de fusão (LM); Gel de agarose padrão; solução de EDTA; solução de hidróxido de sódio (NaOH); tampão fosfato alcalino (PBS), Solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1 M NaOH, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, e 10% DMSO) ajustada para pH 10 e Tampão de eletroforese (1M NaOH, 200 mM EDTA) ajustado para pH > 13.

As lâminas histológicas foram lixadas e limpas com detergente, água e álcool (70%). Coletou-se aproximadamente 60µL (3 gotas) de hemolinfa de *L. angulifera*, homogeneizados com 100 µL de solução de 0,5% de agarose LM a 37°C. Esse procedimento foi realizado na ausência de luz (Etapa fotossensível). O material homogeneizado foi depositado nas lâminas previamente banhadas em agarose padrão, para só então ser adicionada a lamínula sobre o material. O processo de solidificação da agarose ocorreu por resfriamento das lâminas a 4°C em refrigerador por 10 minutos. Após o resfriamento, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise a 4°C durante 72h. Ao término, as lâminas foram embebidas por 20 minutos em solução tampão a 4°C (para desnaturar o material genético). Após finalização da confecção da lâmina, essas foram submetidas à corrida de eletroforese por 20 minutos a 40 V/cm e 300 mA e postas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos. Por fim, as lâminas foram fixadas, por imersão em etanol absoluto durante 5 minutos, e armazenadas a 4°C até a análise microscópica.

Para leitura em microscópio de fluorescência Nikon H550L no aumento de 400x as lâminas foram previamente coradas com 50µL de corante SYBR Safe (Invitrogen) diluído em água destilada na proporção 1:500. Para análise, um total de 100 nucleóides foram avaliados em triplicata.

### 3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nas variáveis dependentes e independentes estudadas foram aplicadas estatística descritiva, métodos estatísticos univariados e multivariados, para observar os tipos de distribuição e correlação entre os resultados obtidos. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software STATISTICA 10 (STATSOFT, 2011).

#### 3.10.1 Genotoxicidade em *Littoraria angulifera* de diferentes manguezais

Foi aplicada a estatística descritiva estratificada por estado e local associada com a frequência de Micronúcleo – MN, Binucleação – BN e Apoptose – AP, além do teste de normalidade de Shapiro Wilk ( $p>0,05$ ). Após observar as diferenças

significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ), foi feita a análise de variância com o teste de Tukey. A frequência das variáveis relacionadas com a genotoxicidade em *L. angulifera* obtida pelo ensaio do micronúcleo foi analisada assumindo a distribuição de Poisson com proporção  $p$  para  $n$  amostras com estimativa de desvio-padrão  $s = p(1-p)/n^{1/2}$ . Baseado nessa distribuição, o intervalo de confiança de Wald, em nível de 95% de confiança ( $z_{\alpha/2} = 1,96$ ), foi escolhido por apresentar aplicabilidade em teste de micronúcleo para a espécie estudada (BARBOSA SANTOS, 2017). Nesse teste, para obtenção dos limites superiores e inferiores em nível de 95% de confiança, foi aplicada uma correção para  $p$  (WILSON, 1927) a partir da Equação 2:

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

### 3.10.2 Cobre e Zinco em Sedimento em Suspensão, órgãos e hemolinfa de *Littoraria angulifera*

As concentrações e incertezas analíticas combinadas foram obtidas a partir da soma quadrática das incertezas e expandidas em nível de 95% de confiança (ELISON; WILLIAMS, 2012). A qualidade do procedimento analítico foi estabelecida pelo número EN para as análises de Sedimento em Suspensão e órgãos. Pela ausência de material de referência que fosse utilizado por ingestão direta no AAS, foram calculadas incertezas mais altas que as demais variáveis na análise da hemolinfa. Os resultados foram apresentados por estatística descritiva, *fingerprint* e análise de grupamento.

### 3.10.3 Análise morfométrica dos espécimes coletados nos manguezais de Pernambuco e Paraíba

Nessa análise foi aplicada a estatística descritiva estratificada por estado, local e gênero, onde foi realizado o teste de normalidade de Shapiro Wilk ( $p > 0,05$ ) e

Análise de variância de dois critérios. As diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ) em conjunto com o teste de Tukey foram utilizadas para comparar as variáveis.

### 3.10.4 Correlação entre Cu e Zn e genotoxicidade em hemolinfa

Foi aplicada a correlação de Spearman para observar as interações entre os grupos, associando as concentrações de Cu e Zn em hemolinfa e órgãos com os resultados observados do teste do micronúcleo.

### 3.10.5 Mutagenicidade pelo teste cometa no ensaio da contaminação de Cu e Zn.

Os cometas observados foram classificados em dois parâmetros (COLLINS et al., 2008): o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%). O ID classifica os cometas em cinco classes, da classe 0 a classe 4, de acordo com o comprimento da cauda e a intensidade. Na classe 0 estão os cometas sem danos causados pela exposição; a classe 1 corresponde a cometas com danos mínimos; classe 2 a cometas com danos médios; classe 3 a cometas com danos intensos; e a classe 4 corresponde aos cometas com danos máximos.  $ID\ total = 0.(n^{\circ}\ de\ cometas\ classe\ 0) + 1.(n^{\circ}\ classe\ 1) + 2.(n^{\circ}\ classe\ 2) + 3.(n^{\circ}\ classe\ 3) + 4.(n^{\circ}\ classe\ 4)$ .

O segundo parâmetro, FD%, será calculado como a porcentagem de todos os cometas danificados (classe 1 a classe 4) em relação ao total de células contadas, que vai da classe 0 a classe 4 ( $n^{\circ}$  total). Neste caso, foi aplicado o seguinte cálculo:

$$FD\% = \frac{[(N^{\circ}\ total\ de\ cometas - N^{\circ}\ de\ cometas\ categoria\ 0)100]}{N^{\circ}\ total\ de\ cometas}$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de animais da espécie *Littoraria angulifera* para cada manguezal estudado foi realizada com a finalidade de estabelecer a concentração de Cu e Zn presente em órgãos do corpo do animal e hemolinfa e associar esta presença aos possíveis efeitos biológicos. Também foi estudado o sedimento em suspensão das águas onde foram coletados os moluscos, para avaliação da presença de Cu e Zn e desta forma associá-los como uma das fontes de contaminação dos moluscos. Para obter estes resultados foram realizados bioensaios e técnicas analíticas nucleares. Os resultados podem ser verificados nos tópicos a seguir.

### 4.1 QUALIDADE DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Para quantificar, em manguezais da Paraíba e Pernambuco, Cu e Zn nos Sedimentos em Suspensão, nos órgãos e no corpo inteiro de *Littoraria angulifera*, analisou-se, concomitantemente, as soluções padrão, o branco analítico e materiais de referência para garantir a qualidade do procedimento analítico. Os resultados dos materiais de referência analisados por FAAS para Sedimento em Suspensão, Órgãos e corpo de *L. angulifera* estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores obtidos e certificados ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ), incertezas analíticas expandidas para 95% de confiança e valores de Número Na para os materiais de referência analisados por FAAS

NA 2710 Montana Soil							
Analito	Valor Obtido			Valor Certificado			Número Na
	Média	±	Incerteza	Média	±	Incerteza	
<b>Cu</b>	3648	±	616	3420	±	50	0,4
<b>Zn</b>	4079	±	1159	4180	±	150	-0,1
TM 01 IPEN							
<b>Cu</b>	10,0	±	1,7	11,3	±	1,7	-0,3
<b>Zn</b>	102,1	±	29	118,5	±	9,5	-0,5

NA 2710= Material de referência Sedimento em Suspensão;

TM 01 IPEN = Material de Referência Órgãos.

Fonte: AUTORA (2021).

As concentrações dos elementos químicos estiveram em concordância com os valores certificados com incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de

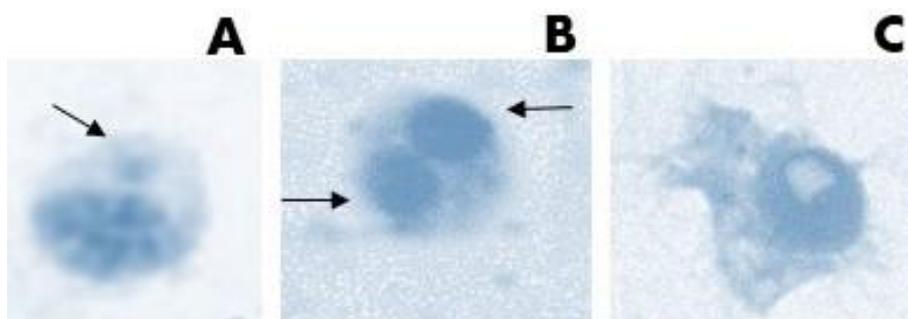
confiança. A qualidade dos procedimentos analíticos foi comprovada a partir dos valores do Número Na, que estiveram entre -1 e 1 (NA 13528 2005), para os elementos químicos quantificados nos materiais de referência (Tabela 7). Com isso, assume-se que os procedimentos analíticos empregados garantem a correta determinação de Cu e Zn em *L. angulifera* (órgãos e parte mole) e os sedimentos em suspensão dos manguezais amostrados.

#### 4.2 GENOTOXICIDADE DE CARAMUJOS DA ESPÉCIE *LITTORARIA ANGULIFERA* EM MANGUEZAIS DA PARAÍBA E PERNAMBUCO

De uma mesma amostra de hemolinfa fez-se o teste do micronúcleo e a análise por GFAAS para a quantificação de Cu e Zn. Na análise das lâminas foram observados hialinócitos e granulócitos, bem como a presença de Micronúcleo (MN), Binucleação (BN) e Apoptose (AP) nestas células, que podem ser observados na Figura 15.

Figura 15 – Imagens dos danos celulares encontrados nas células analisadas.

Imagem A: Micronúcleo apontado em seta, B: Binucleação apontadas em setas, C: Apoptose.



Fonte: AUTORA (2021)

As frequências de Micronúcleo, Binucleação e Apoptose celular, obtidas por meio do teste do micronúcleo estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 – Frequência de alterações celulares como: micronúcleo, binucleação e apoptose nos hemócitos de *L. angulifera* de manguezais dos estados da Paraíba e Pernambuco.

Local	Total de animais	Total de hemócitos	Frequência (%)			
			Micronúcleo	Binucleação	Apoptose	
PB	BC	5	5000	4,5	1,0	0,7
	BM	5	5000	4,2	1,3	0,6
	RA	5	5000	3,9	2,3	0,0
	PO	5	5000	7,4	3,1	0,7
PE	BT	5	5000	4,2	0,9	0,7
	CV	5	5000	4,0	0,2	1,0
	MF	5	5000	5,1	1,2	1,3
	RF	5	5000	7,2	5,0	7,3

Manguezais da Paraíba (PB) Barra de Camaratuba – BC, Barra de Mamanguape – BM, Rio Abiaí – RA e Pontinhas – PO e de Pernambuco (PE) Barra de Catuama – BT, Carne de Vaca – CV, Maria Farinha – MF e Rio Formoso – RF

Fonte: AUTORA (2021).

Com um total de 5000 células contadas por manguezal estudado, os resultados com valores mais altos para apoptose foram dos manguezais de Pernambuco: Carne de Vaca (1,0%), Maria Farinha (1,3%) e Rio Formoso (7,3%). Percentuais tão altos para apoptose quanto encontrado para o Rio Formoso são descritos em estudos laboratoriais de exposição a contaminantes. Siqueira et al. (2021), expuseram moluscos *Biomphalaria glabrata* a concentração 50mg.L<sup>-1</sup> de lodo doméstico por 48 horas observando uma frequência de apoptose próximo a 10% (em 3.000 células contadas). Enquanto em estudo realizado por Lima et al. (2018), também com o gastrópode *B. glabrata*, observaram aproximadamente 10% de células em apoptose (em 3.000 células contadas) ao expô-lo a 0,25mg. L<sup>-1</sup> do pesticida oxyfluorfen. Não há dados na literatura sobre exposição de *Littoraria angulifera* a contaminantes em laboratório. O único estudo do teste do micronúcleo realizado na espécie foi em campo, em que nele Santos (2016) encontrou para AP frequência de 0,35% (4.000 células contadas) em manguezais da região metropolitana do Recife (O manguezal do Espaço Ciência). Com isso, os resultados observados para AP indicam haver uma elevada fonte de poluição antrópica na região, que por sua vez está induzindo a morte celular.

A variável binucleação foi maior para os animais dos manguezais da Paraíba: RA (2,3%) e PO (3,1%) e para Pernambuco os dos manguezais MF (1,2%) e RF (5%), esse último apresentou frequência maior que a soma de todas as binucleações

dos outros manguezais do estado de Pernambuco. Os valores encontrados podem ser considerados elevados, visto que em trabalho realizado por Santos (2016) com *L. angulifera* do manguezal “antropizado” do Espaço Ciência a frequência média de Binucleação foi de apenas 0,2% (para 4.000 células contadas), resultado 10 vezes menor que o encontrado nos animais do Rio Abiaí. Os valores são elevados também ao serem comparados com dados de outras espécies de gastrópodes, os quais os pesquisadores também avaliaram a presença de binucleação nos hemócitos. Na pesquisa de Lima et al. (2019) com o gastrópode *B. glabrata* a frequência de Binucleação foi de 0,6% (3.000 células contadas) ao expor o caramujo a concentração de 200 nM de CdTe. Em estudo de Montalvão (2019), com o bivalve *Anodontites trapesialis* expostos a lixiviados de bituca de cigarro a binucleação também foi observada, porém não quantificada. Esses e outros estudos descritos na literatura (SILVA et al., 2010; ARCAUTE et al., 2016) sugerem que a presença de binucleação nos hemócitos estão relacionadas ao processo de defesa a agentes mutagênicos, servindo assim como indicador de atividades antrópicas. Os altos valores encontrados principalmente nas variáveis AP e BN nos hemócitos dos animais de RF (Pernambuco), sugerem que os animais desse manguezal encontram-se sobrevivendo em grave estresse ambiental.

Para a variável micronúcleo, todos os resultados foram elevados, porém a maior frequência foi observada na hemolinfa dos caramujos do manguezal de PO (7,4%), na Paraíba, e em Pernambuco: MF (5,1%) e RF (7,2%). Podemos considerar essas frequências bem elevadas para essa variável. Tanto para análise de MN *in situ*, como mostra o estudo realizado por Pinheiro et al. (2013), que encontrou maior frequência de 0,4 % de MN no crustáceo de manguezal *Ucides cordatus* em Cubatão – SP (10.000 células contadas), e o realizado por Santos (2016), que quantificou a maior frequência de células micronucleadas em 0,3% (em 4.000 células contadas), para espécie *L. angulifera* em manguezal do Espaço Ciência, localizado em um centro urbano. Quanto para análise de MN *ex situ*, como mostram os trabalhos de Silva (2010) que, ao expor o *Biomphalaria glabrata* a radiação de dose de 45 Gy, obteve uma frequência de 0,3 % (em 3.000 células contadas). Souza (2015) que observou a frequência de 0,3% de células micronucleadas no gastrópode *Helix aspersa* (3.000 células contadas) exposto em local com alto teor de carvão mineral com concentração elevada de enxofre e Montalvão (2019) em seu trabalho com o bivalve *Anodontites trapesialis* expostos a lixiviados de bituca de cigarro em

concentração 10x mais alta que disposta em trabalho na literatura, de 2000 células analisadas observou frequência de MN em 0,2 %. A maior frequência de MN observada para esse estudo é semelhante a encontrada em trabalhos com mexilhões biomagnificantes (VILLELA et al., 2006; GEREMIA, 2015), fortalecendo a hipótese de que as pressões antrópicas nesses locais estão elevadas e vêm causando danos às células dos espécimes, principalmente os que habitam os manguezais do estado da Paraíba: PO e Pernambuco: CV, MF e RF.

Para verificar a diferença estatística entre as variáveis analisadas no teste do micronúcleo (AP, BN e MN), aplicou-se o teste Shapiro Wilk para observar a normalidade dos resultados ( $p > 0,05$ ). Apenas a variável MN ( $p = 0,334$ ) apresentou distribuição normal. Para essa variável fez-se os testes de análise de variância ( $p \leq 0,005$ ) seguido pelo teste de Tukey e foi observada diferença significativa na frequência de MN dos animais do manguezal de PO na Paraíba.

Durante a coleta, pescadores de Pontinhas informaram do perigo da região e foram observados, juntamente com produtos lubrificantes e ferramentas, restos de peças de motos. A equipe acreditou se tratar de um local de desmanches. O que levou a hipótese: Será que os produtos utilizados como lubrificantes e/ou combustível dos veículos podem estar contaminando o ambiente e interferindo na saúde da espécie? Por sua vez, mesmo apresentando um resultado estatístico significativo, a frequência de MN em Rio Formoso é bem próxima a de Pontinhas, e devido ao grupo realizar trabalhos na região há alguns anos tem-se observado o acréscimo de atividades turísticas e o aumento de barcos.

Nos trabalhos mencionados anteriormente para mexilhões que realizam a biomagnificação de metais pesados Villela et al. (2006) encontraram no mexilhão dourado *Limnoperna fortunei*, ao expô-lo a 1,88  $\mu\text{g/mL}$  de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) por 24h, uma frequência 8,7% de micronúcleos entre as 4.000 células contadas, enquanto Geremia (2015) quantificou nos hemócitos dos mexilhões *Perna perna* encontrados na Plataforma de Tramandaí – RS uma frequência de 6,25% de MN em 1000 células contadas. Esses resultados fortalecem a hipótese de ações antrópicas, especificamente as relacionadas à poluição ambiental pela utilização de produtos químicos e combustíveis fósseis, ambas fontes de metais pesados, tanto nos barcos, quanto nas motos, serem uma possível fonte dos danos celulares observados na espécie *L. angulifera* dos manguezais de PO (Paraíba) e RF (Pernambuco). O

intervalo de confiança de Wilson aplicado para as variáveis AP, BN e MN podem ser analisados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados do intervalo de confiança em nível de 95% de confiança (IC95%), para as variáveis micronúcleo – MN, binucleação – BN e apoptose – AP de Manguezais de PB e PE.

Local	Variável	Estatística descritiva			Frequência (%)	
		N	p	s	w-	w+
BC	MN	5000	0,009	0,0013	0,0068	0,0120
BM		5000	0,0084	0,0013	0,0062	0,0113
RA		5000	0,0078	0,0012	0,0057	0,0106
PO		5000	0,0148	0,0017	0,0118	0,0185
BC	BN	5000	0,002	0,0006	0,0011	0,0036
BM		5000	0,0026	0,0007	0,0016	0,0044
RA		5000	0,0046	0,0010	0,0031	0,0069
PO		5000	0,0062	0,0011	0,0044	0,0088
BC	AP	5000	0,0014	0,0005	0,0007	0,0028
BM		5000	0,0012	0,0005	0,0006	0,0025
RA		5000	0	0,0000	0,0004	0,0004
PO		5000	0,0014	0,0005	0,0007	0,0028
BT	MN	5000	0,0084	0,0013	0,0062	0,0113
CV		5000	0,008	0,0013	0,0059	0,0108
MF		5000	0,0102	0,0014	0,0078	0,0134
RF		5000	0,0144	0,0017	0,0115	0,0181
BT	BN	5000	0,0018	0,0006	0,0010	0,0034
CV		5000	0,0004	0,0003	0,0002	0,0013
MF		5000	0,0024	0,0007	0,0014	0,0041
RF		5000	0,01	0,0014	0,0076	0,0131
BT	AP	5000	0,0014	0,0005	0,0007	0,0028
CV		5000	0,002	0,0006	0,0011	0,0036
MF		5000	0,0026	0,0007	0,0016	0,0044
RF		5000	0,0146	0,0017	0,0117	0,0183

n = tamanho da amostra; p = proporção média; s = desvio padrão da proporção p.

Manguezais da Paraíba (PB) Barra de Camaratuba – BC, Barra de Mamanguape – BM, Rio Abiaí – RA e Pontinhas – PO e de Pernambuco (PE) Barra de Catuama – BT, Carne de Vaca – CV, Maria Farinha – MF e Rio Formoso – RF

Fonte: Autora (2021)

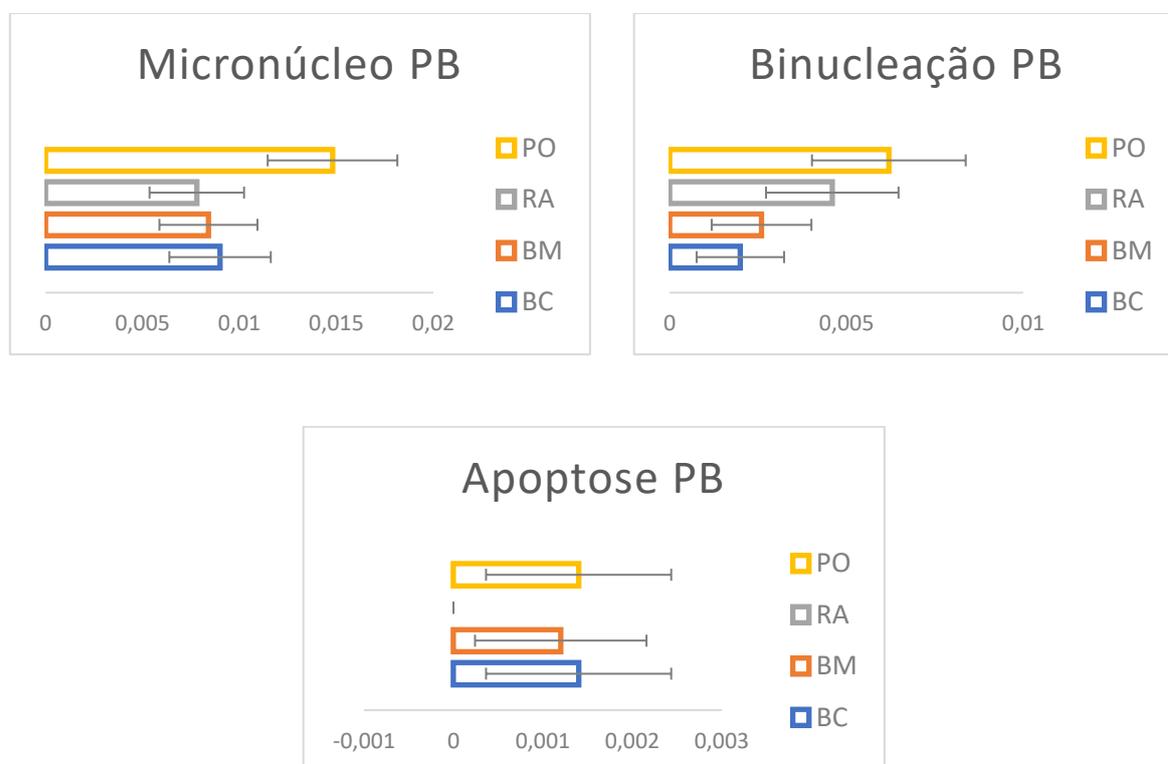
Os resultados do intervalo de confiança de Wilson estão representados como barra nos gráficos das Figuras 16 e 17. Eles mostram indícios estatísticos de diferenças entre as proporções médias em nível de 95% de confiança para os

manguezais estudados de cada estado.

Na Figura 16 é possível observar o resultado do intervalo de confiança de Wilson em nível de 95% de confiança das variáveis AP, BN e MN dos animais dos manguezais da Paraíba estudados.

Para o Micronúcleo, observa-se a diferença significativa dos animais de Pontinhas – PO quanto à proporção média para todos os outros manguezais estudados (RA, BM e BC). Quanto à Binucleação os manguezais Barra de Mamanguape – BM e Barra de Camaratuba – BC apresentaram indícios de diferença estatística do manguezal PO, mas não do manguezal Rio Abiaí – RA. Para a variável Apoptose, os manguezais não apresentaram indícios de diferença significativa, exceto os animais de RA, contudo, em razão dos valores serem iguais a zero, esse resultado tem forte indício de também não ser significativamente diferente em nível de 95% de confiança.

Figura 16 – Intervalo de confiança de Wilson a 95% de confiança dos danos citotóxicos observados nos espécimes dos manguezais da Paraíba-PB.



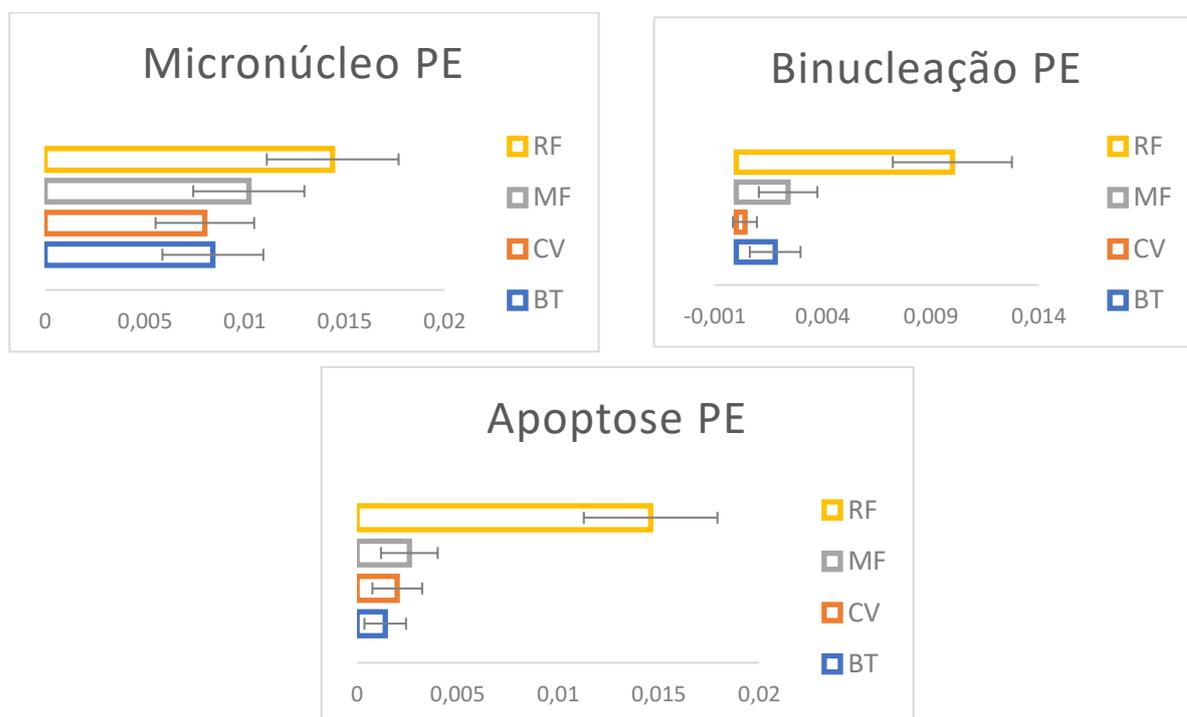
BC- Barra de Camaratuba, BM – Barra de Mamanguape, RA – Rio Abiaí, PO – Pontinhas

Fonte: AUTORA (2021).

Na Figura 17 as variáveis AP, BN e MN representadas são de animais dos

manguezais de Pernambuco. A variável Micronúcleo em animais de Barra de Catuama – BT e Carne de Vaca – CV apresenta indícios de diferenças estatísticas de Rio Formoso – RF. Quanto à Binucleação, os animais do manguezal CV diferem de todos os outros manguezais, os manguezais BT e MF tem indícios estatísticos de similaridade, porém diferem de RF. Para a variável Apoptose, os animais dos manguezais BT, CV e MF diferem de RF.

Figura 17 – Intervalo de confiança de Wilson a 95% de confiança dos danos observados nos espécimes dos manguezais de Pernambuco-PE.



BC- Barra de Camaratuba, BM – Barra de Mamanguape, RA – Rio Abiaí, PO – Pontinhas

Fonte: AUTORA (2021).

Com o intervalo de confiança de Wilson, que considera a proporção média das variáveis do teste do micronúcleo utilizados nesse estudo, há indícios significativos que o número de 5000 células contadas para analisar a genotoxicidade de cada manguezal representa chances de 95% de confiança de serem a representação da população, refutando a necessidade de análise de 10.000 células (PINHEIRO et al., 2013).

O teste do micronúcleo é um teste genotóxico rápido que mede danos estabelecidos em um grupo de células. Este teste foi utilizado neste trabalho com moluscos da espécie *L. angulifera* para observar a relação dos impactos

antropogênicos aos possíveis danos ao sistema de defesa destes moluscos (SANTOS, 2016). Para compreender se há correlação desses danos com a capacidade de acumular Cu e Zn em seus órgãos foi realizado análise espectrométrica desses elementos presentes em sua hemolinfa.

#### 4.3 CONCENTRAÇÕES DE CU E ZN EM HEMOLINFA DE CARAMUJOS *L. angulifera* COLETADOS EM MANGUEZAIS DA PARAÍBA E PERNAMBUCO

Concentrações de Cu e Zn foram quantificadas na hemolinfa de caramujos da espécie *L. angulifera* pela técnica de Absorção Atômica por Forno de Grafite – GFAAS, os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados estão apresentados na Tabela 10. A média das concentrações em ppm ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) e as incertezas expandidas calculadas a partir da leitura do padrão analítico estão descritas abaixo, considerando a incerteza analítica expandida de 40% (valor admitido para análises ambientais (KISSLING et al., 2007; SANTOS, 2016; SCHMILDT, et al., 2017).

Tabela 10 – Concentrações médias dos elementos químicos em  $\text{mg.kg}^{-1}$ , número de amostras (n) e incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança (em %) da hemolinfa de caramujos *L. angulifera* de manguezais da Paraíba – PB (Barra de Camaratuba- BC, Barra de Mamanguape – BM, Pontinhas – PO e Rio Abiaí – RA) e Pernambuco – PE (Barra de Catuama – BT, Carne de Vaca – CV, Maria Farinha – MF e Rio Formoso – RF).

Estado	Local	N	Cu		Zn	
			Média	U(%)	Média	U(%)
PB	BC	5	36801	7822	0,42	0,038
	BM	5	40091	8521	0,48	0,043
	PO	5	46953	9979	0,81	0,073
	RA	5	<u>42728</u>	<u>9081</u>	<u>0,50</u>	<u>0,045</u>
PE	BT	5	22215	230	0,85	0,098
	CV	5	<u>25656</u>	<u>265</u>	<u>0,69</u>	<u>0,079</u>
	MF	5	20646	213	1,19	0,137
	RF	5	24789	256	0,64	0,0748

n= número de animais

U – Incerteza expandida

Fonte: AUTORA (2021).

Para o elemento químico Cu as maiores concentrações foram observadas na hemolinfa dos animais da Paraíba, com concentração média de  $41.643 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Enquanto em Pernambuco, as concentrações médias ficaram em torno de  $23.326 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Sobre esse elemento químico, sabe-se que se trata do principal componente da hemolinfa desses animais (GIBSON et al., 2016). No organismo, a carência de cobre leva a uma deficiência humoral, mas as consequências do excesso são pouco conhecidas (SANTOS, 2005). Contudo, as altas concentrações observadas nos animais da Paraíba podem estar associadas à contaminação desses manguezais, pois o acúmulo de cobre no meio ambiente pode ocorrer devido à ações antrópicas oriundas de processos industriais, sejam por fungicidas utilizados em atividades agrícolas, ou uso de canos de cobre ou soldas (ZHANG et al., 2018). Pela tendência a concentrar esse elemento na glândula digestiva e gônadas (SANTOS, 2016), acredita-se que o excesso de Cu na hemolinfa seja reflexo dessa acumulação no órgão e em todo o organismo (MÉLO, 2019).

Para Zn, as maiores concentrações foram observadas na hemolinfa de animais de PO ( $0,81 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) na Paraíba e MF ( $1,19 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) em Pernambuco, no qual os animais de MF acumularam mais Zn em sua hemolinfa que os de PO. Os animais coletados nos manguezais de Pernambuco acumularam mais Zn do que os encontrados na Paraíba, apontando haver excesso desse elemento químico nesses manguezais. Esse excesso de Zn nos manguezais PO (PB) e MF (PE) também foi observado por Mélo (2019) em análise de tecido mole de *L. angulifera* (PO –  $690 \text{ mg.kg}^{-1}$  e MF –  $1.650 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Nenhum dado foi encontrado sobre a presença de Zn na hemolinfa de *L. angulifera*, sendo esse estudo o primeiro a ser realizado na espécie. Todavia, sabe-se que tem função essencial no sistema imunológico (SANTOS, 2005). Os animais do manguezal de PO (7,4%) apresentaram maior frequência de MN para o estado da Paraíba, levando ao questionamento: altas concentrações desse elemento químico na hemolinfa poderiam contribuir para o dano genotóxico? Associar os danos citotóxicos e genéticos nas células do sistema de defesa (hemócitos) destes moluscos exclusivamente às concentrações de Cu e Zn quantificadas ainda não é possível, em razão de outros elementos químicos tóxicos não terem sido quantificados, como o As, com altas concentrações no manguezal de RF em Pernambuco e PO, na Paraíba (MÉLO, 2019).

Os dados de citotoxicidade nas células de defesa na hemolinfa são originais e de grande importância. A análise de elementos químicos em hemolinfa é descrita na

literatura para outras espécies de moluscos, contudo não apresentam testes genotóxicos associados (SANTOS et al. 2005; NUNES 2009; BUA et al. 2017). Os trabalhos associam as diferentes concentrações dos elementos químicos à contaminação ambiental e hábito alimentar. Assim, esse estudo comprova uma citotoxicidade proporcional à concentração dos elementos químicos no ambiente, fortalecendo o uso dessa espécie em estudos de biomonitoração.

#### 4.4 CONCENTRAÇÕES DOS ELEMENTOS QUÍMICOS CU E ZN EM ÓRGÃOS DE *L. angulifera* DE MANGUEZAIS DA PARAÍBA E PERNAMBUCO

A concentração de Cu e Zn nos manguezais da Paraíba BC- Barra de Camaratuba, BM – Barra de Mamanguape, RA – Rio Abiaí, PO – Pontinhas e de Pernambuco BT- Barra de Catuama, CV – Carne de Vaca, MF – Maria Farinha, RF – Rio Formoso foi quantificada pela técnica analítica Absorção Atômica por Chama – FAAS. As soluções das amostras foram analisadas em duplicata e as médias quantificadas foram corrigidas pelo Branco e Fator de diluição. A incerteza analítica expandida, produto da incerteza combinada com um fator k, foi de 20%. Este método de análise é utilizado rotineiramente no SEAMB para análise das amostras no FAAS.

As concentrações médias, os valores mínimo e máximo dos elementos químicos Cu e Zn em mg kg<sup>-1</sup>, bem como o desvio padrão (DP) e o número de amostras (n) estão apresentados nas Tabelas 11 e 12. É possível observar as concentrações dessas variáveis para os órgãos: glândula digestiva – GD e demais componentes da massa visceral – DCMV dos caramujos *L. angulifera* dos manguezais de Pernambuco e da Paraíba abaixo (Tabela 11).

Tabela 11 – Estatística descritiva estratificada das concentrações de Cu e Zn em mg.kg-1 nos órgãos Glândula Digestiva – GD e Demais Componentes da Massa Visceral – DCMV de *L. anguilifera* nos manguezais estudados do estado de Pernambuco e da Paraíba.

Estado	Local	Órgão	N	Zn				Cu			
				Média	DP	Mínimo	Máximo	Média	DP	Mínimo	Máximo
PB	BC	GD	5	775,01	282,79	361,76	1043,25	55,72	8,76	48,38	70,90
	BC	DCMV	5	83,19	18,59	61,91	106,02	61,43	12,53	41,46	72,58
	BM	GD	5	2436,56	1082,94	1163,8	3617,67	115,04	43,17	68,55	176,62
	BM	DCMV	5	205,96	56,49	128,73	282,39	72,04	9,01	62,71	85,23
	PO	GD	5	3033,73	212,62	2802,3	3316,52	1381,03	354,13	1003,82	1843,74
	PO	DCMV	5	200,94	30,81	177,09	252,10	257,08	93,29	199,70	422,14
	RA	GD	5	1052,45	228,64	830,10	1388,94	75,40	29,02	47,19	117,77
	RA	DCMV	5	93,15	34,56	49,62	145,47	58,93	10,97	45,50	73,52
PE	BT	GD	5	1338,24	366,85	851,39	1801,69	115,38	15,79	89,96	133,04
	BT	DCMV	5	104,13	27,93	75,62	139,67	54,80	10,12	39,24	66,26
	CV	GD	5	2080,54	529,77	1250,1	2597,62	173,76	86,30	95,92	314,74
	CV	DCMV	5	241,29	261,45	85,80	703,71	61,74	10,71	47,63	72,38
	MF	GD	5	3535,08	2074,45	717,80	5652,39	1227,79	414,47	750,51	1744,13
	MF	DCMV	5	1839,97	1985,01	274,39	4656,09	186,06	25,72	158,85	216,78
	RF	GD	5	494,49	124,55	330,40	662,85	63,11	11,14	55,81	82,52
	RF	DCMV	5	84,71	32,62	57,91	138,70	49,12	7,15	42,42	58,80

Manguezais da Paraíba (PB) Barra de Camaratuba – BC, Barra de Mamanguape – BM, Rio Abiaí – RA e Pontinhas – PO e de Pernambuco (PE) Barra de Catuama – BT, Carne de Vaca – CV, Maria Farinha – MF e Rio Formoso – RF

Fonte: AUTORA (2021).

A partir da quantificação dos elementos químicos Cu e Zn nos órgãos GD, P e DCMV, altas concentrações foram encontradas na glândula digestiva de *L. anguilifera*, corroborando ao trabalho de Santos (2016), que observou elevada capacidade de acumulação desse órgão em *L. anguilifera* do manguezal do Espaço Ciência (393 mg kg<sup>-1</sup> de Cu e 20.600 mg kg<sup>-1</sup> de Zn). Altas concentrações de Cu e Zn em hepatopâncreas de outras espécies de invertebrados também são citadas na literatura. Como os estudos de Green e Walmsley (2013), em joaninhas da espécie

*Coccinella septempunctata* e Bordon et al. (2016) em estudo realizado com espécie de siri *Callinectes danae* em estuário antropizado. Especificamente para o Zn, o estudo de Pagano et al. (2017) com o bivalve *Mytilus galloprovincialis* observou danos mais evidentes nos hemócitos que nas células da glândula digestiva. Todos justificam as elevadas concentrações de Cu e Zn no hepatopâncreas/ ou glândula digestiva por se tratar de um órgão que é responsável pela detoxificação do organismo pela ação das enzimas da família das metalotioneínas presente nestes animais.

As maiores concentrações de Cu e Zn, foram respectivamente 1.23 mg.kg<sup>-1</sup> e 3.53 mg.kg<sup>-1</sup> na GD dos animais de Maria Farinha – PE e 1.38 mg.kg<sup>-1</sup> e 3.03 mg.kg<sup>-1</sup> na GD dos animais de Pontinhas em PB, manguezais cujo animais também apresentaram altas concentrações desses elementos químicos na hemolinfa, possibilitando que seja feito com a espécie *L. angulifera* estudos de bioacumulação, sem necessitar do sacrifício dos animais, bem como a biomonitoração de manguezais utilizando os mesmos espécimes.

Para a análise de Cu e Zn em órgãos, as maiores concentrações encontram-se nos animais dos manguezais de Pontinhas na Paraíba e Maria Farinha em Pernambuco, corroborando a relação observada por Mélo (2019) para corpo todo de *L. angulifera* nesses mesmos manguezais. Há uma relação na absorção desses elementos químicos nos órgãos: os locais que mais acumulam Cu, também são os que mais acumulam Zn, semelhante ao que ocorre na hemolinfa. Essa característica foi observada no órgão DCMV dos animais da Paraíba (Cu = 257 mg.kg<sup>-1</sup> e Zn = 201 mg.kg<sup>-1</sup> em PO) e de Pernambuco (Cu = 186 mg.kg<sup>-1</sup> e Zn = 1.834 mg.kg<sup>-1</sup> em MF) e no pênis dos animais da Paraíba (Cu = 47 mg.kg<sup>-1</sup> e Zn = 742 mg.kg<sup>-1</sup> em PO) e de Pernambuco (Cu = 78 mg.kg<sup>-1</sup> e Zn = 764 mg.kg<sup>-1</sup> em MF). Nos DCMV a concentração de Zn foi maior nos animais encontrados nos manguezais de Maria Farinha – PE que nos de Pontinhas – PB, correspondendo ao observado na análise de Zn na hemolinfa dos animais desses manguezais, o que reforça a viabilidade de estudos de biomonitoração de manguezais pela análise da hemolinfa.

Nos órgãos DCMV dos animais que não apresentaram elevadas concentrações de Cu e Zn, (como nos DCMV do manguezal de BM), foi observada uma alta concentração de Zn (206 mg.kg<sup>-1</sup>) que não foi acompanhada de uma alta concentração de Cu (72 mg.kg<sup>-1</sup>). Segundo Dvorac et al. (2019), em invertebrados aquáticos a ação da metalotioneína pode ser induzida por íons de Zn. Como sua

atuação se concentra no armazenamento de íons metálicos enzimáticos e metabólicos, há um limiar de Zn que não foi alcançado no organismo do animal e, por sua vez, não induziu à acumulação de Cu nos órgãos dos *L. angulifera* desses manguezais.

Para análise do órgão pênis – P, por se tratar de um órgão de pouca massa, não foi possível analisar mais de 1 amostra por manguezal, o total de indivíduos que compõem cada n pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12 – Estatística estratificada das concentrações médias de Cu e Zn em mg.kg<sup>-1</sup> no Pênis – P de *L. angulifera* nos manguezais estudados do estado de Pernambuco e da Paraíba.

Estado	Local	N	Indivíduos	Zn	Cu
PB	BC	1	16	537,43	43,06
	BM	1	21	547,16	28,96
	PO	1	29	742,01	47,21
	RA	1	19	411,21	22,26
PE	BT	1	25	441,28	32,82
	CV	1	25	438,20	58,72
	MF	1	23	763,58	78,34
	RF	1	26	364,35	26,66

Manguezais da Paraíba (PB) Barra de Camaratuba – BC, Barra de Mamanguape – BM, Rio Abiaí – RA e Pontinhas – PO e de Pernambuco (PE) Barra de Catuama – BT, Carne de Vaca – CV, Maria Farinha – MF e Rio Formoso – RF.

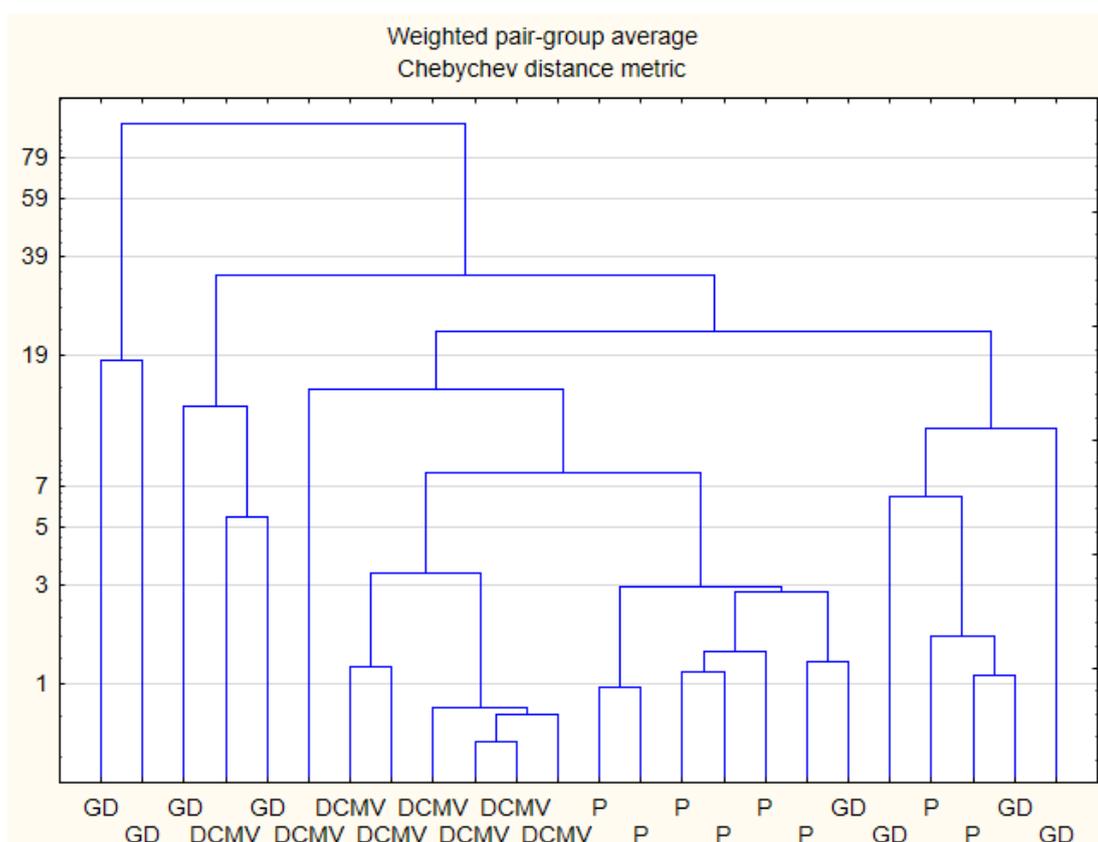
Fonte: AUTORA (2021).

Esse órgão, por se tratar de uma estrutura reprodutiva, pode auxiliar no caminhamento desses elementos químicos para fêmeas e por sua vez, para os ovos e larvas. Nos manguezais de Barra de Camaratuba (PB) e de Maria Farinha (PE), mesmo com número de machos menor, altas concentrações foram observadas, indicando haver nesses manguezais algum estoque desses elementos químicos. Para analisar a correlação entre a presença de Cu e Zn com os órgãos dos moluscos encontrados nos diferentes manguezais, foi realizada a padronização dos dados e, posteriormente, análise fatorial por componentes principais. Estes resultados foram utilizados na construção de dendrograma da análise de grupamento, análise de Cluster.

Esses dendrogramas foram criados combinando os grupos de pares ponderados e a distância de Chebyshev. Para melhor observação do agrupamento,

a escala de Log-1 foi aplicada no dendrograma. A análise de agrupamento leva em consideração a semelhança entre os vetores das médias, permitindo diferenciar as condições ambientais independentes, mensuradas por variáveis dependentes. Por se tratar de um dendrograma criado pela métrica máxima, a interpretação dos resultados se dá do centro para as pontas, no qual no centro estão agrupadas as variáveis com menores concentrações de Cu e Zn e nas extremidades as de maior concentração. Na figura 18, se observa o dendrograma dos órgãos de *Littoraria angulifera*.

Figura 18 – Dendrograma das cargas fatoriais para os órgãos de *Littoraria angulifera*: Demais componentes da massa visceral (DCMV), Glândula digestiva (GD) e Pênis (P)

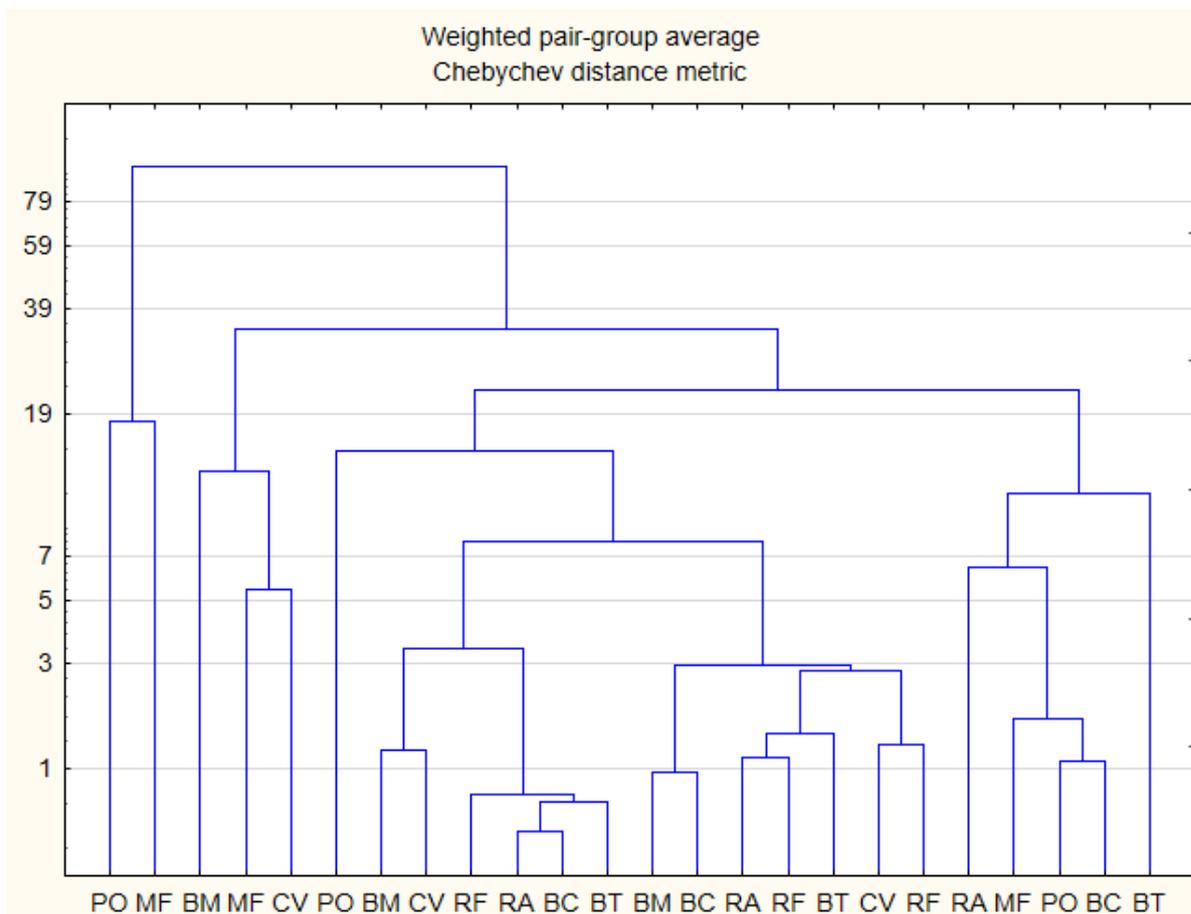


Fonte: AUTORA (2021).

É possível observar fortes relações entre os grupos de órgãos estudados quanto a acumulação de Cu e Zn. Foram nos órgãos Pênis (P) e Demais Componentes da Massa Visceral (DCMV) as variáveis com menor concentração de Cu e Zn. As Glândulas Digestivas, por estarem nas extremidades, são os órgãos que apresentaram uma maior concentração dos elementos químicos estudados. Contudo, as relações entre GD de alguns manguezais são fracas por eles estarem

mais distantes. O segundo dendrograma construído com os componentes principais para o fator Manguezal desse estudo encontra-se na Figura 19.

Figura 19 – Dendrograma das cargas fatoriais dos manguezais da Paraíba Barra de Camaratuba (BC), Barra de Mamanguape (BM), Rio Abiaí (RA) e Pontinhas (PO) e de Pernambuco Barra de Catuama (BT), Carne de Vaca (CV), Maria Farinha (MF) e Rio Formoso (RF).



Fonte: AUTORA (2021).

A mesma interpretação ocorre para esse dendrograma, há fortes correlações entre os grupos RF, RA, BC e BT, que são os locais com menores concentrações de Cu e Zn para DCMV. As correlações entre os grupos podem ser sobrepostas e, dessa forma, é possível observar que o processo de acumulação nos Demais Componentes da Massa Visceral dos animais de MF se assemelha à acumulação na Glândula Digestiva de Carne de Vaca, pois ambos se encontram agrupados a esquerda do dendrograma.

Com o objetivo de compreender as vias de acumulação de Cu e Zn pelos órgãos, também foi realizada a análise desses elementos químicos no sedimento em suspensão dos manguezais estudados. A hipótese de serem os Sedimentos em

Suspensão a via do excesso de Cu e Zn encontrado em *L. angulifera* foi uma hipótese levantada por França et al. (2017) que mostrou ser o SS o compartimento que mais acumula o Zn em manguezal urbano.

#### 4.5 SEDIMENTO EM SUSPENSÃO (SS) EM ESTUÁRIOS DOS MANGUEZAIS DA PARAÍBA E DE PERNAMBUCO

Os manguezais da Paraíba e de Pernambuco foram analisados quanto a concentração de Cu e Zn no Sedimento em Suspensão, as concentrações médias e incertezas podem ser observadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Concentração de Cu e Zn em Sedimento em Suspensão nos manguezais da Paraíba e Pernambuco estudados.

Estado	Local	Cu (mg.kg <sup>-1</sup> )		Zn (mg.kg <sup>-1</sup> )	
		média	U%	Média	U%
PB	BC	2,35	0,40	-1,27	-0,36
	BM	2,61	0,44	1,29	0,37
	RA	12,60	2,13	3,64	1,04
	PO	12,73	2,15	24,18	6,87
PE	CV	-23,58	-3,98	21,21	6,03
	BT	5,79	0,98	5,39	1,53
	MF	16,87	2,85	19,29	5,48
	RF	1,15	0,19	10,29	2,93

U – Incerteza expandida a 95%. Da Paraíba: Barra de Camaratuba (BC), Barra de Mamanguape (BM), Rio Abiaí (RA) e Pontinhas (PO) e de Pernambuco: Barra de Catuama (BT), Carne de Vaca (CV), Maria Farinha (MF) e Rio Formoso (RF).

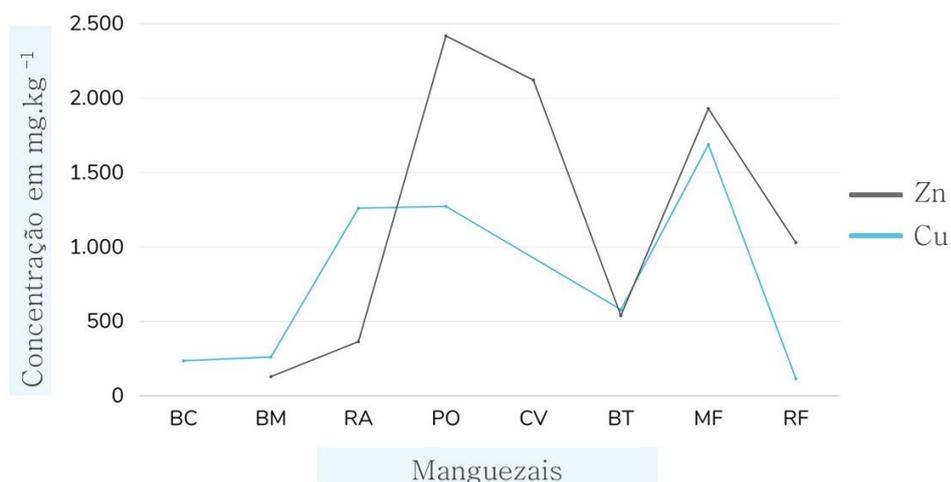
Fonte: AUTORA (2021).

Os valores foram colocados em gráfico que distribui os manguezais no sentido Litoral Norte para Sul (Figura 20), começando do ponto mais a jusante, o manguezal de BC e terminando em RF. Por isso, não serão pormenorizados os estados a que esses pertencem. Em SS de CV, o resultado da quantificação de Cu foi fora do limite de detecção e a concentração de Zn para BC também, por esta razão foram identificadas em vermelho.

Segundo a resolução 353/2005 do CONAMA (BRASIL 2005) para água salobra, a qual se enquadra água de estuário, na classe 2 são enquadradas as águas que

podem ser destinadas à pesca amadora e à recreação de contato secundário, os padrões de parâmetros inorgânicos de Cu dissolvido é de  $0,0078 \text{ mg.kg}^{-1}$  e de Zn total é de  $0,12 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Os valores dos sedimentos em suspensão retirados das águas dos manguezais estudados para esses dois elementos químicos inviabilizam seu uso como classe 2, só podendo ser utilizada, de acordo com a resolução, como classe 3, em que não há parâmetros para os elementos químicos, pois a destinação só aconteceria para navegação e harmonização paisagística. O que não foi observado durante as coletas. Pescadores e/ou viveiro de carcinicultura foram observados em todos os manguezais estudados.

Figura 20 – Concentrações médias ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) de Cu e Zn de sedimentos em suspensão em função dos manguezais da Paraíba e de Pernambuco analisados.



BC- Barra de Camaratuba, BM – Barra de Mamanguape, RA – Rio Abiaí, PO – Pontinhas, CV – Carne de Vaca, BT- Barra de Catuama MF – Maria Farinha, RF – Rio Formoso.  
Fonte: AUTORA (2021).

Os elevados valores de Cu observados no SS de PO ( $12,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), RA ( $12,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e MF ( $16,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), em novembro de 2018, também foram encontrados no Rio Ipojuca em maio ( $11,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e em setembro ( $10,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) de 2014 em estudo de Silva et al. (2015). Os autores justificaram as variações serem em razão da diminuição das chuvas durante os meses de coleta. Todavia, neste estudo não houve flutuação de temporadas, por isso as altas concentrações de Cu devem-se à influência de contaminação antrópica como sugerem Zhang et al. (2018) e Qiao et al. (2020).

Os resultados elevados de Zn no SS de PO ( $24,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), CV ( $21,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), MF ( $19,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e RF ( $10,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) podem estar relacionados à agricultura e

utilização de fertilizantes nos solos, bem como eliminação de resíduos poluentes da atmosfera pelas indústrias (MARIANI, 2006) devido ao posicionamento geográfico desses manguezais. Silva et al. (2015) acreditam serem os estuários os estoques de elementos traços, afinal apenas cerca de 10% dos elementos traço transportados pelos rios desaguam no mar (MARTIN; WHITFIELD, 1983).

Os resultados elevados de Cu e Zn em PO e MF corroboram ao observado nesse estudo, pois são os locais em que os caramujos se encontram com excesso desses elementos nos órgãos e na hemolinfa. O excesso de Zn em CV pode ser em razão desse receber algum efluente do Rio Tracunhaém que margeia o manguezal de PO, levando a fortes indícios que os animais de CV que ainda não apresentam excesso de Zn em seus órgãos e hemolinfa podem estar no início do seu processo de contaminação, como sugere Dvorac et al. (2019), devendo assim, haver nessa região uma maior biomonitoração desses animais, com a finalidade de observar e esclarecer dúvidas quanto ao processo de bioacumulação. Os valores mais altos de Zn em RF podem estar associados à crescente pressão antrópica nesse manguezal em decorrência de atividades turísticas relatadas nesse trabalho, e corroborada por Santos (2016) e Mélo (2019), que estudaram o manguezal de RF.

A concentração alta de Cu em RA também pode ser em razão da proximidade a PO. Ainda não há nos animais indícios dessa acumulação.

Buscando compreender possíveis relações entre danos genotóxicos, a acumulação e a presença dos elementos químicos Cu e Zn no SS de manguezais dos estados de PE e PB fez-se um levantamento da morfometria de *L. angulifera*.

#### 4.6 MORFOMETRIA DE MACHOS E FÊMEAS NOS MANGUEZAIS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA

Foram analisadas as variáveis dependentes Largura, Comprimento da concha e Massa do animal com a concha a média e o desvio padrão dos valores obtidos de todas as variáveis foram agrupados na Tabela 14. O mínimo de indivíduos analisados foi 52 e o máximo foi de 55 por manguezal estudado.

No manguezal paraibano PO houve um maior número de machos. Porém, o maior número de fêmeas presentes nos outros manguezais estudados corrobora ao estudo de Zeidan et al. (2020) que relata que, em manguezais da Bahia, também com *L. angulifera*, observaram mais fêmeas que machos.

Os moluscos coletados na Paraíba apresentaram média de comprimento entre 21,83-27,39 mm, a média de comprimento nos de Pernambuco variou de 19,83 e 25,96 mm. A média da largura para os animais da Paraíba foram de 1,81-1,46 mm, enquanto para Pernambuco a variação da média foi de 1,59-2,77 mm. Para a variável massa, nos animais da Paraíba pesaram entre 1,69 – 3,25 g e os animais de Pernambuco entre 1,53 – 3,05 g.

Tabela 14 – Estatística descritiva estratificada por Estado, Local e Gênero das variáveis morfométricas utilizadas em *L. angulifera*, Comprimento, Largura e Massa.

Estado	Local	Sexo	N Indivíduos	Comprimento- cc (mm)		Largura – ll (mm)		Massa – m (g)	
				Média	DP	Média	DP	Média	DP
PB	BC	F	36	24,31	2,16	12,67	1,20	2,78	0,65
	BC	M	16	23,94	1,88	12,56	1,03	2,68	0,52
	BM	F	33	25,79	2,16	13,52	1,06	2,95	0,64
	BM	M	21	24,52	1,81	12,86	0,96	2,66	0,52
	PO	F	26	21,96	1,91	11,73	1,00	1,69	0,34
	PO	M	29	21,83	2,12	11,31	1,04	1,70	0,37
	RA	F	36	27,39	2,46	14,47	1,28	3,25	0,74
	RA	M	19	26,84	2,06	14,21	1,03	3,16	0,57
PE	BT	F	28	25,96	2,62	13,93	1,15	2,52	0,61
	BT	M	25	24,96	1,88	13,40	0,76	2,21	0,49
	CV	F	30	21,80	1,85	11,33	0,76	1,53	0,27
	CV	M	25	22,08	2,18	11,32	1,14	1,53	0,38
	MF	F	29	20,10	1,59	10,59	0,87	1,68	0,41
	MF	M	23	19,83	2,17	10,30	1,06	1,53	0,50
	RF	F	29	25,00	2,41	12,72	1,36	3,02	0,64
	RF	M	26	24,92	2,77	12,38	1,30	3,05	0,71

Manguezais da Paraíba (PB) Barra de Camaratuba – BC, Barra de Mamanguape – BM, Rio Abiaí – RA e Pontinhas – PO e de Pernambuco (PE) Barra de Catuama – BT, Carne de Vaca – CV, Maria Farinha – MF e Rio Formoso – RF.

Fonte: Autora (2021).

O tamanho dos animais foi maior nos manguezais da Paraíba BC e RA. Os maiores animais presentes em manguezais de PE foram encontrados em Barra de Catuama. Todos os manguezais citados anteriormente foram os que menos

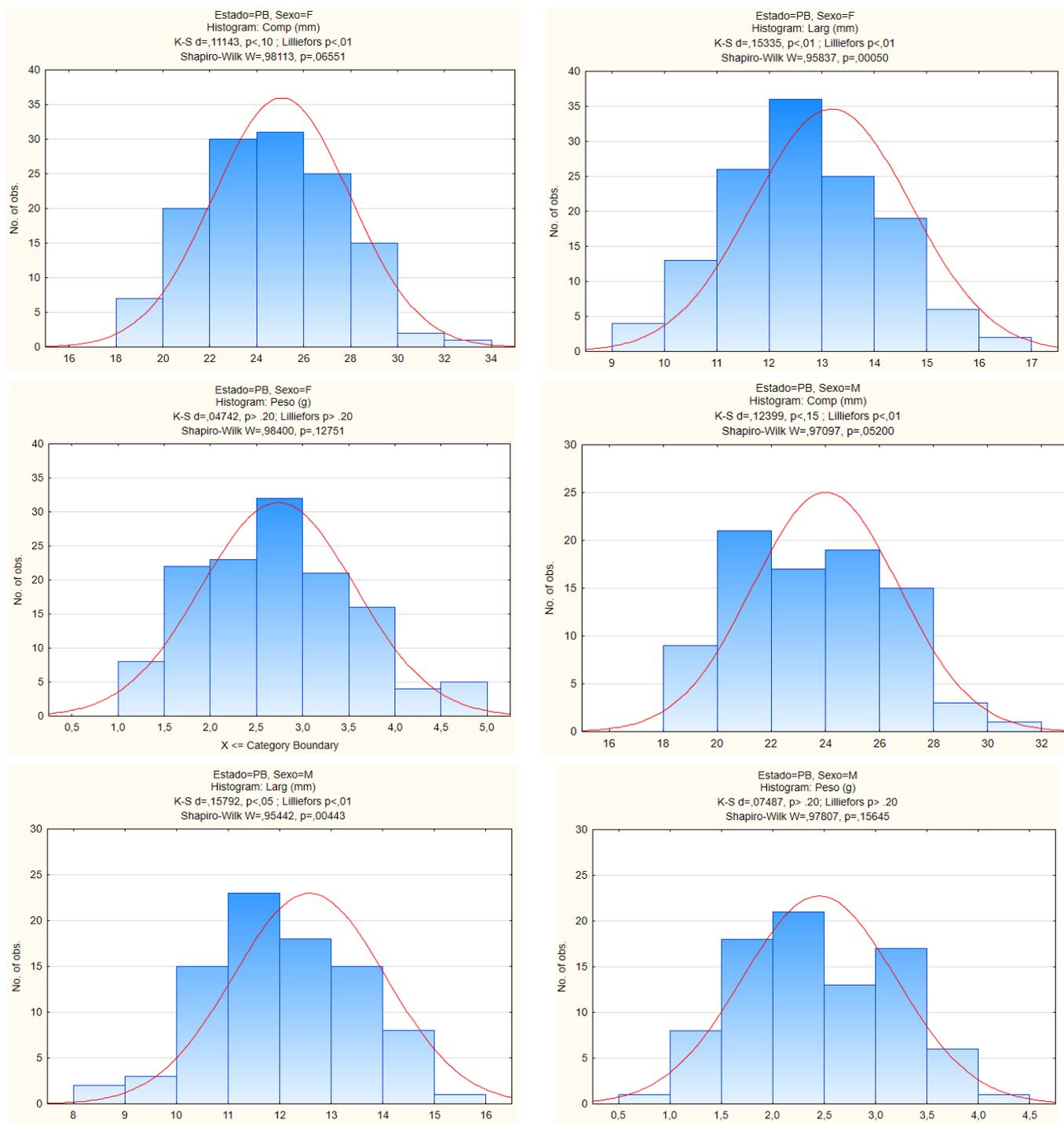
acumularam Cu e Zn, tanto em órgãos, quanto na hemolinfa, e também foram observados menos danos genotóxicos nos hemócitos dos animais desses manguezais, fortalecendo o sugerido por Freitas (2019), que tamanho e idade são proporcionais e para atingirem maiores tamanhos devem estar em ambientes equilibrados, e, por isso, com menos impacto antropogênico.

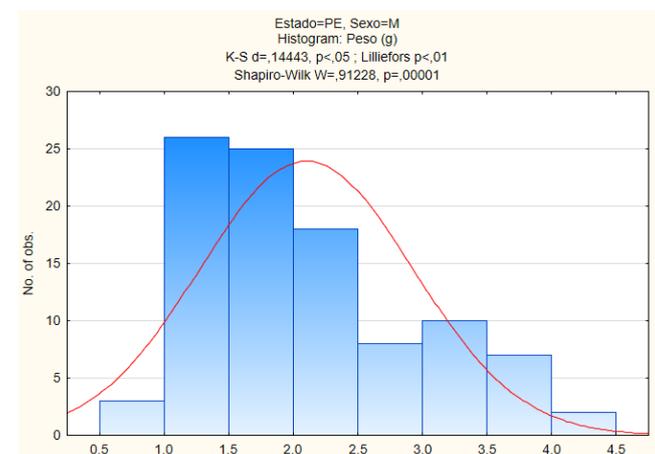
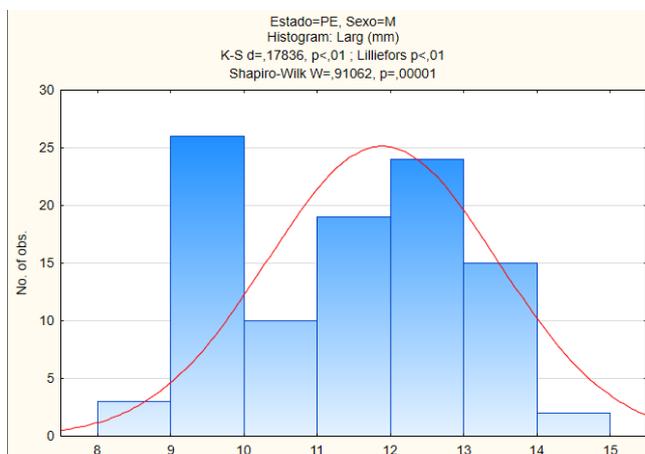
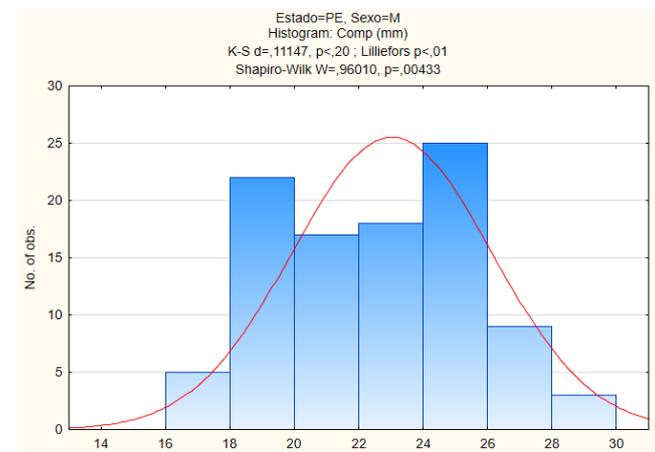
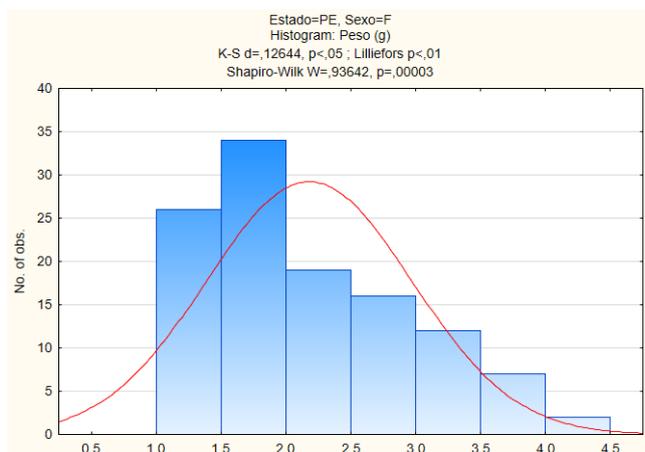
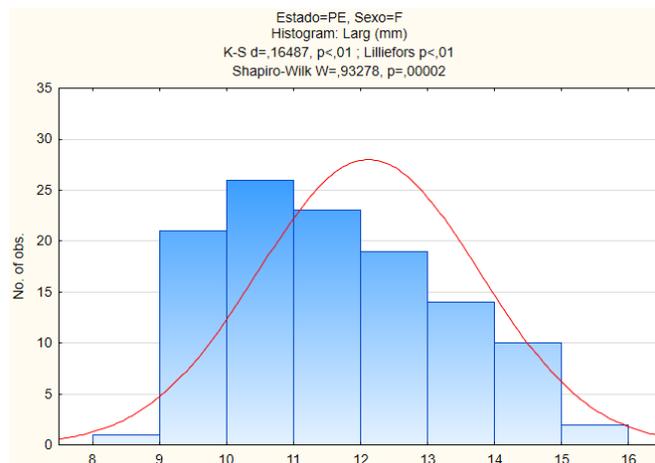
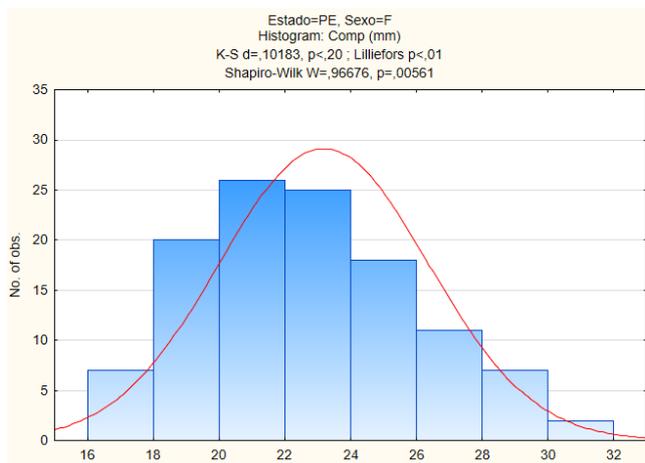
Os menores animais foram encontrados em PO (para as fêmeas cc: 21,96 ll:11,73 m: 1,69 e para os machos cc: 21,83 ll: 11,31 m:1,70) na Paraíba e em Pernambuco em CV (para as fêmeas cc: 21,80 ll:11,33 m:1,53 e para os machos cc: 22,08 ll: 11,32 m:1,53) e MF (para as fêmeas cc: 20,10 ll:10,59 m:1,68 e para os machos cc: 19,83 ll: 10,30 m:1,53).

O menor tamanho observado nos animais de PO e MF pode estar relacionado a maior pressão antrópica dessas áreas de estudo mostrado nesse trabalho, com os elevados valores de Cu e Zn na hemolinfa, nos órgãos dos espécimes e no Sedimento em Suspensão do manguezal. Os trabalhos de David (2019) no Ceará e Zeidan et al. (2020) na Bahia, também observaram indivíduos da espécie *L. angulifera* com menor comprimento de concha em locais mais urbanizados, corroborando aos resultados encontrados neste trabalho, refutando a hipótese sugerida por Chaves (2002); Melo et al., (2012) que animais de tamanho maior se encontrariam em ambientes mais antropizados, todavia que para alcançarem o tamanho maior precisariam sobreviver por mais tempo no ambiente.

Para observar uma diferença estatística entre as variáveis e analisar os dados, aplicou-se o teste de normalidade de Shapiro Wilk ( $p > 0,05$ ). Os histogramas estão apresentados na Figura 21. Nele observa-se a distribuição normal nos resultados das variáveis comprimento NA e massa (P) nos grupos de fêmeas (F) e machos (M) dos animais da Paraíba (C/F  $p = 0,06$ ; P/F  $p = 0,13$ ; C/M  $p = 0,52$ ; P/M  $p = 0,16$ ). A variável largura não teve distribuição normal, dessa forma não foi aplicada no teste estatístico, e segundo David (2019), essa variável não é eficiente morfometricamente para expressar o comprometimento do ambiente.

Figura 21 – Histograma do teste de normalidade de Shapiro Wilk agrupados por gênero de cada variável dependente analisada nos animais de PE e PB





Fonte: AUTORA (2021).

Nas variáveis que apresentaram resultados normais, foi aplicado o teste de variância (ANOVA) a dois critérios. A diferença foi significativa entre machos e fêmeas dos manguezais da Paraíba quanto a massa e o comprimento. Utilizamos o teste Tukey de comparações múltiplas e foi observado  $p = 0,000$  para as variáveis agrupadas quanto ao comprimento da concha e a massa. Para o gênero  $p = 0,048$  e para o local  $p = 0,042$ . As diferenças observadas são significativas, mas não são

dependentes, não sendo possível observar interação entre os fatores analisados (gênero, tamanho, massa e local). Segundo teste de Tukey, houve diferença significativa entre os gêneros para a massa e o comprimento dos animais de PO e RA, como mostra a Tabela 15.

Tabela 15 – Teste de Tukey para as variáveis massa e comprimento de conchas de caramujos *L. angulifera* da Paraíba e de Pernambuco

Variável	Local	Média	1	2	3	4	5
Comp.	BC	24,19	****				
	BM	25,30	****	****			
	PO	21,89			****		
	RA	27,20					****
Massa	BC	2,75		****			
	BM	2,84		****			
	PO	1,70	****				
	RA	3,22				****	

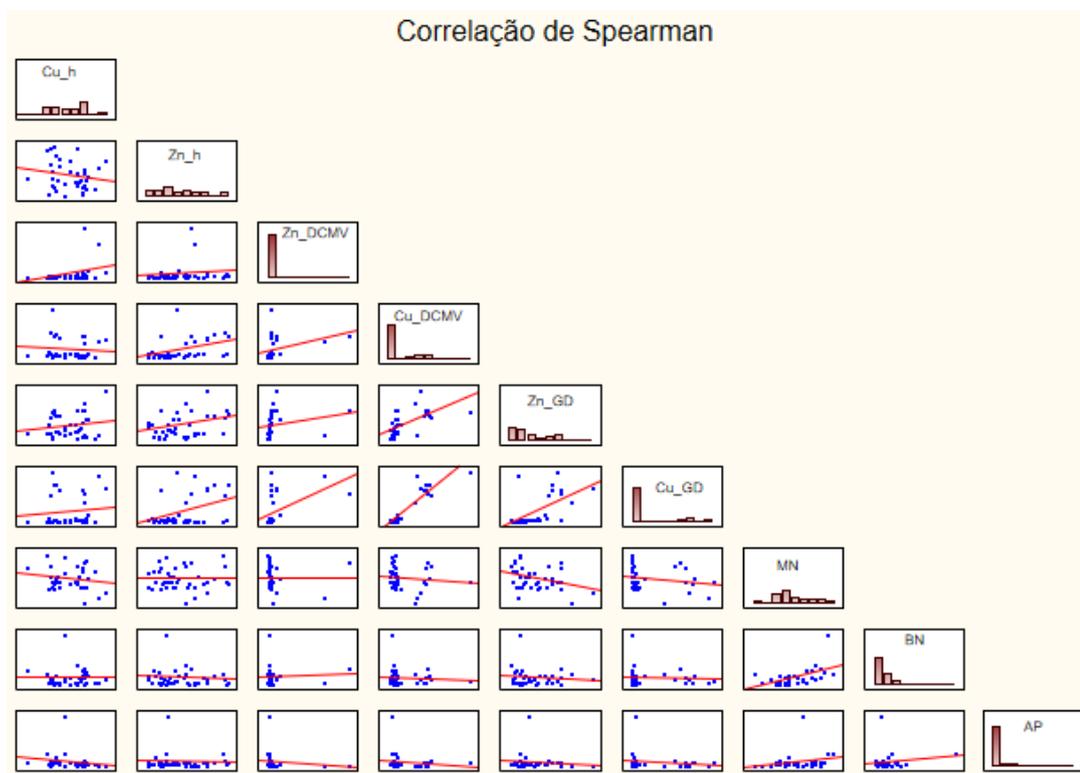
Fonte: Autora (2021).

#### 4.7 CORRELAÇÃO ENTRE TESTES GENOTÓXICOS E CONCENTRAÇÃO DE CU E ZN EM CARAMUJOS *LITTORARIA ANGULIFERA*

Para testar a correlação entre todas as variáveis estudadas fez-se o teste de correlação de Spearman com resultados entre 1 e -1 para explicar o grau de correlação. As variáveis Cu e Zn, dos órgãos GD e DCMV, Hemolinfa, Micronúcleo, Binucleação e Apoptose foram padronizadas e analisadas. Os resultados podem ser observados na matriz da Figura 22.

Foi possível observar correlações entre o Zn da hemolinfa com o Cu dos DCMV (0,5), o Cu quantificado na hemolinfa com a Apoptose (-0,5), MN com BN (0,6), Cu e Zn dos DCMV (0,6), porém, como os valores das correlações são baixos, esses resultados são classificados como moderados. Pela ausência de estudos que analisem os danos celulares, bem como a concentração de outros elementos químicos na hemolinfa e/ou órgãos, deve haver correlações entre os danos e os elementos químicos que esses animais acumulam ainda desconhecidos.

Figura 22 – Matriz de correlação de Spearman relacionando Cu e Zn com órgãos, hemolinfa, micronúcleo, binucleação e apoptose em células de *L. angulifera*.



Fonte: AUTORA (2021).

Nesse trabalho também foram observadas fortes correlações ( $>0,7$  ou  $>-0,7$ ) ou correlações significativas para as Zn da GD com Zn e Cu dos DCMV (0,7 cada), Cu da GD com Zn e Cu dos DCMV (0,7 cada) e Cu e Zn da GD (0,7). Reafirmando a relação e interação que há entre esses elementos químicos nos órgãos e tecidos de *L. angulifera*. Dados semelhantes foram encontrados por Santos (2016).

#### 4.8 ESTUDO DE CASO: CONTAMINAÇÃO DE CU E ZN EM CARAMUJOS *L. angulifera* DO RIO ABIAÍ INTRODUZIDOS NO MANGUEZAL DO ESPAÇO CIÊNCIA

Os resultados observados para a concentração de Cu e Zn na parte mole dos caramujos e o índice e frequência dos danos genéticos estão descritos na Tabela 16. Para os valores de Cu e Zn, a análise ocorreu em duplicata, para avaliação do dano genético, em triplicata, e cada lâmina composta por um único animal.

Tabela 16 – Concentração de Cu e Zn em corpo e avaliação de dano genético em hemócitos de *L. angulifera* durante ensaio de bioacumulação de 226 dias.

Amostras	Dias	n	Cu (mg.kg <sup>-1</sup> )		Zn (mg.kg <sup>-1</sup> )		ID	FD (%)
			Média	U%	Média	U%		
RA*	1	10	56	3	250	60	-	-
RA-EC1	37	8	53	14	283	13	-	-
RA-EC2	86	8	57	15	346	16	103,00 ± 10,82	94,67 ± 2,08
RA-EC3	125	3	87	23	866	40	104,00 ± 16,70	92,67 ± 7,51
RA-EC4	156	3	76	20	1396	65	112,67 ± 4,04	91,33 ± 2,08
RA-EC5	226	3	59	16	547	26	17,83 ± 1,76	16,67 ± 1,53
EC	365	3	89	24	780	36	17,00 ± 1,73	17,8 ± 1,73

n – Total de indivíduos por amostra.

\* - Valores presentes em Mélo (2019).

U – Incerteza expandida a 95%.

ID – Índice de Dano, média e desvio padrão.

FD – Frequência de Dano, média e desvio padrão.

RA – Rio Abiaí

EC – Espaço Ciência

Fonte: AUTORA (2021).

Em estudo realizado por Mélo (2019) com *L. angulifera* do Rio Abiaí não houve análise de dano genético, dessa forma não há valores de Índice e Frequência de Dano (ID e FD, respectivamente). Foi atribuído ao valor encontrado nos animais do RA o dia 1 e dos animais que vivem no EC 365 dias, 1 ano. Na primeira coleta (RA-EC1), realizada em janeiro de 2019 (37 dias) não havia sido testado o ensaio cometa na espécie, por isso a ausência de resultados de ID e FD. O total de indivíduos por amostra foi alterado, após a primeira coleta uma das árvores em que os animais foram transferidos, em função de chuvas, caiu. Tentou-se na segunda coleta (RA-EC2), em fevereiro (86 dias), manter o n de *L. angulifera*, todavia na terceira coleta (RA-EC3), em abril (125 dias), poucos animais estavam na árvore restante e três foi o número de animais utilizados para o teste do cometa, assim também foi o n de *L. angulifera* coletado e utilizado nas análises seguintes (RA-EC4 em maio e RA-EC5 em julho).

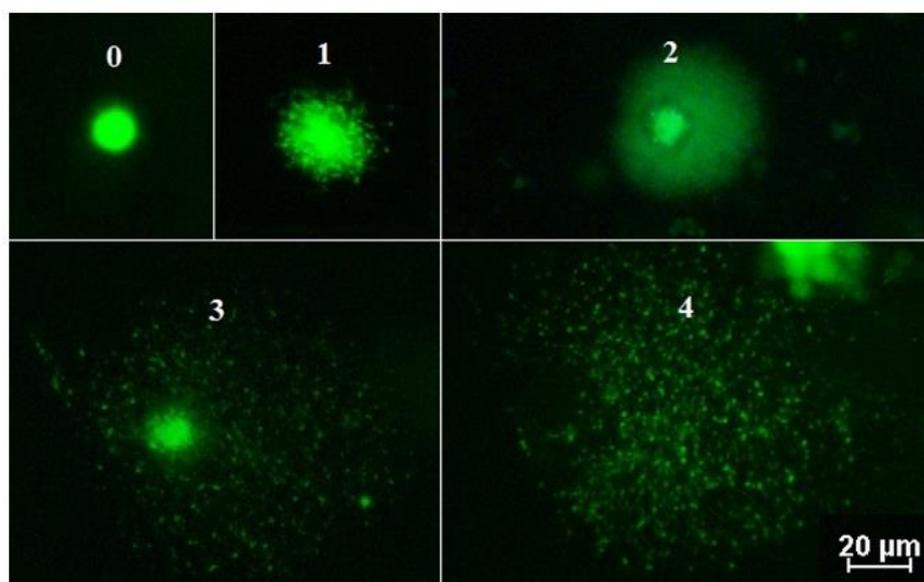
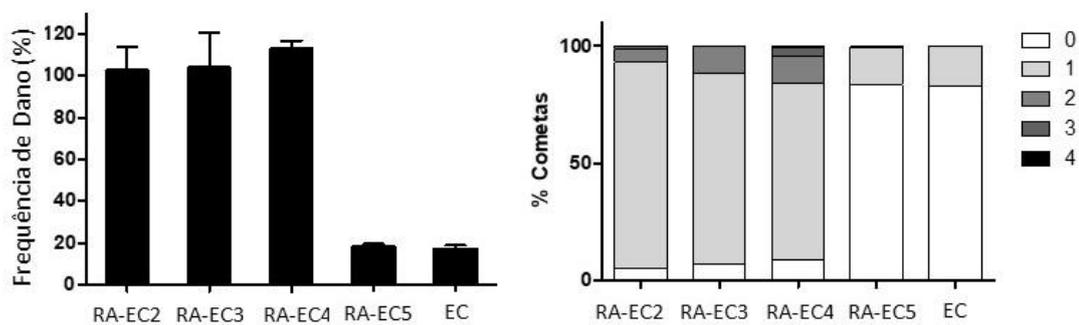
As variáveis foram padronizadas e testadas quanto a sua distribuição normal ( $p > 0,05$ ) e observou-se distribuição normal para os dias de exposição ( $p = 0,69$ ) valores de Cu ( $p = 0,06$ ) e Zn ( $p = 0,16$ ), e não normal para ID (0,02) e FD (0,01).

Assim, foram aplicadas as correlações de Pearson e Spearman respectivamente. Não foi observada correlação entre as variáveis Cu e Zn, contudo, de acordo com o teste de Spearman há uma correlação forte e negativa (-0,9) entre o tempo de exposição e a FD, ou seja, quanto maior o tempo de exposição, menor o percentual de danos genéticos.

Na Figura 23 é possível observar os danos no DNA causados pela exposição dos animais do RA no EC. Os danos genéticos ocorreram de forma crescente até o 156º dia de exposição, nos últimos 70 dias os valores observados nos animais transferidos se assemelharam aos dos endêmicos. Característica observada por Villela (2006), que ao aumentar o tempo de exposição do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* nas maiores concentrações de  $\text{CuSO}_4$ , observou que o dano genético foi menor. Esse mecanismo também foi observado por Pagano (2017) em células de glândula digestivas de *Mytilus galloprovincialis* expostas 72h e 7 dias a  $\text{CdCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$ . Em trabalho de Siqueira et al. (2021), também ocorreu o mesmo processo, em 15 dias de exposição a esgoto doméstico, caramujos *Biomphalaria glabrata* apresentaram menor dano genético que em 48 horas. Havendo nesses moluscos um limiar de dano que o organismo pode receber, porém, uma exposição prolongada ativa processos celulares de controle de dano.

A flutuação na concentração de Zn nos animais coletados em RA-EC3 para RAEC4 foi observada também no Índice de Dano, levando à hipótese desse elemento químico está relacionado ao dano no DNA (ensaio cometa) e no cromossomo dos hemócitos (teste do Micronúcleo), ambos realizados neste trabalho. A maioria das células analisadas apresentou grau 1 de fragmentação durante as primeiras análises, isso deve-se à exposição a elementos químicos tóxicos presentes no manguezal do EC (PAIVA, 2014; PAIVA et al., 2015; MÉLO, 2014; SANTOS 2016)

Figura 23 – Distribuição dos cometas em Frequência e Índice de Dano causadas pela exposição dos hemócitos de *L. angulifera* em manguezal antropizado. As categorias estão indicadas pelos números e sombreamento, a partir do branco (categoria 0) até a cor cinza escuro (categoria 4).



Fonte: AUTORA (2021).

Esses elementos químicos nos organismos dos moluscos levam à formação de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, ânions superóxido e radicais hidroxila, que por sua vez promovem estresse oxidativo celular e danos ao DNA (SIQUEIRA et al., 2021). A hipótese que o estoque para o contato dos animais de *L. angulifera* à altas concentrações de Cu e Zn se confirma pela análise do SS do RA e EC apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Valores de Cu e Zn em Sedimento em Suspensão nos manguezais do Rio Abiaí e no Espaço ciência.

Local	Cu (mg.kg <sup>-1</sup> )		Zn (mg.kg <sup>-1</sup> )	
	média	U%	Média	U%
RA	13	2	4	1
EC	123	21	652	185

U – Incerteza expandida a 95%

Fonte: AUTORA (2021).

Elevados valores de Zn em SS para a região haviam sido quantificados (LYRA, 2015; FRANÇA et al., 2017). Contudo a diferença entre as concentrações do SS de RA e EC para Zn é maior que 100x e não havia sido analisado concomitantemente a testes genotóxicos. Para Cu, a diferença entre as concentrações são de quase 10x, ambas refletidas nas altas concentrações desses elementos na parte mole do animal. Esses resultados de SS em EC revelam que as espécies que ainda resistem a esse impacto antropogênico podem não aguentar por muito tempo e que esse estuário é uma água inapta para qualquer atividade que não seja paisagística ou de navegação, de acordo com a resolução 353/2005 do CONAMA (BRASIL 2005).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A quantificação de elementos químicos em hemolinfa é determinante na realização de biomonitoração ambiental em espécies de invertebrados com baixa população.
- No teste do micronúcleo foram encontradas células binucleadas e em apoptose. Juntamente com o ensaio cometa mostraram ser aplicáveis com êxito na espécie *Littoraria angulifera*.
- A glândula digestiva, dentre o pênis e os demais componentes da massa visceral foi o órgão que mais acumulou os elementos químicos estudados (Cu e Zn).
- O sedimento em suspensão é o compartimento chave para se iniciar estudos de biomonitoração de Cu e Zn em manguezais, pois atuam como estoque desses elementos químicos.
- Os manguezais urbanizados de PO em Pontinhas e MF em Maria Farinha apresentam animais com maiores concentrações de Cu e Zn em todos os compartimentos biológicos estudados, e são também os manguezais com animais menores.
- Processos de detoxificação de Cu e Zn são realizados por *L. angulifera* mesmo em ambientes com elevada pressão antrópica.
- Danos genotóxicos em *L. angulifera* não podem ser justificados pela acumulação de Cu, porém o Zn pode estar relacionado a esses danos, sendo necessária análises com outros elementos químicos na mesma espécie para verificação desta hipótese.
- Por fim, com esse trabalho pode-se compreender alguns aspectos biológicos e ecológicos de *Littoraria angulifera*, bem como elucidar questionamentos relacionados ao acúmulo de Cu e Zn pela espécie e registrar o primeiro ensaio do cometa e análise de Cu e Zn em hemolinfa feito na espécie de caramujo de manguezal *L. angulifera*.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. C. S.; SOLFERINI, V. N. The influence of size on the radula of *Littoraria angulifera* (Gastropoda: Littorinidae). **Malacologia**, v. 49, p. 1-5, 2006.
- ARCAUTE C. R., SOLONESKI S., LARRAMENDY M.L. 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) - based herbicide on the neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology Environmental Safe** 28:222–229.
- ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: O Estado da Arte, **Química Nova**, v. 20, p. 638 – 643. 1997.
- BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 7, p. 1125-1137, 2012.
- BORDEAN, D-M.; NICA D. V., HARMANESCU, M.; BANATEAN-DUNEA I.; GERGEN, I. I. Soil manganese enrichment from industrial inputs: A gastropod perspective, **Plos One**, v. 9, 8 p, 2014.
- BRASIL. **Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005 Conselho Nacional de Meio Ambiente**. Disponível em: < [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/82fia82tion82/Resolucao/2005/res\\_conama\\_357\\_2005\\_classificacao\\_corpos\\_agua](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/82fia82tion82/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua) >. Acesso em: 01 out. 2021.
- BRYAN, G. W.; LANGSTON, W. J.; HUMMERSTONE, L. G.; BURT, G. R.; HO, Y. B. Na assessment of the gastropod, *Littorina littorea*, as na indicator of heavy-metal contamination in United Kingdom estuaries. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 63, p. 327-345, 1983.
- BUA, G. D.; ALBERGAMO, A.; ANNUARIO, G.; ZAMMUTO, V.; COSTA, R.; DUGO, G. High-Throughput ICP-MS and Chemometrics for Exploring the Major and Trace Element Profile of the Mediterranean Sepia Ink. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 1181-1190, 2017.
- BRUSCA, J.G.; BRUSCA, C. R. **Invertebrados**. 2º edição, Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1098p. 2007.
- BUSTAMANTE, P.; GRIGIONI, S.; BOUCHER-RODONI, R.; CAURANT, F.; MIRAMAND, P. Bioaccumulation of 12 trace elements in the tissues of the *Nautilus macromphalus* from New Caledonia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, p. 688-696. 2000.
- CHANG, S. J.; TSENG, S. M.; CHOU, H. Y. Morphological characterization via light and fluorescence microscopy of the hemocytes of two cultured bivalves: a comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Zoological studies**, v. 44, p. 144-153, 2005.

CHAVES, A. M. R. **Entre o seco e o molhado, do costão ao manguezal: distribuição de gastrópodes da família Littorinidae em gradientes vertical e horizontal no litoral do estado de São Paulo.** Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 144p. 2002. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/315823>>. Acesso em: 05 out. 2017.

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

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

CHELOMIN, V. P.; SLOBODSKOVA, V. V.; ZAKHARTSEV, M.; KUKLA, S. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in the bivalve mollusk *Mytilus trossulus*. **Journal of Ocean University of China**, v. 16, p. 339-345, 2017.

CREATIVE BIOARRAY Disponível em <<https://www.creative-bioarray.com/Services/In-Vitro-Comet-Assay.htm>> Acesso em: 28 out. 2017.

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

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

DAVID, H. N. **Respostas do Gastrópode *Littoraria angulifera* (LAMARCK, 1822) às variações ambientais previstas para manguezais estuarinos no Ceará.** Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 64 p. 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/43234> Acesso em: 16 dez. 2020.

D’COSTA, A.; SHYAMA, S. K.; PRAVEENKUMAR, M. K.; FURTADO, S. Genotoxic and Biochemical biomarker responses in *Meretrix casta* exposed to environmentally relevant concentrations of Cadmium. V. 2 p. 1-7. 2017. **Journal of Biosensors, Biomarkers and Diagnostics** Disponível em: <<http://irgu.unigoa.ac.in/drs/handle/unigoa/4770> > Acesso em: 29 out. 2019.

DE LAPUENTE J.; LOURENÇO, J.; MENDO, S. A.; BORRÀS, M.; MARTINS, M. G.; COSTA, P. M.; PACHECO, M. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers in genetics**, v. 6, 2015. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4454841/>>. Acesso em: 23 out. 2017.

DE WOLF, H.; ULOMI, S. A.; BACKELJAU, T.; PRATAP, H. B.; BLUST, R. Heavy metal levels in the sediments of four Dar es Salaam mangroves: accumulation in, and effect on the morphology of the periwinkle, *Littoraria scabra* (Mollusca: Gastropoda). **Environment international**, v. 26, p. 243-249, 2001.

DVORAK, M., SCHNEGG, R., SALVENMOSER, W., PALACIOS, Ò., LINDNER, H., ZERBE, O., ... LACKNER, R. Distinct pathways for zinc 84fia84tion84i in the terrestrial slug *Arion vulgaris*. **Scientific Reports**, v.9, 10 p. 2019.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (Eds). **Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, 3ed, 2012. Disponível em: <[www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)>. Acesso em 15 de Juho de 2015.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, p. 81-95, 2000.

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

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

FRANÇA, E. J.; FERNANDES, E. A. N.; CAVALCA, I. P. O.; FONSECA, F. Y.; CAMILLI, L.; RODRIGUES, V. S.; BARDINI JUNIOR; FERREIRA, C.; J. R.; BACCHI, M. A. Characterizing suspended sediments from the Piracicaba River Basin by means of k0 – INAA. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, v. 622, p. 479 – 483, 2010.

FRANÇA, E. J.; MÉLO, J. T. B.; DENILSON TENORIO LYRA, D. T.; BARBOSA SANTOS, K. M.; SOUSA, E. E.; SANTOS, T. O.; CANTINHA, R. S.; MELO, A. M. M. A. **Caminhamento de Zinco no manguezal do parque Memorial Arcoverde, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco** 17º Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar – COLACMAR, Balneário Camboriú-SC. 2017.

FRÄNZLE, S.; MARKERT, B. The Biological System of the Elements (BSE). Part II: a theoretical model for establishing the essentiality of 84fia84tio elements. The application of stoichiometric network analysis to the Biological System of the Elements. **The Science of the Total Environment**, v. 249, p. 223-241. 2000.

FREITAS, L. A. **Distribuição espaço-temporal e recrutamento de *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) (Mesogastropoda: Littorinidae) em Manguezais no Sul da Bahia.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, 2019. Disponível em:< <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-213478>>. Acesso em: 23 mai. 2021.

FURUKAWA, K; WOLANSKI, E. Sedimentation in mangrove forests. **Mangroves and salt marshes**, v. 1, n. 1, p. 3-10, 1996.

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

GEREMIA, G. **Análise de micronúcleos em hemócitos de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira, Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.** Monografia (Conclusão do Curso de Ciências Biológicas: Ênfase em Gestão Ambiental, Marinha e Costeira: Bacharelado) –Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015. Disponível em:< <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/140094>>. Acesso em: 23 mai. 2021.

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

GIBSON, R. N.; ATKINSON, R. J. A.; GORDON, J. D. M. conservation issue for cephalopods in the north-eastern Atlantic. **Oceanography and marine biology: na annual review**, v. 47, p. 162-168, 2016.

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

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

HACKMAN, R. H. Green pigments of the hemolymph of insects. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 41, p. 166-174, 1952.

INMET Instituto Nacional de Meteorologia 2018 e 2019 Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos> Acesso em: 15 dez. 2020.

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

JANSON, K. Genetic and morphologic variation within and between populations of *Littorina angulifera* from Florida. **Ophelia**, v. 24, p. 125-134, 1985.

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

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

KLOBUČAR, G. I.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPEŠ, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic toxicology**, v. 64, n. 1, p. 15-23, 2003.

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

KOLAREVIĆ, S.; KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J.; PAUNOVIĆ, M.; KRAČUN, M., VASILJEVIĆ, B.; TOMOVIĆ, J.; VUKOVIĆ-GAČIĆ, B.; GAČIĆ, Z. Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay. **Chemosphere**, v. 93, p. 243-251, 2013.

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

LENDERKING, R. E. Some observations on the biology of *Littorina angulifera* of Biscayne and Virginia Keys, Florida. **Bulletin of Marine Science**, v. 3, p. 273-296, 1953.

LI, R.; HUA, P.; ZHANG, J.; KREBS, P. A decline in the concentration of PAHs in Elbe River suspended sediments in response to a source change. **Science of The Total Environment**, v. 663, p. 438-446, 2019.

LIMA, M., de V.; SIQUEIRA, W. N., SILVA, H. A. M. F., LIMA FILHO, J., de M., FRANÇA, E. J.; Melo, A. M. M. M. Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Environmental Science and Pollution Research**, 2018.

LIMA, M. DE V., PEREIRA, M. I. DE A., CABRAL FILHO, P. E., SIQUEIRA, W. N. DE, SILVA, H. A. M. F., DE FRANÇA, E. J., SANTOS, B. S., MELO, A. M. M. A., FONTES, A. Studies on toxicity of CdTe quantum dots suspensions to *Biomphalaria glabrata* mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38 p. 2128–2136, 2019.

LYRA, D. T. **Determinação de elementos químicos de solos e sedimentos em suspensão para monitoração da qualidade ambiental de manguezal de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) –

Centro de Tecnologia e Geociência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

MARIANI, C. F. **Reservatório Rio Grande: caracterização limnológica da água e biodisponibilidade de metais-traço no sedimento**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em COMPLETAR), Universidade de São Paulo. 2006.

MARTIN, J.-M.; WHITFIELD, M. The Significance of the River Input of Chemical Elements to the Ocean. **Trace Metals in Sea Water**, p.265–296. 1983.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

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

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

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

MÉLO, J. T. B. **Acumulação de elementos químicos por gastrópodes de manguezais da costa brasileira**. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

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

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

MERKT, R. E.; ELLISON, A. M. Geographic and habitat-specific Morphological variation of *Littoraria (littorinopsis) angulifera* (LAMARCK, 1822). **Malacologia**, v. 40, n. 1-2, p. 279-295, 1998.

MONTALVÃO, M. F. **Biomarcadores comportamentais e mutagênico em *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) expostos a lixiviado de bitucas de cigarro**. Dissertação (Mestrado em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Urutaí,

Urutaí, 57p. 2019. Disponível em: < [https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos\\_8/20201028091407Disserta%C3%A7%C3%A3o\\_Mateus\\_18\\_02\\_2019\\_.pdf](https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos_8/20201028091407Disserta%C3%A7%C3%A3o_Mateus_18_02_2019_.pdf)>. Acesso em: 26 abr. 2021.

MONTEIRO, L. H. U.; MARQUES, G.; SOUZA, L. P. M.; SILVA, L. F. F.; LACERDA, L. D. Evolução das áreas de manguezal do litoral nordeste brasileiro entre 1978 e 2004. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, Recife, p. 36-42, 2004.

NEWCOMBE, C. P.; MACDONALD, D. D. Effects of suspended sediments on aquatic ecosystems. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 11, n. 1, p. 72-82, 1991.

NUNES, J. A. **Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 94p. 2009. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/88f88tion88i/60/60134/tde-25082009-143632/na.php>>. Acesso em: 29 out. 2017.

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

PAIVA, J. D. S. **Plantas nativas da costa pernambucana acumuladoras de radionuclídeos**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 149p. 2014.

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

PANDA, K. K.; GOLARI, D.; VENUGOPAL, A.; ACHARY, V. M. M.; PHAOMEI, G.; PARINANDI, N. L.; SAHU, H. K.; PANDA, B. B. Green synthesized zinc oxide (ZnO) nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage in *Lathyrus sativus* L. Root Bioassay System. **Antioxidants**, v. 6, p. 35, 2017.

PETRONI, R. **Validação dos métodos de análise por ativação do Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do IPEN-CNEN/SP visando à produção de materiais de referência certificados**. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações). Universidade de São Paulo, 2015.

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

POURANG, N.; RICHARDSON, C. A.; CHENERY, S. R. N.; NASROLLAHZEDEH, H. Assessment of trace elements in the shell layers and soft tissues of the pearl oyster *Pinctada radiata* using multivariate analyses: a potential proxy for temporal and spatial variations of trace elements. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, p. 2465-2485, 2014

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

PROVETTO A., **Manual de Operação: Sistema de Digestão de Amostras por Microondas – modelo DGT 100 Plus**. Jundiaí, 2008, 78p.

QIAO, D., WANG, G., LI, X., WANG, S., ZHAO, Y. Pollution, Sources and environmental risk assessment of heavy metals in the surface AMD water, sediments and surface soils around unexploited Rona Cu deposit, Tibet, China. **Chemosphere**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125988>> Acesso em: 01 out. 2021

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

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

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

RITCHIE, J. C.; SCHIEBE, F. R.; MCHENRY, J. R. Remote sensing of suspended sediments in surface water. **Photogramm. Eng. Remote Sens**, v. 42, p. 1539-1545, 1976.

SANTOS, K. M. B. **Pressão ambiental sobre *Littoraria angulifera* (Littorinidae, 1822): mutagenicidade associada à acumulação de elementos químicos**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.

SANTOS, M. A. V.; DA SILVA BRABOSA, E.; CARNEIRO, B. S.; DE FREITAS FAIAL, K.; RODRIGUES, I. R. C. Estudo quantitativo de metais presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda), infectadas e não infectadas com *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p.157-160, 2005.

SANTOS, M. C.; MARTIN, W.; WU, B.; SCHEIDER, J.; ODHLMANN, J.; CADORE, S.; BECKER, J. S. Biomonitoring of metal contamination in a marine prosobranch

snail (*Nassarius reticulatus*) by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). **Talanta**, v. 80, p. 428-433. 2009.

SILVA, L. R. S.; **Detecção de micronúcleo em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* exposto a radiação gama de  $^{60}\text{Co}$** . Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Centro de Tecnologia e Geociência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010. Disponível em: <[http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/9311/arquivo2675\\_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/9311/arquivo2675_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 14 jan. 2018.

SILVA, Y. J. A. B. D.; CANTALICE, J. R. B.; SINGH, V. P.; NASCIMENTO, C. W. A. D.; WILCOX, B. P.; SILVA, Y. J. A. B. D Heavy metal concentrations and ecological risk assessment of the suspended sediments of a multi-contaminated Brazilian watershed. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 41, 2019

SILVA, Y. J. A. B.; CANTALICE, J. R. B.; SINGH, V. P.; DO NASCIMENTO, C. W. A.; PISCOYA, V. C.; GUERRA, S. M. Trace 90fía90tio fluxes in sediments of na environmentally 90fia90tion90iver from a coastal zone of Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 19, p. 14755-14766, 2015.

SILVEIRA, J.; VILLELA, I. V.; DE OLIVEIRA, I. M.; DA SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P. A utilização do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)) como biomonitor de genotoxicidade ambiental. **Revista de Iniciação Científica** da ULBRA, v. 2, p. 84-93, 2003.

SINGH, N. P. M. T. MCCOY, R. R. TICE, E. L. SCHNEIDER, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, **Experimental cell research**. V. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SIQUEIRA, W. N., DE FRANÇA, E. J., PEREIRA, D. R., LIMA, M. de V., SILVA, H. A. M. F., SÁ, J. L. F., MELO, A. M. M. de A. Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Environmental Science and Pollution Research**, 2021.

SISCOM/IBAMA. Disponível em: <<http://siscom.ibama.gov.br/novo/mapas>>. Acesso em: 20 jun. 20.

SCHMILDT, E. R., SILVA, W., DE JESUS AMBROSIO, T., SCHMILDT, O., NASCIMENTO, A. L., & FERNANDES, A. A. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de alface. **Revista Agro@ mbiente On-line**, v. 11, n. 4, p. 290-295, 2017.

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

TANAKA, M. O.; MAIA, R. C. Shell morphological variation of *Littoraria angulifera* among and within mangroves in NE Brazil. **Hydrobiologia**, v. 559, n. 1, p. 193-202, 2006.

THODSEN, H. RASMUSSEN, J. J.; KRONVANG, B.; ANDERSEN, H. E.; NIELSEN, A.; LARSEN, S. E. Suspended matter and associated contaminants in Danish streams: a national analysis. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, n. 7, p. 3068-3082, 2019.

VILLELA, I. V.; DE OLIVEIRA, I. M.; DA SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P. DNA damage and repair in haemolymph cells of 91fia91t mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, p. 78-86, 2006.

VAN HOLDE, K. E.; MILLER, K. I.; DECKER, H. Hemocyanins and invertebrate 91fia91tion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 15563-15566, 2001.

WARD, R. D. Biochemical genetic variation in the genus *Littorina* (Prosobranchia: Mollusca). **Hydrobiologia**, v. 193, p. 53-69, 1990.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3<sup>a</sup> ed., VCH, Weinheim, 1999, 964 p.

WORMS 2021 MolluscaBase. *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822). Accessed through: World Register of Marine Species at: <http://marinespecies.org/91fia.php?p=taxdetails&id=419565> Acesso em: 02 fev. 2021

ZEIDAN, G. C. FREITAS, L. A.; SANTOS, G. B. M.; SILVA-NETO, E. M.; BOEHS, G. Morphometric analysis of *Littoraria angulifera* (Caenogastropoda) in estuarine regions of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 2, p. 424-430, 2020.

## APÊNDICE A – DIÁRIO DE CAMPO

### Diário de campo Manguezal Tamandaré (8°43'29" S - 35°5'45")

#### Dia 1 (07-04-2018) Horas em campo (4 horas)

- Buscando área em que houvesse espécimes de *Littoraria angulifera* entre 10 e 11 horas.
- Área apresentando muitas clareiras próximo a marina de Tamandaré, havia poucas *Rhizophora sp.* e conseqüentemente ausência de *L. angulifera*.
- Quando área a ser observada foi encontrada constatou-se a presença de animais jovens (medindo < de 15mm).
- Retornamos a área de observação e ficamos das 13 às 16 horas.
- Nesse horário alguns animais apresentavam estado de torpor (fixados ao tronco pelo muco na concha), enquanto outros pareciam ativos (presos ao tronco pelo pé), não foi observado relação entre o tamanho dos animais e o torpor.
- Nesse dia foram marcados 6 animais (verde claro, azul claro, vermelho, rosa, roxo e dourado) e os troncos em que estavam, para melhor localizá-los a posteriori.

#### Dia 2 (08-04-2018) Horas em campo (2:30 horas)

- Fomos durante a chuva observar o hábito dos animais marcados (9 às 9:30 horas).
- Marcamos os últimos 3 animais observados (preto, verde escuro e azul escuro) também marcando a árvore em que se encontravam.
- Os animais rosa e dourado estavam muito próximos, porém não foi observado cópula.
- Todos, com exceção do animal preto estavam em locais diferentes do que estavam no dia anterior.
- Havendo com isso a hipótese de apresentarem hábito noturno.
- Voltamos ao manguezal às 16h e ficamos até às 18h.
- Os animais estavam mais ativos, quando comparados às visitas anteriores, fortalecendo a hipótese de hábito noturno, porém também havia chovido naquele dia mais cedo, levantando a hipótese que após a chuva eles ficam ativos.
- Dos animais marcados os que permaneciam no lugar desde manhã foram aqueles com as cores preto e verde claro, porém ambos estavam em posição diferente daquela do dia anterior.

- Ao voltar a mover-se, os animais que estavam em estado de torpor defecam bastante (esvaziam o sistema digestivo), contudo não foram vistos se alimentando.
- Quando se movimentam movem bastante os tentáculos e passam os lábios e rádula por onde passam, em um movimento de raspagem.
- Seriam eles raspadores de microrganismos? Seriam limpadores, exerceriam função semelhante aos camarões? Ou peixe chupa pedra?

### **Dia 3 (09-04-2018) Horas em campo (2:30 horas)**

- Ficamos no manguezal das 8:30 às 9h e o animal preto estava próximo a outro, dando a entender um comportamento de cópula.
- Voltamos às 14:30h e ficamos até às 16:30h
- Coletamos casca de *Rhizophora sp.* para identificação em laboratório dos líquens presentes.
- Foi observado estrutura esbranquiçada em troncos e foram trazidas para análise em laboratório, há a hipótese de serem desovas.
- Foi filmado início de cópula entre azul e verde escuro.
- Todos os animais marcados foram medidos e aqueles que estavam ativos, também foi possível identificar o sexo.
- O caramujo marcado de azul escuro é uma fêmea, um caramujo não marcado estava apresentando intenção de cópula, porém não aconteceu (o caramujo macho não marcado, andou pela concha da fêmea e saiu).

### **Dia 4 (10-04-2018) Horas de Campo (2:40 horas)**

- Ficamos no manguezal das 10:20 às 12h.
- Os animais não estavam ativos, porém estavam em posição diferente do dia anterior.
- Para identificar a fêmea azul, foi necessário movê-la e ela saiu do torpor.
- Retornamos ao manguezal às 17h e ficamos até às 18h, os animais continuavam na mesma posição que estavam durante o dia.
- Não choveu durante esse dia.

### **Dia 5 (11-04-2018) Horas em Campo (2:40 horas)**

- Ficamos no manguezal das 10:20 às 12 horas.
- Todos os animais haviam mudado de lugar, exceto o verde claro.

- Havia chovido mais cedo nesse dia, estiou umas 9 horas.
- Animais estavam mais ativos, porém pouco móveis.
- Foi fotografado o sexo de todos os animais marcados, exceto o do azul claro que já havia sido fotografado dia 09-04-2018.
- Foi observado e filmado possível intenção de cópula, contudo animais se afastaram após pequena interação, em seguida verificamos o sexo dos organismos envolvidos nessa interação e ambos eram machos.
- Voltamos ao manguezal às 18:20 e saímos às 19:20 os animais estavam em posições diferentes daquelas que observamos pela manhã.
- Semelhante intenção de cópula e afastamento foi observada com outros dois machos (dessa vez foi fotografado e não filmado).
- O animal marcado com dourado não foi encontrado.

#### **Dia 6 (12-04-2018) Horas em campo (1 hora)**

- Ficamos no manguezal das 10:20 às 11:20
- Todos os animais marcados foram encontrados

#### **Sexo, tamanho e cor dos animais marcados**

<b>Cor da Marcação</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tamanho</b>
Azul claro	Macho	17mm
Azul escuro	Fêmea	21mm
Dourado	Macho	9mm
Preto	Macho	24mm
Rosa	Fêmea	12mm
Roxo	Macho	14mm
Verde claro	Macho	15mm
Verde escuro	Macho	15mm
Vermelho	Fêmea	17mm
Animais adultos comprimento > 15mm (aproximadamente 2 anos de vida)		