

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E BIOACUMULAÇÃO EM  
OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) EXPOSTAS A DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE FERRO E MANGANÊS**

**DANDARA SILVA CABRAL**

**VILA VELHA**  
**MARÇO / 2017**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS**

**EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E BIOACUMULAÇÃO EM  
OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) EXPOSTAS A DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE FERRO E MANGANÊS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas, para obtenção do título de Mestra em Ecologia.

**DANDARA SILVA CABRAL**

**VILA VELHA**  
**MARÇO/ 2017**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C117e Cabral, Dandara Silva.  
Efeitos bioquímicos, genotóxicos e bioacumulação em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) expostas a diferentes concentrações de ferro e manganês / Dandara Silva Cabral – 2017.  
60 f.: il.  
Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes.  
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2017  
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Ostras. 3. Ferro. 4. Manganês.  
I. Chippari-Gomes, Adriana Regina. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

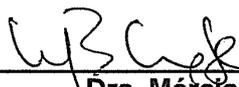
**DANDARA SILVA CABRAL**

**EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E BIOACUMULAÇÃO EM  
OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) EXPOSTAS A DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE FERRO E MANGANÊS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Mestra em Ecologia.

Aprovada em 09 de março de 2017,

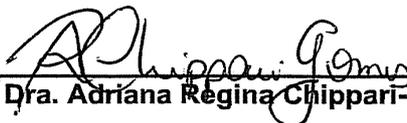
Banca examinadora:



\_\_\_\_\_  
**Dra. Mércia Barcellos Costa - UFES**



\_\_\_\_\_  
**Dr. Leonardo Barros Dobbss UFVJM**



\_\_\_\_\_  
**Dra. Adriana Regina Chippari-Gomes - UVV**

**Orientadora**

**Dedico, à minha mãe e à minha irmã,  
Sandra e Manuela, que são a minha  
fortaleza.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, Jesus e o Espírito Santo, que diariamente me guiam e me sensibilizam para tentar ser uma pessoa melhor para mim mesma e para os outros ao meu redor, desafiando meu comodismo e trazendo sentido e felicidade para o meu viver.

À Dra. Adriana Regina Chippari Gomes, minha orientadora, pelo seu apoio, confiança, dedicação, amizade e profissionalismo. Ao Dr. Levy Gomes, pelo seu incentivo e pelo seu apoio durante todo o desenvolvimento desse trabalho, MUITO OBRIGADA!!

Agradeço à minha mãe e à minha irmã por todo amor, carinho e apoio. Todas as conquistas são nossas!

Aos meus amigos do Lab, Karlinha, Andressa, Taci, Tati, Julia e Davel, meus companheiros que são parte fundamental desse trabalho, obrigada por tudo.

Ao Jean, Bianca e Ana, pelos momentos de descontração, carinho, amizade e competência.

À toda equipe do Laboratório de Ictiologia Aplicada (LAB-PEIXE) pelo suporte que me foi dado, pela colaboração para que esse trabalho fosse executado da melhor forma possível.

Aos estagiários Marly, Larissa e Gabriel por todo apoio e companheirismo. Amo vocês e sou muito grata.

A todos os colegas de turma Elaine, Alexander e Fellipe por todos os conselhos e amizade.

À Universidade Vila Velha pela estrutura, organização, apoio a pesquisa e pelo constante crescimento que nos proporciona.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento do estudo e incentivo a pesquisa.

À Prefeitura de Vitória e aos fiscais Andressa e Luciano pelo auxílio nas coletas.

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 ÁREA DE COLETA .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 COLETA DAS OSTRAS .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 DESENHO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3.1 BIOENSAIO .....</b>	<b>14</b>
<b>3.4 COLETA DE HEMOLINFA E TECIDOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.5 COLETA DE ÁGUA .....</b>	<b>15</b>
<b>3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....</b>	<b>16</b>
<b>3.6.1 CATALASE (CAT; E.C. 1.11.1.6) E GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST – EC:2.5.1.18) .....</b>	<b>16</b>
<b>3.6.2 PROTEÍNA TOTAL .....</b>	<b>16</b>
<b>3.7 ANÁLISE GENOTÓXICA: ENSAIO DO COMETA ALCALINO .....</b>	<b>17</b>
<b>3.8 QUANTIFICAÇÃO DE METAIS .....</b>	<b>18</b>
<b>3.8.1 NA ÁGUA .....</b>	<b>18</b>
<b>3.8.2 NOS TECIDOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 EFEITOS BIOQUÍMICOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 EFEITOS GENOTÓXICOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3 BIOACUMULAÇÃO NOS TECIDOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4 CONCENTRAÇÕES DE FERRO E MANGANÊS NA ÁGUA .....</b>	<b>27</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.</b> Desintoxicação do peróxido de hidrogênio pela CAT.....	<b>7</b>
<b>Equação 2.</b> Conjugação da GSH com o substrato eletrofilico tóxico pela ação da GST.....	<b>8</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagens do ensaio do cometa, mostrando uma célula sem dano (0); pouco dano (1); dano médio (2), grande dano (3) e apoptose (4) (Collins, 2004). **8**
- Figura 2.** Atividade das enzimas catalase (A) e glutathiona S-transferase (B) em exemplares de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Mn; T1 = adição de 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 0,5 mg/L de Mn. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove. **19**
- Figura 3.** Atividade das enzimas catalase (A) e glutathiona S-transferase (B) em exemplares de *Crassostrea rhizophorae* após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Fe; T1= adição de 0,3 mg/L de Fe (CONAMA); T2 = adição de 0,440 mg/L de Fe e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. **20**
- Figura 4.** Atividade das enzimas catalase (A) e glutathiona S-transferase (B) em exemplares de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Fe+Mn; T1= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. **21**

**Figura 5.** Frequência do Índice de Danos no DNA em exemplares de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: C = grupo controle negativo sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Mn; T1 = adição de 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 0,5 mg/L de Mn. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove. **22**

**Figura 6.** Frequência do Índice de Danos no DNA em exemplares de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Fe; T1= adição de 0,3 mg/L de Fe (CONAMA); T2 = adição de 0,440 mg/L de Fe e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. **23**

**Figura 7.** Frequência do Índice de Danos no DNA em exemplares de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Fe+Mn; T1= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. **24**

**Figura 8.** Concentração de Mn no tecido de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Mn; T1= adição de 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 0,5 mg/L de Mn. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove. **25**

**Figura 9.** Concentração de Fe no tecido de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Fe; **26**

T1= adição de 0,3 mg/L de Fe (CONAMA); T2 = adição de 0,440 mg/L de Fe e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos.

**Figura 10.** Concentração de Fe (A) e de Mn (B) bioacumulado no tecido de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Fe+Mn; T1= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. **27**

**Figura 11.** Quantificação de Fe na água coletada por 10 dias nos aquários. A = grupo controle – sem adição de qualquer metal; B= adição de 0,3 mg/L de Fe (CONAMA); C = adição de 0,440 mg/L de Fe e D = adição de 1,5 mg/L de Fe. Valores expressos em mg/L. **28**

**Figura 12.** Quantificação de Mn na água coletada por 10 dias nos aquários. A= grupo controle – sem adição de qualquer metal; B= adição de 0,049 mg/L de Mn; C = adição de 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e D = adição de 0,5 mg/L de Mn. Valores expressos em mg/L. **29**

**Figura 13.** Quantificação de Fe na água dos aquários expostos ao Fe e ao Mn em associação. A = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; B= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; C = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e D = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn. Valores expressos em mg/L. **30**

**Figura 14.** Quantificação de Mn na água dos aquários expostos ao Fe e ao Mn em associação. A = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; B= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; C = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e D = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn. Valores expressos em mg/L. **31**

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> – Coordenadas geográficas da área de coleta dentro da EEMIL, onde foram obtidas as amostras de ostras para análise.....	<b>13</b>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALAD-  $\alpha$ -aminilevulinato desidratase

ANOVA - Análise de variância

AN - Anormalidades Nucleares

ANOVA – Análise de Variância (Analysis of Variance)

CAT- Catalase

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

Control - Grupo controle.

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DMSO - dimetilsulfóxido

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EEMIL - Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão

ERO - Espécies reativas de oxigênio

Fe - Ferro

GFAAS - Espectrometria de Absorção Atômica de Forno Grafite

GST - Glutathione S-transferase

H<sub>2</sub>O – água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

ID - Índice de danos.

mg/mL – miligrama por mililitro.

Mn -Manganês pH- potencial hidrogeniônico

s- segundo

$\mu$ g – micrograma

$\mu$ l – microlitro

## RESUMO

CABRAL, Dandara, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, Março de 2017. **Efeitos bioquímicos, genotóxicos e bioacumulação em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) expostas a diferentes concentrações de ferro e manganês.**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Adriana Regina Chippari Gomes.

Bioensaios aquáticos são ferramentas úteis na avaliação de risco e potenciais impactos dos poluentes no ambiente natural. As ostras e outros bivalves são indicados como bioindicadores adequados para estudar os efeitos de poluentes no meio aquático. Vários são os atributos que fazem das ostras bioindicadores ideais como: distribuição geográfica ampla, abundante, sedentários, tolerância a alterações ambientais, tolerância a diversos contaminantes ambientais, ampla e estáveis populações, razoavelmente longa vida, razoável tamanho, resistente o suficiente para sobreviver em estudos de laboratório etc. Diante disso, o presente estudo foi realizado para se qualificar a toxicidade de Fe e Mn em *Crassostrea rhizophorae*, expostas a diferentes concentrações destes metais, utilizando para isso biomarcadores bioquímicos (CAT e GST), genotóxicos (ensaio cometa) e bioacumulação nos tecidos. O trabalho foi dividido em três experimentos: no primeiro, as ostras foram expostas ao Mn (0,049; 0,1 e 0,5 mg/L); em segundo ao Fe (0,3; 0,440 e 1,5 mg/L) e em terceiro as ostras foram expostas ao Fe associado ao Mn (Fe 0,3 e Mn 0,049; Fe 0,440 e Mn 0,1; e Fe 1,5 e Mn 0,5 mg/L). A atividade das enzimas catalase e glutathione-S- transferase no tecido branquial das ostras aumentaram significativamente, de forma geral, nos tratamentos expostos nas duas primeiras concentrações, e apresentaram uma diminuição nas últimas concentrações de Mn e Fe. O índice de danos no DNA demonstrou uma relação dose-dependente em todas as três séries de experimentos, visto que os resultados obtidos detectaram alterações significativas nos níveis de quebras da fita de DNA de hemócitos de *C. rhizophorae* em todos os tratamentos em relação ao controle, demonstrando o significativo potencial desses metais em causar danos no DNA das ostras. A quantificação de Fe e Mn no tecido das ostras não apresentou nenhuma correlação à quantidade desses metais na água, uma vez que não houveram diferenças entre os tratamentos. Os dados apresentados neste trabalho demonstram a aplicabilidade do uso de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em estudo ecotoxicológicos utilizando a ostra *C. rhizophorae* como bioindicador de contaminação aquática. Os resultados constituem importantes fontes de informação para o bioensaio de águas contaminadas por metais.

**Palavras chaves:** Ecotoxicologia, estuário, metais, bivalves, biomarcadores.

## ABSTRACT

CABRAL, Dandara, M.Sc., University of Vila Velha – ES, March de 2017.

**Biochemical effects, genotoxic and bioaccumulation in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) exposed to different concentrations of iron and manganese**

Advisor: Dr<sup>a</sup> Adriana Regina Chippari Gomes.

Aquatic bioassays are useful tools in the assessment of risk and potential impacts of pollutants on the natural environment. Oysters and other bivalves are denoted as bioindicators suitable for studying the effects of these pollutants in the aquatic environment. Several attributes that make oysters bioindicators ideals as: wide geographic distribution, abundance, sedentary, tolerance to environmental changes, tolerance to several environmental contaminants, high wide and stable populations, reasonably long life, reasonable size, tough enough to survive in laboratory studies etc. So, this study was conducted to qualify the toxicity of Fe and Mn in *C. rhizophorae*., exposed to different concentrations of these metals, using biochemical biomarkers (CAT and GST) and genotoxic (Comet). The work was divided into three experiments: in the first, the oysters were exposed to Mn (0.049; 0.1 and 0.5 mg/L); second to Fe (0.3; 0.440 and 1.5 mg/L) and in the third experiment the oysters were exposed to Fe associate with Mn (Fe and Mn 0.049 0.3; Fe and Mn 0.440 0.1; and Fe and Mn 1.5 0.5 mg/L).and separately for 10 days. The activity of the enzymes catalase and glutathione-S-transferase in gill tissue of oysters have increased significantly in exposed first two treatments, and decreased in the largest concentrations of Mn and Fe. The index of damage showed a dose dependent, therefore, the results obtained have detected significant changes in levels of DNA breaks of hemocytes of *C. rhizophorae* in all treatments relative to the control, demonstrating the significant potential of those metals in causing damage to the DNA of the oysters. Quantification of Fe and Mn in the tissue of oysters did not present any correlation to amount of these metals in the water, since there were no differences between the treatments. The data presented in this paper demonstrate the applicability of the use of biochemical biomarkers and genotoxic in ecotoxicological study using the oyster *C. rhizophorae* as bioindicator of water pollution. The results are important sources of information for the bioassay of metal-contaminated waters

**Keywords:** Ecotoxicology, estuary, metals, bivalves, bioamarkers.

## **1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **CONTAMINAÇÃO POR METAIS EM AMBIENTE ESTUARINO**

Os estuários são ambientes aquáticos de transição entre ecossistemas dulcícolas e marinhos. São regiões parcialmente fechadas nas quais a água do mar é bastante diluída pelo aporte de água doce do continente (Thurman e Trujillo, 1999). As regiões estuarinas são extremamente importantes do ponto de vista ecológico, sendo considerados ecossistemas mantenedores da diversidade e berçários da vida marinha por oferecer condições propícias para a alimentação, reprodução e proteção de muitas espécies.

O ecossistema estuarino constitui também uma importante barreira geoquímica na interface continente-oceano (Alongi et al., 2004). Esse ecossistema sofre impactos diretos e indiretos de contaminação dos recursos hídricos, com o lançamento principalmente de cargas de efluentes domésticos e de resíduos industriais (Moura et al., 2009). Segundo órgãos ambientais, 7,5 % dos estuários da costa do Brasil estão acima dos limites de poluição. Esses dados foram levantados a partir de análises químicas no sedimento e testes de toxicidade em organismos aquáticos (Boesch et al., 2001).

As fontes de contaminação que chegam a esses recursos hídricos podem ser pontuais ou difusas. As fontes pontuais são facilmente identificadas, podendo, assim, ser tratadas e controladas. Ao contrário das fontes pontuais, as difusas apresentam características bastante diferenciadas, espalham-se por inúmeros locais e são particularmente de difícil determinação, em função do desconhecimento de suas descargas (Gonçalves et al., 2005, Zimmerman et al., 2008). Dentre os tipos de poluentes que adentram os recursos hídricos, incluindo o estuarino, estão os metais, que por não serem biodegradáveis podem ser nocivos aos organismos desse ambiente e aos seus predadores, uma vez que são biomagnificados na cadeia trófica, causando danos à estrutura das comunidades presentes no ecossistema, principalmente por seus efeitos mutagênicos e teratogênicos. Além disso, uma vez que os estuários são ecossistemas altamente produtivos, acabamos por sermos atingidos pelos metais que são incorporados na biota, como peixes, caranguejos, ostras,

etc, através do consumo destes recursos como fonte alimentar, o que pode ser prejudicial a nossa saúde.

No Brasil a lei que regulamenta os limites para as concentrações em que os compostos orgânicos e inorgânicos podem estar presentes na água é a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), em que as águas doce, salobra e salina do território nacional são divididas em classes, conforme a qualidade requerida para seus principais usos, como abastecimento de água, proteção de comunidades aquáticas e recreação. As águas salobras são classificadas em: classe especial, classe 1, classe 2 e classe 3. De acordo com cada classe de água, são estabelecidos valores máximos de concentração para vários compostos orgânicos e inorgânicos.

### **CONTAMINAÇÃO DE ÁREAS ESTUARINAS POR FERRO E MANGANÊS**

Situados em regiões costeiras, as regiões estuarinas sofrem com impactos diretos e indiretos de contaminação dos recursos hídricos, com o lançamento principalmente de cargas de efluentes domésticos. Dentre os diversos tipos de contaminação está a por metais conforme vem sendo tratada de forma especial nos estudos e nas pesquisas divulgadas nos últimos anos (Moura et al., 2009).

O ferro (Fe) é o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre, além de ser um elemento essencial necessário para o crescimento e sobrevivência de quase todos os organismos (Valko et al., 2005), estando envolvido em diversos processos metabólicos como o transporte de oxigênio, o transporte de elétrons, a síntese de DNA e atua como cofator de muitas proteínas (Salvador et al., 2011). A sedimentação, os processos químicos, hidrotérminos e o desgaste das rochas pela ação do intemperismo são os principais mecanismos que formam depósitos de Fe. Os principais compostos de Fe utilizados na indústria são óxidos, carbonatos e sulfetos, com aplicação na indústria metalúrgica, siderúrgica e na fabricação de abrasivos. As principais fontes antrópicas de Fe são: mineração, soldagem, efluentes de esgoto, fertilizantes e escoamento superficial urbano (Lima e Pedrozo, 2001).

O manganês (Mn) também é um elemento amplamente distribuído na crosta terrestre, sendo encontrado em rochas ígneas, sedimentares e metamórficas (Garcia, 1999) e é considerado um elemento traço essencial para humanos e outras espécies do reino animal (Gouda, 2014). O metal puro encontra poucos usos, onde a maior parte do que é produzido está na forma de ferro-ligas sendo um importante elemento da liga do aço utilizado em indústrias siderúrgicas, além de ser um componente na fabricação de pilhas, baterias e compostos orgânicos para a secagem de tintas (Reis et al., 2010). As concentrações de Mn presentes na água e no solo podem ser originadas de produtos e descargas industriais, rejeitos de minas, fertilizantes e determinados tipos de desinfetantes (Almeida et al., 2007).

Em altas concentrações, o Fe pode aumentar a formação de radicais livres (reação de Fenton) e se tornar extremamente tóxico para a célula (Matsumoto e Marin-Morales, 2005), causando oxidação na molécula de DNA, peroxidação lipídica e desnaturação de proteínas (Valko et al., 2005). Já o Mn, pode se tornar um risco ambiental, pois quando ingerido em excesso pode produzir efeito tóxico sobre os organismos, como distúrbios neurológicos (Gu et al., 2015) em humanos e também no sistema nervoso e inervação dos cílios laterais de *Crassostrea virginica* (Martin et al., 2008). Portanto, métodos que identifiquem os efeitos desses metais são necessários.

## **ECOTOXICOLOGIA E A UTILIZAÇÃO DE BIOINDICADORES DA POLUIÇÃO AQUÁTICA**

A Ecotoxicologia foi definida por Truhaut (1969) e mais tarde por Butler (1978) como “o ramo da Toxicologia que estuda os efeitos tóxicos das substâncias, naturais e artificiais, animais ou vegetais, aquáticos ou terrestres, que constituem a biosfera”. Dentre as finalidades da ecotoxicologia está a de realizar testes em laboratórios identificando os efeitos de contaminantes ou substâncias naturais sobre os organismos vivos a nível individual relacionado a alterações comportamentais, reprodução, alimentação, taxa de crescimento, malformações, alterações bioquímicas e fisiológicas e a nível superior de organização, tais como populações, comunidades e ecossistemas (Arias et al., 2007).

Esses testes baseados em métodos químicos e biológicos estão sendo amplamente empregados para monitorar a contaminação por metais e outros contaminantes. As técnicas ecotoxicológicas aplicadas podem assim determinar a mortalidade ou a morbidade entre espécies indicadoras, avaliando assim os potenciais impactos biológicos da contaminação (Luo et al., 2014). Dessa forma esses testes de toxicidade na biota complementam as análises físico-químicas realizadas em estudos de monitoramento ambiental, uma vez que enquanto as análises físico-químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias nos diferentes compartimentos do ambiente, os testes de toxicidade avaliam os efeitos dessas mesmas substâncias sobre os organismos e o sistema biológico (Costa e Olivi, 2008).

Os organismos utilizados nos testes toxicológicos são comumente chamados de bioindicadores. Por definição um organismo para ser considerado como bom indicador em testes ecotoxicológicos deve atender a requisitos como: abundância e disponibilidade, conhecimento de sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares, significativa representação ecológica, estabilidade genética, baixo índice de sazonalidade, sensibilidade constante e apurada, importância comercial, ser de fácil cultivo em laboratório e ser nativa para melhor representar o ecossistema (Magalhães e Filho, 2008). Atendendo a essas premissas alguns grupos taxonômicos como peixes, anfíbios (Gonçalves et al., 2014) e moluscos têm se destacado como bons bioindicadores no biomonitoramento ambiental (Vieira et al., 2003; Kimbrough et al., 2008).

Os moluscos bivalves podem ser considerados como excelentes bioindicadores, pois são abundantes em ecossistemas aquáticos, apresentam alta tolerância a vários poluentes, podendo bioacumular e translocar, por meio da cadeia trófica, xenobióticos originados de várias fontes, sendo estes compostos potencialmente genotóxicos e carcinogênicos (Agustini, 2013). Dentre os bivalves que podemos usar como bioindicadores estão as ostras do mangue que ocorrem aderidas junto às raízes da vegetação de manguezais e podem formar grandes bancos nas margens dos estuários (Nascimento et al., 2011).

## **UTILIZAÇÃO DAS OSTRAS COMO BIOINDICADORES (*Crassostrea rhizophorae* – ESPÉCIE DO ESTUDO)**

As ostras são organismos pertencentes ao Filo Mollusca e a Classe Bivalva, e apresentam uma distribuição geográfica que abrange a região Sul do Caribe, Venezuela, Suriname e Brasil até o Uruguai (Rios, 1994). São caracterizadas por terem um corpo macio, protegido por uma concha calcária formada por duas valvas e unidas por ligamentos e músculos adutores (Wheaton, 2007).

A espécie *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), conhecida como ostra do mangue, é uma espécie gonocórica, de tamanho médio, que alcança 100 mm de altura, apresentando concha grossa, de forma variável, geralmente larga e de tonalidade clara a escura, com valva superior plana e menor que a inferior (Christo, 2006). Essa espécie é típica de zonas tropicais e ocorre principalmente fixada às raízes aéreas de mangue vermelho, *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) ou sobre zonas entremarés e costões rochosos. É uma das espécies mais citadas e exploradas comercialmente devido ao seu valor alimentício e ao uso da concha como matéria-prima na fabricação de produtos industriais e medicinais (Christo, 2006).

Estes moluscos são filtradores e se alimentam de partículas em suspensão na água. As partículas de detritos e os microrganismos presentes na corrente ventilatória são retidos nos filamentos branquiais e conduzidos, através de batimentos ciliares, até os palpos labiais e à boca (Barnabé, 1996). Assim as ostras podem bioacumular patógenos e metais presentes na água, tornando-se um risco à saúde pública. O problema tende a se agravar quando há aumento da temperatura ambiental, pois as taxas de filtração e de crescimento das ostras também são aceleradas nessas condições (Christo, 2006), aumentando conseqüentemente a possibilidade de ingestão e de bioacumulação de metais.

Nesse contexto, as ostras têm sido consideradas como um dos bioindicadores ideais para observar e avaliar a contaminação por metais em estuários e ambientes costeiros, visto que as ostras são sésseis, abundantes na área de estudo, possuem vida longa e são eficientes bioacumuladoras de contaminantes.

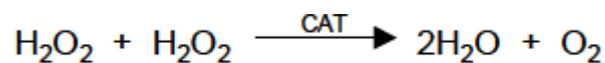
## **BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS**

Nos ensaios ecotoxicológicos, marcadores biológicos também são usados para indicar o grau de impacto e os efeitos dos poluentes/estressores nos bioindicadores (biota) escolhidos. Os biomarcadores podem ser definidos como alterações moleculares, celulares, bioquímicas ou mudanças fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um xenobiótico (Freire et al., 2008). Os biomarcadores podem indicar tanto a exposição dos organismos aos contaminantes (biomarcadores de exposição), como a magnitude da perturbação causada em resposta a poluentes (biomarcadores de efeito) (Cajaraville et al., 2000). A exposição de bivalves e de outros organismos a altos níveis de metais pode induzir vários tipos de respostas nos organismos, tais como alterações enzimáticas e danos genotóxicos (Irato et al., 2003), podendo dessa forma ser usados como biomarcadores de contaminação ambiental.

Os biomarcadores bioquímicos mais utilizados são os de defesa antioxidante, por meio de atividades enzimáticas. A exposição a poluentes como os metais causam um aumento em processos peroxidativos no interior das células, que causam estresse oxidativo (Cajaraville et al., 2000). Em resposta a um agente tóxico, como o metal, a célula intensifica a atividade de enzimas antioxidantes e produz “varredores” de radicais livres como as espécies reativas de oxigênio (EROS) para prevenir a lesão causada por elas e manter a homeostase celular (Nuseti et al., 2001; Vega-López et al., 2013). A partir dos testes de atividade enzimática é possível identificar o efeito de poluentes nos organismos. Entre os organismos analisados pode-se destacar peixes como *Oreochromis niloticus* (Atli e Canli, 2007), *Brycon amazonicus* (Avilez et al. 2008), crustáceos como o camarão *Litopenaeus vannamei* (Aispuro-Hernandez et al. 2008); microalgas (Levy et al. 2008); e os moluscos, como as ostras *Crassostrea rhizophorae*, (Alves et al. 2002), *Pinctada fucata* (Gu et al. 2006) e *Crassostrea virginica* (Ivanina et al. 2008) e mexilhões como *Mytilus galloprovincialis* (Bocchetti et al. 2008).

Dentre as enzimas que atuam no estresse oxidativo destaca-se a enzima catalase (CAT EC 1.11.1.6) e como enzima de detoxificação

destaca-se a glutathione S-transferase (GST EC 2.5.1.18). A CAT é um componente de defesa antioxidante primário, encontrada dentro dos peroxissomos, pequenas vesículas envoltas por membrana, onde ocorrem as reações enzimáticas. A principal função da catalase é a dismutação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em oxigênio molecular e água (H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>). Isso porque o peróxido de hidrogênio, produto gerado pelo metabolismo celular em organismos expostos ao oxigênio atmosférico, tem de ser rapidamente convertido em uma substância inócua, tornando-se importante para a desintoxicação (Valavanidis et al., 2006).



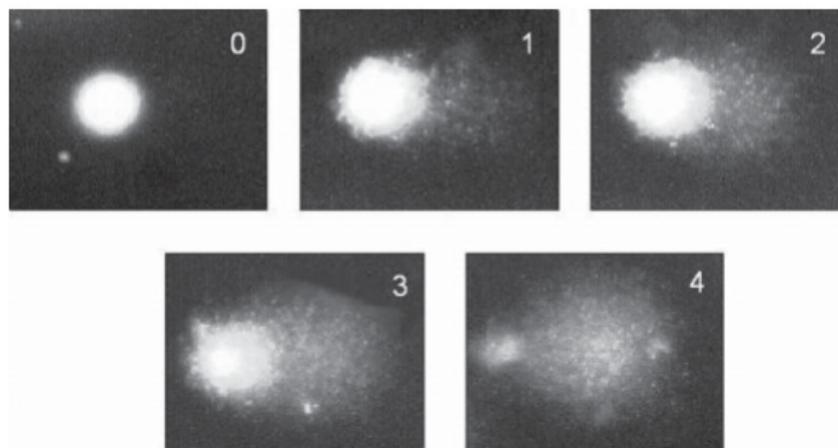
**Equação 1.** Conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio pela ação da CAT.

A glutathione S-transferase (GST, E.C. 2.5.1.18) pertence a uma família multigênica de enzimas, que desempenha um importante papel no metabolismo e detoxificação dos organismos de certo número de compostos eletrófilos e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos como drogas, herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais, a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e excretados (Carletti et al., 2008; Huber e Almeida, 2008). Alterações nas atividades dessa enzima refletem diretamente nos distúrbios metabólicos e danos às células em órgãos específicos de peixes (Carvalho-Neta e Abreu-Silva, 2013). Segundo Regoli et al. (1998), nos testes de atividade enzimática, muitas vezes, pode-se observar uma diminuição na atividade da GST, essa inibição está envolvida com a desestabilização da membrana lisossômica provocada pela exposição aos metais ou ao estresse de radicais livres, o que pode causar a ruptura da membrana e liberar diversos radicais e íons ácidos, o que prejudica o funcionamento normal da enzima.



**Equação 2.** Conjugação da GSH com o substrato eletrofilico tóxico pela ação da GST.

Por outro lado, os biomarcadores genotóxicos expressam os efeitos adversos dos xenobióticos na integridade do DNA dos organismos. Uma das técnicas mais utilizadas na ecotoxicologia aquática é a do ensaio cometa, que é um método genotóxico sensível para avaliar danos do DNA, permitindo a detecção de quebras do DNA e de sítios álcali-lábeis (suscetíveis ao tratamento alcalino) (Bücker et al., 2006). O termo “cometa” é usado porque, em células com aumento de danos no DNA, após eletroforese em meio alcalino, é visível o aumento da migração dos fragmentos de DNA cromossomal, dando ao mesmo um aspecto que se assemelha a forma de um cometa (Speit e Rhtfuss, 2012) (figura 3). O ensaio cometa, comparado a outros testes de genotoxicidade, é considerado de fácil aplicação para qualquer tecido de interesse, sensibilidade para detecção dos danos no DNA, necessidade de pequeno número de células (<10.000) (Lee e Steinert, 2003) e curto período de tempo para a condução do experimento.



**Figura 1.** Imagens do ensaio do cometa, mostrando uma célula sem dano (0); pouco dano (1); dano médio (2), grande dano (3) e apoptose (4) (Collins, 2004).

### **BIOACUMULAÇÃO DE METAIS EM OSTRAS**

A bioacumulação é o processo em que substâncias químicas provenientes do ambiente são assimiladas e retidas pelos organismos, com a probabilidade de causar efeitos deletérios. Os contaminantes bioacumulados podem ser biomagnificados, ou seja, transferidos de um nível trófico a outro, exibindo concentrações crescentes à medida que passam para os níveis mais elevados (Spacie et al., 1995). Dessa forma a

bioacumulação de determinados poluentes ambientais, como por exemplo de metais, em diversos tecidos dos organismos pode ser considerada um biomarcador de exposição a estes agentes químicos (NRC, 1987).

As ostras possuem uma capacidade de filtração de até 10 litros de água por hora e cerca de 200 litros por dia, por esta característica são capazes de remover substâncias tóxicas como metais, agrotóxicos e toxinas presentes na água e, conseqüentemente, bioacumularem em seus tecidos (Potasman et al., 2002), sendo este então um dos motivos de serem consideradas excelentes bioindicadores. O alimento que provém desse fluxo de água nas ostras passa através das cavidades do manto e pelas brânquias, que participam na respiração e alimentação, funcionando como um filtro e concentrando partículas orgânicas, algas microscópicas e organismos planctônicos que servem como alimento para o animal. Além disso, as brânquias também acumulam contaminantes químicos como metais, compostos organoclorados, hidrocarbonetos e elementos radioativos (Liang et al., 2004) e por essas características são alvo nos estudos ecotoxicológicos de bioacumulação de poluentes (Choi et al., 2007). Essa bioacumulação é facilitada pelo muco presente na superfície do tecido, que concentra uma variedade de contaminantes, facilitando a incorporação por um gradiente de difusão. Ao incorporar os poluentes, estes são ligados a proteínas e liberados para a hemolinfa e os hemócitos circulantes (Marigomez et al., 2002).

**ARTIGO**

**EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E BIOACUMULAÇÃO EM  
OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) EXPOSTAS A DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE FERRO E MANGANÊS**

## 2. INTRODUÇÃO

A crescente degradação dos recursos hídricos tem levado ao aumento dos estudos de contaminação dos ambientes aquáticos e, conseqüentemente, dos efeitos dos poluentes nos organismos. Dentre os diversos tipos de contaminação nos corpos hídricos, a contaminação por metais vem sendo tratada de forma especial nos estudos e nas pesquisas divulgadas nos últimos anos (Pereira, 2008; Araujo et al., 2015), por ser considerada uma das formas mais prejudiciais de poluição, pois esses elementos não são degradáveis, são extremamente tóxicos e cumulativos nos organismos, logo as conseqüências são reduntantes em toda a cadeia trófica, o que resulta em graves problemas ambientais. A distribuição desses elementos na coluna d'água é influenciada por fenômenos físicos, químicos e biológicos (Alloway, 1995; Fergusson, 1990), entre eles o potencial redox, a força iônica, o pH, os ativos de quelantes orgânicos e inorgânicos e seus processos de remoção (Souza et al., 2013).

Os elementos Ferro e Manganês são metais abundantes na crosta terrestre e utilizados na indústria metalúrgica, siderúrgica e na fabricação de abrasivos. Todavia, esses metais são essenciais e estão envolvidos em diversos processos metabólicos como o transporte de oxigênio e o transporte de elétrons, entretanto grande quantidade desses metais podem se tornar um risco ambiental, pois quando ingeridos em excesso, podem produzir efeitos tóxicos sobre os organismos. O excesso de Fe dissolvido na água pode causar, por exemplo, a formação de flocos de ferro nas brânquias dos peixes resultando na sua obstrução, acarretando perturbações respiratórias (Bury et al., 2003). A maior parte do Mn utilizado pelas indústrias está na forma de ferro-ligas sendo um importante elemento da liga do aço utilizado em siderúrgicas, sendo um componente na fabricação de pilhas, baterias e compostos orgânicos para a secagem de tintas. Em excesso pode causar desordens neurológicas e motoras, além de problemas respiratórios. Portanto, é importante estudarmos a associação entre esses metais e se existem efeitos sinérgicos entre eles (Rocha e Afonso, 2012).

Os moluscos bivalves do gênero *Crassostrea* sp., conhecidos popularmente como ostras do mangue que ocorrem juntos as raízes da vegetação de manguezais, representam uma população de suma importância na estrutura da comunidade e na manutenção do ecossistema por serem

organismos filtradores, podendo assim absorver toxinas, poluentes e microrganismos presentes no estuário (Nascimento et al., 2011), logo, são bastante utilizados em programas de biomonitoramento ambiental por possuírem características como: hábito de vida sedentário, vasta distribuição, resistência a parâmetros físicos e químicos do ambiente, presença ao longo de todo ano, respostas às variações dos níveis de contaminação no ambiente (Rocha, 2000).

O ecossistema estuarino onde esses bivalves ocorrem, constitui uma importante barreira geoquímica na interface continente-oceano, recebendo um grande aporte de efluentes domésticos e resíduos industriais e retendo contaminantes metálicos (Alongi et al., 2004), sofrendo impactos diretos e indiretos de contaminação ambiental. Parte dos contaminantes que adentram o ambiente aquático ficam retidos nos sedimentos, sendo que a concentração de poluentes no sedimento é menos variável do que na água (Monroy et al., 2014), pois funcionam como um sumidouro temporário de xenobióticos, que de acordo com as condições ambientais, podem ser liberados novamente para a coluna d'água, e dessa forma tornam-se biodisponíveis para os organismos novamente. Os bivalves, como as ostras, são organismos desse tipo de local, que são afetados constantemente quando na presença de agentes tóxicos como os metais.

Diante disso o presente trabalho propõe a hipótese de que a exposição semi crônica de indivíduos de *Crassostrea rhizophorae* ao Mn e ao Fe provocam a bioacumulação dos mesmos no tecido animal, e ainda provocam alterações bioquímicas e danos ao material genético. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do Mn e do Fe separadamente e associados um ao outro em exemplares de *Crassostrea rhizophorae* a partir da realização de análises genotóxicas, bioquímicas e por meio da quantificação do metal no tecido animal.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 ÁREA DE COLETA**

As coletas dos exemplares de *Crassostrea rhizophorae*, foram realizadas na Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão (EEMIL), localizada em Vitória, no estado do Espírito Santo (Tabela 1). Os pontos de coleta foram

escolhidos de acordo com as classes de vulnerabilidade, onde a área do Canal dos Escravos apresenta baixo grau de interferência antrópica (Tulli et al., 2007). A coleta foi licenciada (Nº 4053546/2013) pelo departamento de Meio ambiente da Prefeitura Municipal de Vitória/ES.

**Tabela 1** – Coordenadas geográficas da área de coleta dentro da Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão (EMIL), onde foram obtidas as amostras de ostras, *Crassostrea rhizophorae* para análise.

PONTO	COORDENADAS	DESCRIÇÃO
1	20°15'641"S 40°19'960"O	Canal dos Escravos (próximo ao Apicum)
2	20°14'54.52"S 40°19'18.99"O	Canal dos Escravos (encontro do Canal com a baía)

### 3.2 COLETA DAS OSTRAS

Foram coletados 264 indivíduos adultos (4 a 6 cm de comprimento) nas raízes de *Rhizophora mangle* no manguezal do Canal dos Escravos, nos pontos 1 e 2, e em seguida foram transportados para o Laboratório de Ictiologia Aplicada (LabPeixe) da Universidade Vila Velha (UVV). Aquários contendo 20 litros de água do mar misturada com água doce filtrada, receberam 8 animais cada, com aeração constante, média de temperatura de 27 °C, salinidade 24 ppt, oxigênio dissolvido 7,18 e pH 7,34, onde permaneceram nesta condição por 24 h para aclimação. As medições foram realizadas com auxílio de um multiparâmetro YSI Environmental.

### 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 BIOENSAIO

O trabalho foi dividido em duas etapas. A primeira foi realizada entre os dias 21 e 30 de julho com análise dos danos causados pela contaminação do Fe e Mn separadamente e dos dias 19 a 28 de outubro avaliando os metais em associação.

Logo após a coleta e antes da exposição aos contaminantes, foram separados 10 animais para o T0, onde foram realizados os testes bioquímicos, genotóxicos e de bioacumulação nos tecidos a fim de obtermos valores de referência do local de coleta. Após a aclimação, os animais foram distribuídos

em aquários de vidro (20 L), cada um contendo oito indivíduos, onde foram expostos aos tratamentos, com três réplicas cada um, pelo período de 10 dias.

A água que abasteceu todos os aquários foi coletada na praia de Itapuã, em Vila Velha, ES, sendo a salinidade da água de todos os aquários ajustada para o valor igual ao encontrado na água do manguezal do Canal dos Escravos (24 ppt). As concentrações de metais utilizadas nos experimentos foram escolhidas de acordo com a quantidade de Fe e Mn permitida pela resolução 357/2005 CONAMA, a quantidade de Fe e Mn encontrada na Baía de Vitória, ES, e a uma concentração cinco vezes maior do que a permitida pelo CONAMA. As soluções foram preparadas a partir de uma solução de Fe-EDTA ( $C_{10}H_{13}FeN_2O_8$ ) e Sulfato de manganês ( $MnSO_4$ ).

Os tratamentos testados no presente trabalho foram:

I. Tratamento controle (C): composto de água do mar sem adição de qualquer contaminante.

II. Tratamento com Mn: composto de água do mar acrescido de três concentrações diferentes de Mn (0,049; 0,1 (CONAMA) e 0,5 mg/L), para cada grupo de três aquários.

III. Tratamento com Fe: composto de água do mar acrescido de três concentrações diferentes de Fe (0,3 (CONAMA); 0,440; e 1,5 mg/L), para cada grupo de três aquários.

IV. Tratamento com Fe e Mn associados: composto de água do mar acrescido de três concentrações diferentes de Fe e Mn (0,440 Fe + 0,049 Mn; 0,3 Fe + 0,1 Mn (CONAMA), e 1,5 Fe + mg/L 0,5 Mn), para cada grupo de três aquários.

Ao longo dos 10 dias de experimento a água não foi renovada e os animais não foram alimentados. Foram coletadas amostras de água ao longo dos 10 dias de experimento para controle de pH e quantificação de metais. Após o período de exposição, os animais foram dessensibilizados em água gelada para posterior extração de hemolinfa e coleta de tecidos para os testes bioquímicos, genotóxicos, e quantificação de metais.

Todos resíduos gerados durante a realização do experimento foram devidamente armazenados e encaminhados para uma empresa de coleta e tratamentos de resíduos.

### **3.4 COLETA DE HEMOLINFA E TECIDOS**

A extração da hemolinfa foi realizada segundo metodologia descrita por Lowe et al. (1995), onde os indivíduos tiveram sua hemolinfa extraída do músculo adutor posterior com ajuda de uma seringa com agulha hipodérmica, para realização das análises genotóxicas. Em seguida os animais tiveram suas conchas abertas e os tecidos branquiais foram retirados, colocados em microtubos e imediatamente congelados em freezer -80 °C até o momento das análises bioquímicas. Amostras de tecido total foram removidas e acondicionadas em microtubos de polietileno e congeladas a -20 °C para quantificação dos metais presentes.

### **3.5 COLETA DE ÁGUA**

A coleta de 5 ml de água em cada aquário foi realizada a cada 24 h utilizando frascos plásticos. Após a coleta a água foi acidificada utilizando HNO<sub>3</sub> até atingir pH > 2. Em seguida as amostras foram armazenadas refrigeradas, até o momento da quantificação de metais.

### **3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

#### **3.6.1 CATALASE E GLUTATIONA S-TRANSFERASE**

As brânquias foram descongeladas e homogeneizadas com tampão fosfato (pH 7,0) e após serem centrifugadas (13000 RPM) por 30 minutos, a 4 °C, foi obtido o sobrenadante que foi utilizado para a medição da atividade das enzimas Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST).

A atividade da CAT foi analisada de acordo com o método descrito por Beutler (1975). Nesta metodologia, o decréscimo de absorbância associado à velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água e oxigênio molecular foi registrado a 240 nm.

A atividade enzimática da GST foi determinada utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM GSH e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda em 340 nm, em um leitor de placa. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDBN (Habig et al.,1974).

### **3.6.2 PROTEÍNA TOTAL**

O valor de Proteína Total do tecido branquial foi determinado utilizando uma Mistura Reativa (sulfato de cobre, tartarato de sódio e potássio e solução alcalina), albumina bovina e o Reativo de Folin na diluição de 1:2 (Bradford, 1976). Foi feita uma curva padrão utilizando 4 mg de albumina diluída em 5 ml de água miliQ, obtendo uma concentração final de 800 µg, que será considerado o primeiro ponto da curva. Os próximos pontos da curva foram determinados realizando uma diluição seriada: retirou-se 500 µl da solução mais concentrada e adicionou-se 500 µl de água mili-Q. Assim, obteve-se os pontos 400 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg, 25 µg, 12,5 µg e 6,25 µg. Para análise da proteína, pipetou-se 5 µl das soluções da curva padrão, na microplaca, além do branco (água miliQ). Depois, pipetou-se 5 µl da amostra e mais 200 µl da solução de Bradford em todos os poços ocupados.

A proteína total foi calculada a partir da leitura feita no espectrofotômetro Spectramax 190, a 595nm (Bradford, 1976). Essa análise foi realizada a fim de prover os cálculos das enzimas CAT e GST que foram expressas em mg de proteína.

### **3.7 ANÁLISE GENOTÓXICA: ENSAIO DO COMETA ALCALINO**

A análise de fragmentos de DNA foi realizada utilizando ensaio do cometa alcalino e coloração com nitrato de prata modificado de Tice et al. (2000). O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em microgel de agarose. Para a realização do teste foram usadas lâminas de microscopia cobertas previamente com agarose 1,5 % (1,80 g de agarose e 120 ml tampão fosfato alcalino, pH 7,4), duas para cada organismo.

As células da hemolinfa das ostras foram coletadas do músculo adutor do bivalve com seringa. As amostras foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente, 10 µl de da hemolinfa diluída foi misturada com 100 µl de agarose Low Melting (0,15 g agarose em 20 ml de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 40 °C. As lâminas foram recobertas com lamínulas para o gel se espalhar e solidificar. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise (146,1 g NaCl (2,5 M), 37,2 g EDTA (100 mM), 1,2 de Tris (10 mM), 1 litro de água destilada e o pH da solução foi ajustado para 13 com NaOH e no momento do uso foi adicionado 1 % de Triton X-100 e 10 % DMSO) por no mínimo 2 h e no máximo uma semana, em geladeira protegidos da luz.

Após a lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300 mM NaOH e 1 mM EDTA em pH >13) por 20 minutos. Após este tempo foi realizada a corrida eletroforética em 25 V e 300 mA por 15 minutos e depois as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (48,5 g de Tris em 1 litro de água destilada) durante 5 minutos e lavadas com água destilada por 2 vezes. As lâminas ficaram em temperatura de 37 °C por 2 h até que estivessem secas. Após a secagem as lâminas foram fixadas em solução fixadora (15 % ácido tricloroacético, 5 % de sulfato de zinco (Heptahidratado), 5 % de glicerol e 1 L de água) por 10 minutos, depois as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e secas novamente por 2h a 37 °C.

Já secas as lâminas foram hidratadas por 5 minutos com água destilada e coradas com solução de coloração com prata (66 ml da solução de carbonato de cálcio (12,5 g de CaCO<sub>3</sub> para 250 ml de água) e 34 ml da solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) (50 mg de AgNO<sub>3</sub>, 50 mg de Nitrato de Amônio (NH<sub>4</sub>)(NO<sub>3</sub>), 250 mg de ácido tungstosalicílico e 125 ml de formaldeído) por 15 min a 37 °C. Depois de coradas as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada e então submersas por 5 min em solução *stop* (ácido acético 1 %). Passados 5 min de reação, foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente.

Os danos no DNA foram medidos de acordo com tamanho da cauda formado por arraste de DNA fragmentado, esses divididos em 5 classes: Classe 0 – Não há formação de cauda; Classe1 - A cauda formada é menor que o diâmetro do núcleo; Classe 2 - Cauda com variação de comprimento entre 1x a 2x o diâmetro do núcleo; Classe 3 - Cauda maior que 2x o diâmetro do núcleo e Classe 4 - Apoptose da célula (Grazeffe et al., 2008). O índice de danos (ID) foi então analisado, contabilizando o número de células danificadas multiplicado pelo valor da classe do dano (0 a 4).

### **3.8 QUANTIFICAÇÃO DE METAIS**

#### **3.8.1 NA ÁGUA**

Para dosagem de metais na água, foi utilizado o método descrito por Bednar et al. (2010). As amostras foram coletadas utilizando tubos de polietileno, previamente submersos em solução de ácido nítrico (10 %) por 24 h, e posteriormente lavados com água Milli-Q. Para análise de metais as

amostras foram acidificadas (ácido nítrico), filtradas (poro 0,45  $\mu$ m) e armazenadas (13 ml) em tubos falcon (ppt) para a quantificação das concentrações de metais dissolvidos (Mn e Fe). A quantificação foi realizada em forno grafite, em um espectrofotômetro de absorção atômica (Thermo ICE3500).

### **3.8.2 NOS TECIDOS**

As amostras foram coletadas utilizando tubos de polietileno, previamente submersos em solução de ácido nítrico (10 %) por 24 h, e posteriormente lavados com água Milli-Q. Seguindo a metodologia do trabalho de Kehrig et al., 2007, o tecido úmido foi digerido com uma solução de ácidos fortes, HCl:HNO<sub>3</sub> (3:1) e a quantificação dos metais foi determinada por meio da absorção atômica (AAS) com chama (Thermo ICE3500).

### **3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Uma vez atendidas às premissas de normalidade D'Agostino-Pearson, os resultados obtidos em todos os tratamentos foram comparados entre si por meio de uma análise de variância (ANOVA) one-way, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Para a realização das análises foi utilizado o software Graphpad Prism . Diferenças estatísticas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

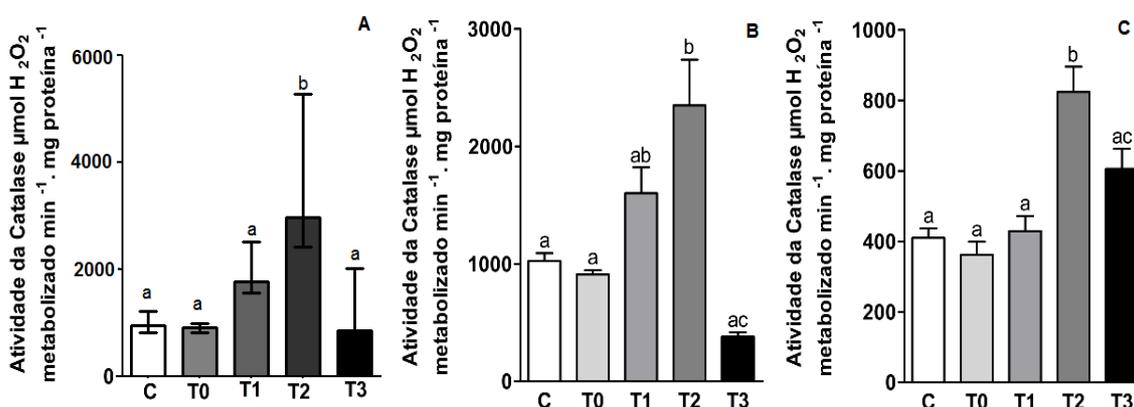
### **4.1 EFEITOS BIOQUÍMICOS**

Em exposição ao Mn, a atividade da enzima CAT nas ostras aumentou significativamente quando expostas ao T2 (CONAMA) em relação aos grupos C, T0, T1 e T3 (Figura 2A). No entanto essa mesma resposta não foi observada no T3, onde não foi observada alteração significativa da CAT em relação aos demais tratamentos.

Em relação aos tratamentos onde as ostras foram expostas ao Fe, a atividade da CAT aumentou significativamente no tratamento T2 em relação aos demais grupos. Por outro lado, no tratamento T3, não foi observado alteração significativa da CAT em relação ao grupo controle e aos tratamentos T0 e T1 (Figura 2B).

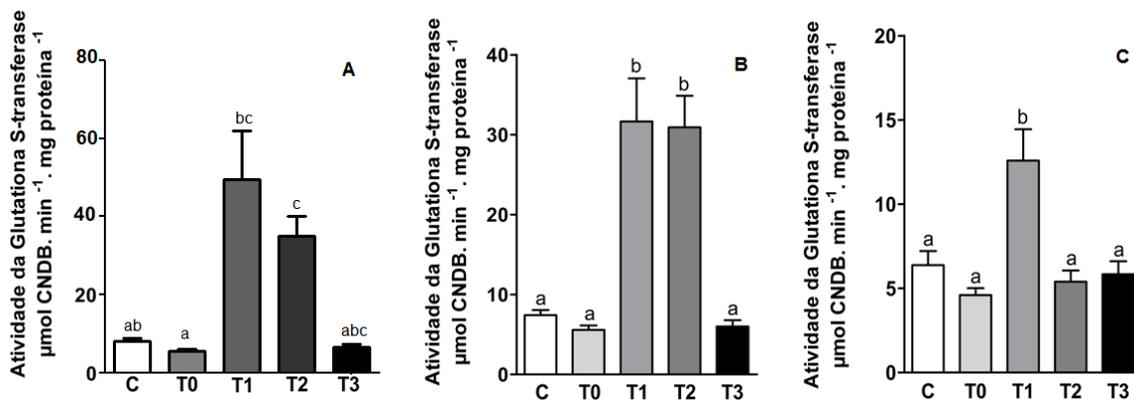
O comportamento da atividade da CAT nas ostras expostas à associação do Mn e ao Fe foi similar às exposições aos metais de forma isolada, houve um aumento significativo no tratamento T2 (CONAMA) em relação aos demais

grupos e não houve alteração significativa da atividade da enzima no T3 em relação aos demais tratamentos (Figura 2C).



**Figura 2.** Atividade da enzima catalase (CAT) em exemplares de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição de 10 dias, a quatro tratamentos: A) exposição ao Mn - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Mn; T1 = adição de 0,049 mg/L; T2 = adição de 0,1 mg/L (CONAMA) e T3 = adição de 0,5 mg/L de Mn); B) exposição ao Fe - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição; T1= adição de 0,3 mg/L (CONAMA); T2 = adição de 0,440 mg/L de e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe); C) exposição ao Mn+Fe - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da; T1= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove.

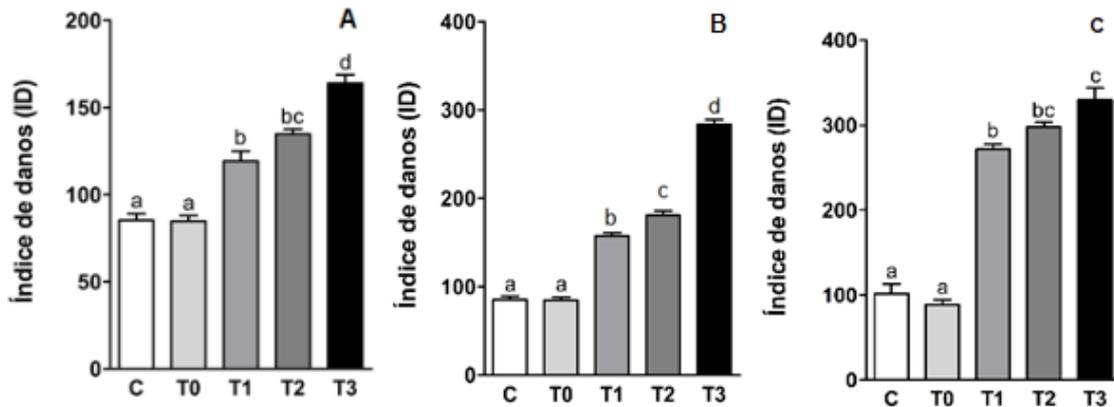
A exposição dos exemplares de ostras ao Mn e ao Fe de forma isolada causou comportamento similar ao da atividade da GST em ambas as exposições, houve um aumento significativo nos tratamentos T1 e T2 em relação aos demais grupos (Figura 3A e 3B). Por outro lado, a atividade da GST nos animais expostos ao Fe e ao Mn em associação aumentou de forma significativa apenas no grupo exposto ao T1 em relação aos outros tratamentos (Figura 3C).



**Figura 3.** Atividade da enzima glutatona S-transferase (GST) em exemplares de *Crassostrea rhizophorae* após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: em exemplares de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição de 10 dias, a quatro tratamentos: A) exposição ao Mn - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Mn; T1 = adição de 0,049 mg/L; T2 = adição de 0,1 mg/L (CONAMA) e T3 = adição de 0,5 mg/L de Mn); B) exposição ao Fe - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição; T1= adição de 0,3 mg/L (CONAMA); T2 = adição de 0,440 mg/L de e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe); C) exposição ao Mn+Fe - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da; T1= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove.

#### 4.2 EFEITOS GENOTÓXICOS

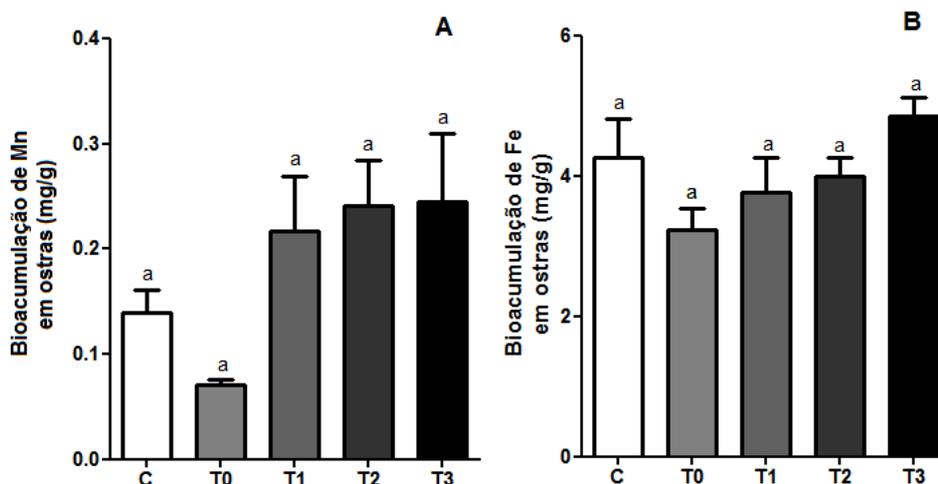
Em relação à análise genotóxica, em todos os protocolos e tratamentos em que as ostras foram expostas aos metais ocorreu aumento no índice de danos no DNA em relação ao grupo controle e ao T0, sendo o tratamento T3 o que apresentou valores mais elevados em relação aos demais (Figura 4A, B e C).



**Figura 4.** Frequência do Índice de Danos no DNA em exemplares de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos. em exemplares de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição de 10 dias, a quatro tratamentos: A) exposição ao Mn - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Mn; T1 = adição de 0,049 mg/L; T2 = adição de 0,1 mg/L (CONAMA) e T3 = adição de 0,5 mg/L de Mn); B) exposição ao Fe - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição; T1= adição de 0,3 mg/L (CONAMA); T2 = adição de 0,440 mg/L de e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe); C) exposição ao Mn+Fe - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da; T1= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove.

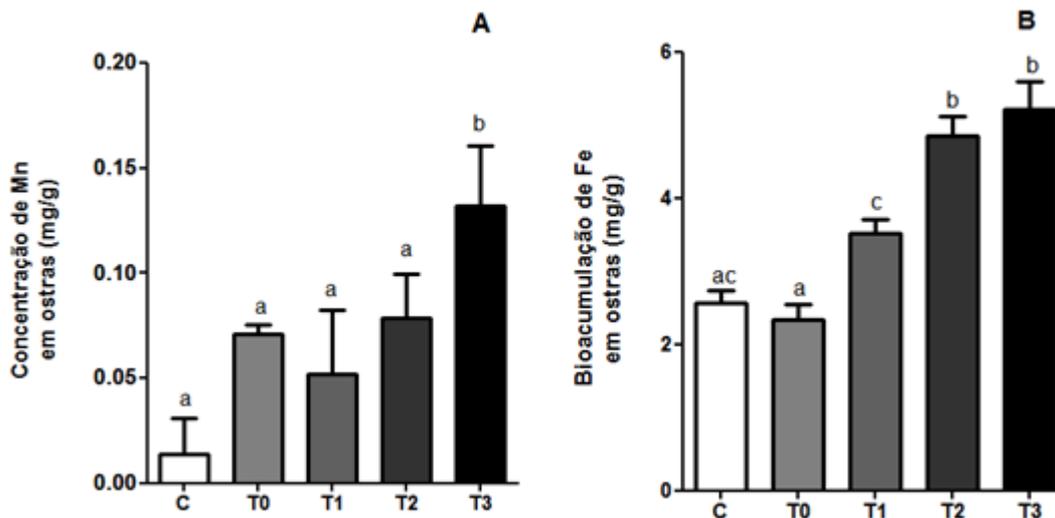
### 4.3 BIOACUMULAÇÃO NOS TECIDOS

A bioacumulação de metais no tecido total das ostras expostas ao Mn e ao Fe, de forma isolada, não foi significativa em relação aos grupos controle e T0 (Figura 5A e B).



**Figura 5.** Concentração de Mn (A) e de Fe (B) no tecido total de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: A) exposição ao Mn - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Mn; T1 = adição de 0,049 mg/L; T2 = adição de 0,1 mg/L (CONAMA) e T3 = adição de 0,5 mg/L de Mn); B) exposição ao Fe - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição; T1= adição de 0,3 mg/L (CONAMA); T2 = adição de 0,440 mg/L de e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe); C) exposição ao Mn+Fe - (C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da; T1= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove.

Por outro lado, nos tratamentos onde as ostras foram expostas ao Mn e ao Fe em associação foi observado abioacumulação dos dois metais no tecido total (Figura 6A e 6B). O Mn acumulou apenas no último tratamento e o Fe acumulou nos três tratamentos (T1, T2 e T3) (Figura 6B).

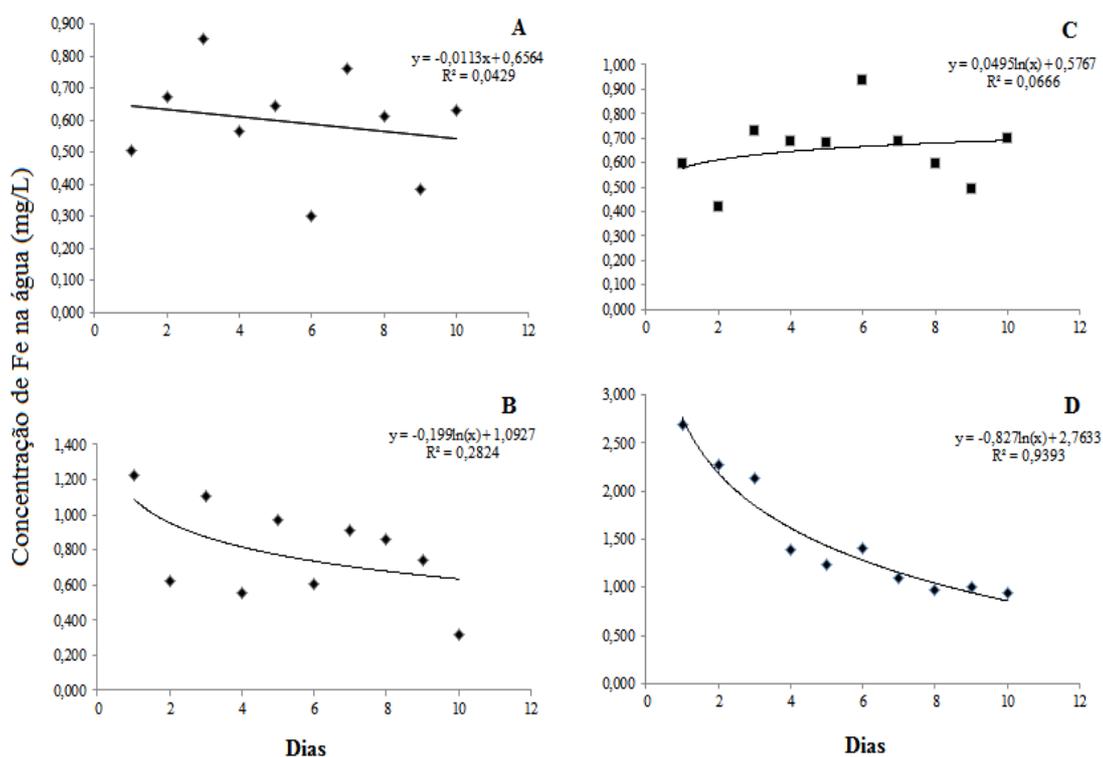


**Figura 6.** Concentração de Mn (A) e de Fe (B) bioacumulado no tecido total de *Crassostrea rhizophorae*, após exposição, de 10 dias, a quatro tratamentos: C = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; T0 = antes da exposição ao Mn+Fe; T1= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; T2 = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e T3 = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro padrão da média. Cada tratamento teve o número amostral igual a nove. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos.

#### 4.4 CONCENTRAÇÕES DE FERRO E MANGANÊS NA ÁGUA

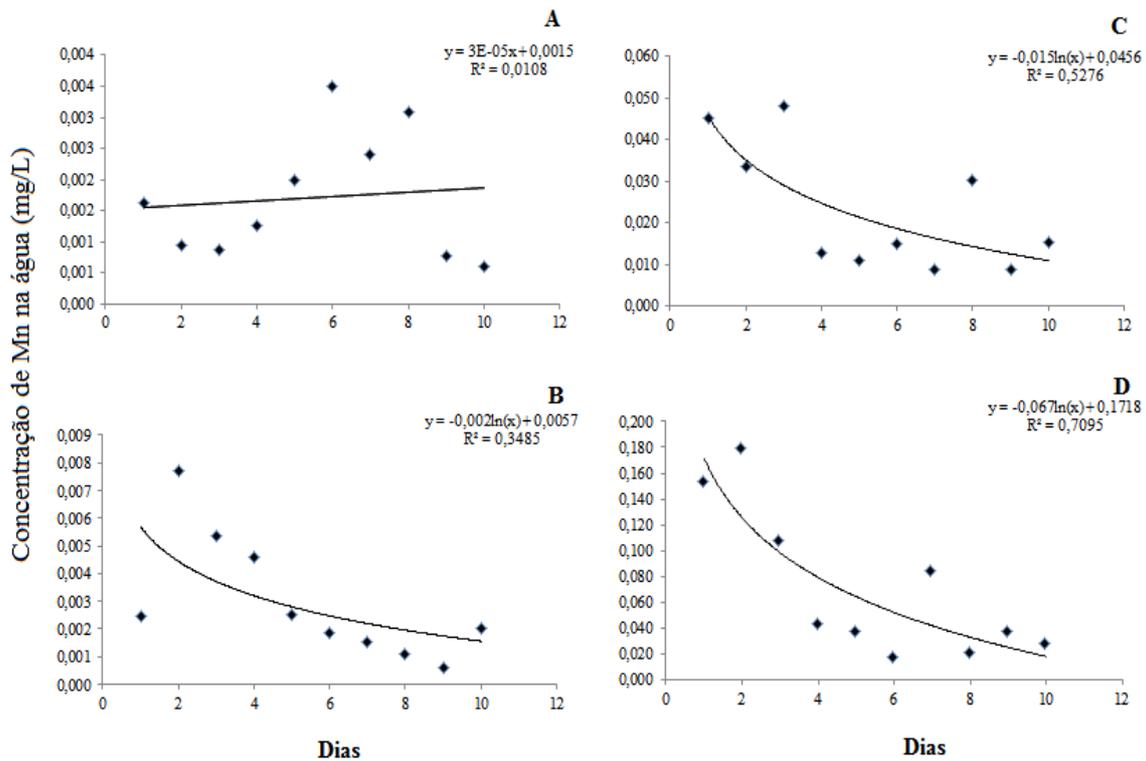
Em todos os experimentos, observou-se uma maior relação da concentração dos metais em relação aos dias nos tratamentos que foram expostos. No início do experimento as concentrações de metais eram mais altas, porém ao longo dos experimentos as concentrações foram decrescendo gradativamente (Figuras 7, 8 e 9).

Quando analisado o Fe separadamente, as concentrações de Fe variaram entre 0,856 e 0,301 mg/L no grupo controle, 1,222 e 0,319 no T1, 0,934 e 0,415 no T2 (CONAMA) e 2,694 e 0,941 no T3. A maior correlação foi no tratamento com 1,5 mg/L de Fe (T3) ( $R^2=0,9393$ ) (Figura 7).



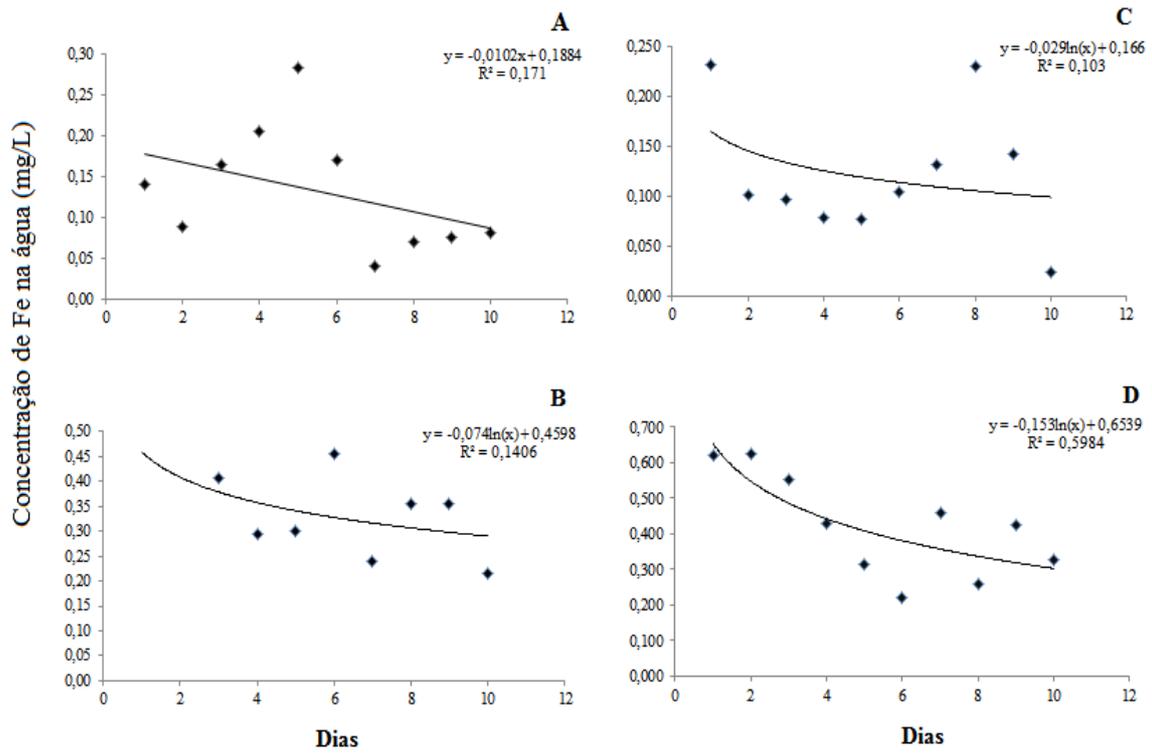
**Figura 7.** Quantificação de Fe na água coletada por 10 dias nos aquários. A = grupo controle – sem adição de qualquer metal; B= adição de 0,3 mg/L de Fe (CONAMA); C = adição de 0,440 mg/L de Fe e D = adição de 1,5 mg/L de Fe. Valores expressos em mg/L.

Quando analisado o Mn separadamente, as concentrações de Mn variaram entre 0,003 e 0,0006 mg/L no grupo controle, 0,007 e 0,0005 no T1, 0,048 e 0,008 no T2 (CONAMA) e 0,179 e 0,027 no T3. A maior correlação foi no tratamento com 0,5 mg/L de Mn (T3) ( $R^2=0,7095$ ) (Figura 8).

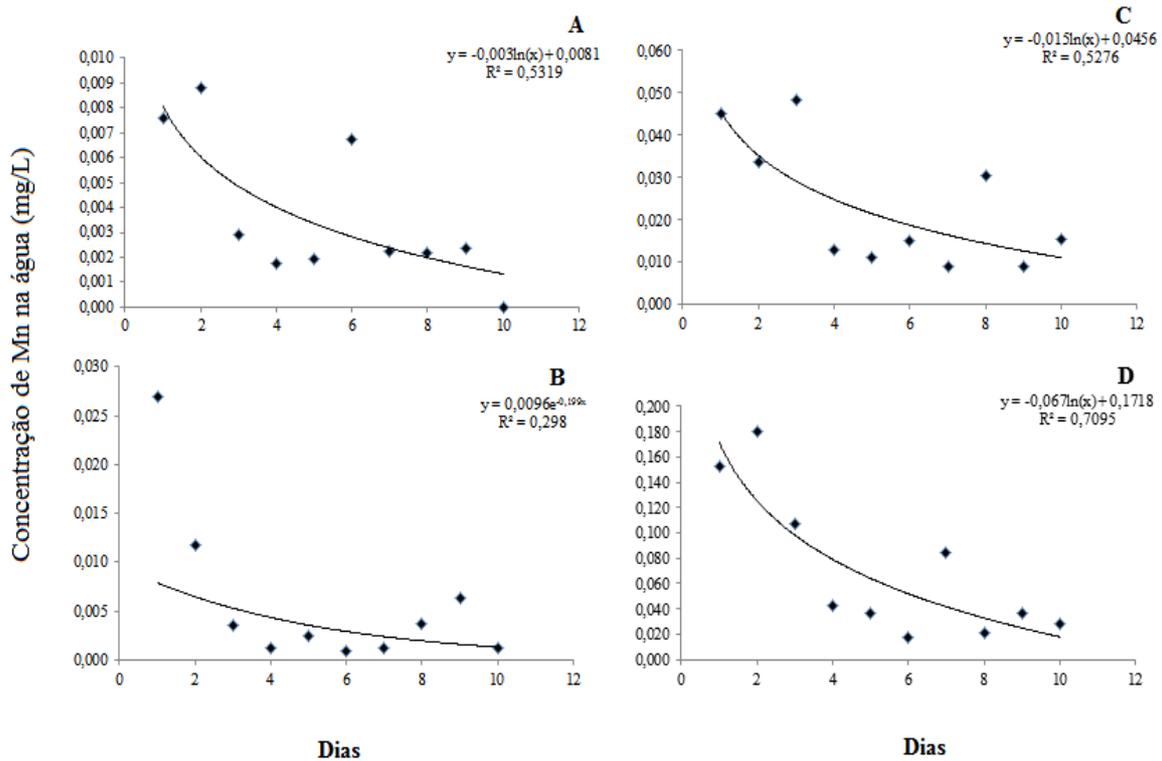


**Figura 8.** Quantificação de Mn na água coletada por 10 dias nos aquários. A= grupo controle – sem adição de qualquer metal; B= adição de 0,049 mg/L de Mn; C = adição de 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e D = adição de 0,5 mg/L de Mn. Valores expressos em mg/L.

Quando analisados em associação, as concentrações de Fe variaram entre 0,280 e 0,04 mg/L no grupo controle, 0,46 e 0,21 no T1, 0,233 e 0,024 no T2 (CONAMA) e 0,620 e 0,219 no T3 (Figura 9). A maior correlação foi no tratamento 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn (T3) ( $R^2=0,5984$ ). As concentrações de Mn na água variaram entre 0,009 e 0,000 mg/L no grupo controle, 0,027 e 0,001 no T1, 0,049 e 0,009 no T2 (CONAMA) e 0,180 e 0,017 no T3 (Figura 10). A maior correlação foi no tratamento com 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn (T3) ( $R^2=0,7095$ )



**Figura 9.** Quantificação de Fe na água dos aquários expostos ao Fe e ao Mn em associação. A = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; B= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; C = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e D = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn. Valores expressos em mg/L.



**Figura 10.** Quantificação de Mn na água dos aquários expostos ao Fe e ao Mn em associação. A = grupo controle negativo – sem adição de qualquer metal; B= adição de 0,440 mg/L de Fe + 0,049 mg/L de Mn; C = adição de 0,3 mg/L de Fe + 0,1 mg/L de Mn (CONAMA) e D = adição de 1,5 mg/L de Fe + 0,5 mg/L de Mn. Valores expressos em mg/L.

## 5. DISCUSSÃO

Apesar de serem metais essenciais para a manutenção da vida, o  $Fe^{2+}$  e o  $Mn^{2+}$  podem gerar impactos negativos no ecossistema estuarino por sua toxicidade, mesmo quando as concentrações desses metais estão dentro do permitido pela legislação vigente. Embora não ocorra letalidade dos organismos nessas concentrações, eles ainda assim representam riscos à comunidade, pois podem ser bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica e produzir efeitos deletérios nos organismos (Burgera e Gochfeldb, 2005; Salami et al., 2008). Os resultados obtidos no presente estudo mostram os impactos causados pelas diferentes concentrações de  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  na estrutura do DNA de ostras e como os sistemas enzimáticos presentes em suas células respondem a esses estressores. As comparações sobre os efeitos

bioquímicos e genotóxicos do  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  com outros estudos são difíceis, pois, a maioria dos estudos é realizada dentro do ecossistema e são estudos de biomonitoramento.

Para testar a relação entre a atividade das enzimas CAT e GST e as diferentes concentrações de Mn e Fe usadas nos tratamentos (Figuras 2 e 3), foi analisado o tecido brânquial das ostras, por ser este um dos principais órgãos envolvidos na absorção de nutrientes, digestão e respiração celular do organismo (Gomez-Mendikute et al., 2005).

No presente trabalho observou-se que a exposição das ostras ao  $\text{Fe}^{2+}$  e ao  $\text{Mn}^{2+}$  nas concentrações encontradas na Baía de Vitória e mesmo na estabelecida pelas normas do CONAMA (0,3 mg/L para o Fe e 0,1 mg/L para Mn) induziram a ativação da CAT. Essa enzima é considerada como uma das principais enzimas antioxidantes, e possui uma alta atividade catalítica em bivalves (Almeida et al., 2007). A ativação desse sistema de defesa tende a aumentar frente à exposição a contaminantes, a fim de proteger os organismos contra uma possível situação de estresse oxidativo. Em bivalves, a CAT é frequentemente utilizada em estudos ecotoxicológicos, e o aumento de sua atividade é associada com a exposição a vários contaminantes, como esgoto não tratado (Bergayou et al., 2009), pesticidas (Alves et al., 2002), locais contaminados por efluentes urbanos (Torres et al., 2002), hormônios e contaminantes desreguladores endócrinos (Canesi et al., 2008) e fármacos (benzafibrato e gemfibrozil) (Canesi et al., 2007).

Zanette et al. (2008) também observaram uma relação positiva da CAT em brânquias de *C. rhizophorae* expostas por um período de 48 horas a duas semanas em presença de esgoto doméstico. Os autores apontam que os resultados obtidos nos experimentos indicam que o biomarcador bioquímico em *C. rhizophorae* é um forte expressor do estresse causado por poluentes orgânicos. E o presente trabalho indica que poluentes inorgânicos, como os metais testados aqui (Fe-EDTA e Sulfato de manganês) também são indutores de estresse oxidativo, mesmo quando dentro dos parâmetros exigidos pela legislação.

Por outro lado, observou-se também que a exposição das ostras às maiores concentrações de  $\text{Mn}^{2+}$  (0,5 mg/L) e de  $\text{Fe}^{2+}$  (1,5 mg/L) testadas (T3) provocaram uma diminuição na atividade da CAT nas brânquias de ostras em

relação aos demais tratamentos. A catalase é uma hemoproteína que possui um grupo heme e sua estrutura catalítica. Estes resultados encontrados, devem-se, provavelmente, por estes metais possuírem uma maior afinidade por grupamentos sulfidríla presentes nas enzimas envolvidas na rota de biossíntese do grupo heme, tais como  $\alpha$ -aminilevulinato desidratase (ALAD), causando assim uma inibição da síntese do grupo heme. Dessa forma a maior concentração desses metais pode ter inibido a atividade da CAT, o que pode explicar os resultados obtidos neste trabalho. Além disso a diminuição na atividade das enzimas antioxidantes pode estar relacionada a exposição dos organismos a altas concentrações de contaminantes onde a produção das ERO's e as injúrias que elas causam nos organismos sobrepõem aos esforços de defesa do organismo.

Já em relação à ativação do sistema de detoxificação das ostras, observou-se que o  $Mn^{2+}$  provocou elevação da atividade da enzima GST em todas as concentrações testadas, sendo essa elevação significativa no tratamento contendo a concentração permitida pelo CONAMA (Figura 3A). Esse efeito também foi observado na exposição ao  $Fe^{2+}$  (Figura 3B) e quando associados os metais  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  (Figura 3C), apenas no T1. Esses resultados indicam claramente que o  $Mn^{2+}$  e o  $Fe^{2+}$ , causam uma ativação do sistema de detoxificação desses organismos, a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e excretados para o meio extracelular e até mesmo corrigir os efeitos deletérios causados por estes poluentes (Carletti et al., 2008; Huber e Almeida, 2008).

Alves et al. (2002) realizaram estudos sobre os efeitos do Furadan (pesticida agrícola) em ostras *C. rhizophorae*, determinando os níveis da glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) antes e depois da exposição ao pesticida, percebendo que os níveis de GST aumentaram 9 % nas ostras *C. rhizophorae* estudadas, após serem expostas ao pesticida.

No entanto, observou-se também que as ostras expostas à maior concentração de  $Fe^{2+}$  e à associação de  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  (T3) (Figura 3B e 3C) não apresentaram alteração na atividade da GST em relação grupo controle, porém foi menor que o T1 e T2. Vale ressaltar que a maior concentração de Fe (1,5 mg/L) foi três vezes o valor da maior concentração de Mn (0,5 mg/L).

A inibição na atividade da GST pode estar envolvida com a desestabilização da membrana lisossômica, provocada pela exposição aos metais ou ao estresse de radicais livres, o que pode causar a ruptura da membrana e liberar diversos radicais e íons ácidos, que prejudica o funcionamento normal da enzima (Regoli et al., 1998).

A caracterização dos efeitos genotóxicos causados pelo  $Mn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  (Figuras 4A, B e C) foi realizada no presente trabalho por meio do Índice de Danos no DNA (ID). Os resultados obtidos detectaram alterações significativas nos níveis de quebras das fitas de DNA de hemócitos de *C. rhizophorae*, em todos os tratamentos em relação ao controle, demonstrando o significativo potencial desses metais em causar danos no DNA das ostras. Alterações como estas na estrutura do DNA e nas proteínas têm sido encontradas associadas com a exposição a um grande número de contaminantes, dentre eles os metais (Pandurangi et al., 1995; Lee e Steinert, 2003). Muitas dessas moléculas são altamente reativas e possuem uma alta afinidade com proteínas e com a molécula de DNA (Pisoni et al., 2004), por isso o ensaio cometa tem sido amplamente usado para investigar impactos da exposição ambiental a contaminantes e neste estudo, demonstrou-se eficiente na interpretação dos efeitos deletérios de diferentes concentrações de  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ . Portanto, os exemplares de *C. rhizophorae*, analisados neste trabalho, estão sujeitos a alterações nas moléculas proteicas, bem como nas cadeias de DNA, podendo inclusive, de acordo com Vernier (2001), causar mutações, gerando uma cascata de eventos subseqüentes que levam a disfunções na replicação e no reparo das fitas, processos descontrolados de divisões celulares, e que podem gerar neoplasias nos tecidos e até mesmo a morte celular.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem também que a ação genotóxica dos poluentes foi mais intensa nos tratamentos onde as ostras foram expostas às maiores quantidades de  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  na água. O presente estudo confirma a utilização do ensaio cometa em hemolinfa de ostras como uma ferramenta bastante sensível para a detecção de genotoxicidade nos ecossistemas aquáticos (Andrade et al., 2004; Frenzilli et al., 2009).

Rank (2003) identificou um aumento significativo nas quebras de DNA de células brânquiais de *Mytilus edulis* expostas à efluentes industriais e urbanos, na costa da Dinamarca, com níveis de metais extremamente elevados em

relação a uma região de referência, indicando riscos causados por mistura complexas de poluentes nos diferentes compartimentos, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Quanto à bioacumulação nos tecidos da *C. rhizophorae* podemos observar que o acúmulo de  $\text{Fe}^{2+}$  no tecido das ostras variou entre 2,57 e 5,22 mg/g nos diferentes tratamentos (Figura 5A). E apesar de não terem sido encontrados diferença significativa entre eles, observa-se um gradativo aumento de bioacumulação deste metal nas ostras, quando em exposição isolada ou quando associado ao  $\text{Mn}^{2+}$  (Figura 6A). De acordo com Souza (2002) que avaliou a contaminação por metais (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn) nos manguezais dos Rios Aribiri, Bubu e Santa Maria da Vitória - Grande Vitória/ES - utilizando *C. rhizophorae* e *Mytella guyanensis* como bioindicadores, identificou-se que o Fe já estava acumulado nesses organismos e que a concentração no tecido variou de 0,025 a 1,41 mg/g em ostras e de 0,102 a 2,74 mg/g em sururus, sendo menores do que as concentrações encontradas no presente estudo. Essa diferença se dá possivelmente ao presente estudo ser um bioensaio, onde os bivalves ficaram expostos a um volume pequeno de água e alta dose de contaminantes, diferentemente dos estudos de biomonitoramento.

Do ponto de vista de saúde pública, não há referência de concentração máxima de poluentes para o elemento Fe em moluscos na legislação brasileira. Pedroza e Cozzolino (2001) analisando a composição mineral destes organismos encontraram valor médio de Fe de 17 mg % (17000  $\mu\text{g}/100\text{g}$  ou 170  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) e Franc (1999) na tabela de composição química de alimentos, relata que mariscos possuem em média 12,70 mg% de Fe (12700  $\mu\text{g}/100\text{g}$  ou 127  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). Nas ostras expostas a diferentes concentrações de  $\text{Mn}^{2+}$ , a variação foi de 0,013 e 0,13 mg/g de Mn nos tecidos (Figura 5A), observando-se também uma tendência a maior bioacumulação nos tecidos das ostras expostas aos tratamentos com maiores concentrações de Mn (0,1 e 0,5 mg/L).

Cavalcanti (2003) realizou um monitoramento dos níveis de elementos traço (Hg, Mn, Zn, Cu e Fe), em ostras comercializadas na praia de Boa Viagem, Recife (Pernambuco), a fim de se avaliar os riscos e os benefícios que poderiam estar associados a seu consumo. O valor médio de Mn encontrado em moluscos nesse estudo foi maior do que o valor encontrado no estudo de

Cavalcanti (9,86  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), que estudou uma área considerada não poluída no litoral do nordeste brasileiro. Do ponto de vista de saúde pública, também não há referência de Concentração Máxima Permitida (CMP) para este metal na legislação brasileira. Por também ser um metal essencial, a dose diária recomendada é de 2 a 3 mg de Mn por dia para um adulto (Brasil, 2005).

A quantificação de Fe e Mn no tecido das ostras não apresentou nenhuma correlação a quantidade desses metais na água, uma vez que não houveram diferenças entre os tratamentos e o controle (Figuras 5 e 6). Possivelmente o pouco tempo de exposição aliado à biodisponibilidade dos elementos presentes determinaram estes resultados. Yeung et al. (2016) também acreditam que a adoção de exposição à um curto tempo de exposição (10 dias) pode ter sido responsável pela inexistência de diferenças nas concentrações de metais no tecido de *Perna viridis* entre o controle e os tratamentos.

Quando avaliadas as concentrações de Fe e Mn no tecido das ostras que foram expostas ao Fe e Mn em associação (Figura 6), observamos uma variação entre 2,57 e 5,22 mg/g de Fe acumulado nos tecidos (Figura 6A), sendo que os tratamentos com maiores concentrações de Fe (0,440 e 1,5 mg/L), foram significativamente diferentes do controle e do tratamento com menor concentração de Fe (0,3 mg/L). Em relação ao Mn, houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 6B) e o maior acúmulo de Mn observado nas ostras (0,13 mg/g) foi no T3 (0,5 mg/L de Mn). Coimbra (2003) quantificou a quantidade de metais em duas espécies de bivalves *Anomalocardia brasiliiana* e *Mytella guyanensis*, encontradas em um manguezal da Baía de Sepetiba, Brasil. Dentre os metais quantificados, quando analisados Fe e Mn esses elementos variaram entre 0,0157 e 0,2508 e 0,00074 e 0,0276 mg/g, respectivamente. A autora associa os valores de Fe e Mn à ocorrência natural destes elementos em áreas estuarinas, devido a composição mineralógica das rochas da região. Além disso, por ter sido um estudo de biomonitoramento, devemos considerar que no ecossistema, o sedimento funciona como um sumidouro temporário de poluentes, que de acordo com as condições ambientais, podem ser liberados novamente para a coluna d'água, e dessa forma tornam-se biodisponíveis para os organismos. Já no presente estudo, o bioensaio foi realizado em laboratório, portanto, é esperado que as

concentrações de Fe e Mn no tecido das ostras sejam maiores do que as encontradas em estudos de biomonitoramento.

## **6. CONCLUSÃO**

Os metais  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ , mesmo nas concentrações recomendadas pelo CONAMA podem causar danos bioquímicos e genotóxicos em *C. rhizophorae*. As ostras demonstraram-se eficientes bioindicadores da contaminação aquática, pois, foi possível relacionar as respostas bioquímicas e genotóxicas das ostras com a dose dos contaminantes, fornecendo conhecimentos e evidências científicas necessários para a aplicação de medidas de prevenção e controle da exposição aos agentes químicos ambientais no âmbito das políticas públicas.

Os biomarcadores bioquímicos analisados em brânquias de ostras seguiram uma disposição de concentração dose-dependente, com um aumento nas atividades das enzimas CAT e GST nas concentrações encontradas na Baía de Vitória e na permitida pela legislação vigente. Os efeitos genotóxicos nos hemócitos também tiveram uma relação concentração dose-dependente.

Os dados deste estudo fornecem informações genotóxicas e bioquímicas dos mecanismos de respostas de toxicidade nas ostras expostas a diferentes concentrações de Fe e Mn, incluindo as permitidas pelo CONAMA. Dessa forma, este trabalho contribui para a compreensão de alguns aspectos da bioquímica, da genética e da bioacumulação por *C. rhizophorae*.

## 7. REFERÊNCIAS

- Agustini, M.A.B. 2013. Análise microbiológica e de metais pesados em mexilhão dourado provenientes do Lago de Itaipu em Santa Helena- PR. *Cascavel*, 6(4), 85- 95.
- Alloway, B.J. 1995. Soil processes and the behavior of heavy metals. In: *Heavy metals in soils*. New York, Blackie Academic and Professional. p. 368.
- Almeida E., Diamantino T., De Souza O. 2007b. Breve história das tintas antivegetativas. *Revista Corrosão e Protecção de Materiais.*, 26, 6-12.
- Almeida, E.A. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. New York, 146, 588-600.
- Alongi, D.M. 2002. Present state and future of the world's mangrove forests. *Environmental Conservation*, 29, 331-349.
- Alves S.R.C., Severino P.C., Ibbotson D.P., Silva A.Z., Lopes F.R.A.S., Sáenz, L.A., Bairy, A.C.D. 2002. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Marine Environmental Research*, 54, 241-245.
- Andrade, V.M., de Freitas, T.R.O., da Silva, J., 2004. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 560, 57-67. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.02.006
- Araujo, B.F, Almeida, M.G, Rangel, T.P, Rezende, C.E. 2015. Distribution and fractionation of hg in sediments from the Paraíba do Sul river – RJ, Brazil. *Química Nova*, v. 38, p 30-36.
- Arias, A.R.L., Buss, D.F., Alburquerque, C., Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M. Mugnai, R., Baptista, D.F. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12(1), 61-72.
- Aspuro-Hernandez, E., Garcia-Orozco, K.D., Muhlia-Almazan, L.T.S., Robles-Sanches, R.M., Hernandez, J., Gonzales-Aguilar, G., YepizPlascenci, G., Sotelo-Mundo, R.R. 2008. Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*, 148, 94-99.

- Atkinson, C.A., Jolley, D.F., Simpson, S.L., 2007. Effect of overlying water pH, dissolved oxygen, salinity and sediment disturbances on metal release and sequestration from metal contaminated marine sediments. *Chemosphere*, 69(9), 1428–1437.
- Atli, G., Canli M. 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 145:282-287.
- Avilez, I.M., Hori, T.S.F., Almeida, L.C., Hackbarth, A., Bastos Neto, J.C., Bastos, V.L.F.C., Moraes G., 2008. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). *Comparative Biochemistry and physiology Part C*, 148, 136-142.
- Barnabé, G. 1996. Bases biológicas y ecológicas de la Acuicultura. Edotirial Acribia, Zaragoza, pág 51.
- Bergayou, H., Mouneyrac, C., Pellerin, J., Moukrim, A. 2009. Oxidative stress responses in bivalves (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule*) from the Oued Souss estuary (Morocco). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), 765-769.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli. B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F. 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology*, 89, 257-266.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bücker, A., Carvalho, W., Alves-gomes, J.A. 2006. Avaliação de mutagenicidade and gentotoxicidade in *Eigenmannia vires* Cens (Teleostei: Gymnotiformes) exposed to benzene. *Acta Amazonica*. 36, 357–364.
- Burgera, J., Gochfeld, M. 2005. Heavy metals in commercial fish in New Jersey. *Environmental Research.*, 99(3), 403-412.
- Bury, N.R. Grossel, M., Wood, C.M., Hogstrand, C., Wilson, R.W., Rankin, J.C., Busk, M., Lecklin, T., Jensen, F.B. 2001. Intestinal iron uptake in the

- European flounder (*Platyctys flesus*). *The Journal of Experimental Biology*, 204, 3779-3787.
- Cajaraville, M.P., Bebiannob, M.J., Blascoc, J., Ported, C., Sarasquetc. C., Viarengoe, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, 247(2-3), 295-311.
- Canesi, L., Borghia, C., Ciaccib,C., Fabbria, R., Lorussob, C.L., Vergania, L., Marcominic, L. e Poianac, G. 2008. Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquatic Toxicology*, 87(4), 272-279.
- Carletti, E., Sulpizio, M., Bocciarelli, T., Boccio, P.D., Federici, L., Di Ilio, C. 2008. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. *Aquatic Toxicology*, 90, 48-57.
- Carvalho-Neta, R.N.F., Abreu-Silva, A.L. 2013. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes:Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(2), 217-225.
- Cavalcanti, A.D. 2003. Monitoring of trace elements in oysters marketed in Recife, Pernambuco, Brazil. *Cad. Saúde Pública* vol.19 no.5, Rio de Janeiro Sept./Oct.
- Choi, H.J., Ji, J., Chung, K.H., Ahn, I.Y. 2007. Cadmium bioaccumulation and detoxification in the gill and digestive gland of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comp Biochem Physiol Part C*, 145, 227-235.
- Christo, W. 2006. Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea sacco*, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná: Brasil): um subsídio ao cultivo. (Tese doutorado). Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 146 p.
- Coan, E.V., P.V. Scorr., F.R., Bernard. 2000. Bivalve seashells of Western North America. Santa Barbara Museum of Natural History, P. 9-40.
- Coimbra, A.G. 2003. Distribuição de metais pesados em moluscos e sedimentos nos manguezais de Coroa Grande e da Enseada das Garças, Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. Universidade Federal Fluminense. Dissertação de Mestrado em Geoquímica Ambiental, 72p.

- Conselho Nacional de Meio Ambiente [CONAMA] (2005, 18 de março). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Brasil. Ministério do Meio Ambiente *Diário Oficial da União*, Brasília, DF.
- Costa, R.C., Olivi, P. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7), 1820-1830.
- Fergusson, J.E. 1990. The heavy elements: chemistry environmental impact and health effects. Pergamon Press. 1º ed., v. 2, 614 p.
- Franco, G. Tabela de Composição Química dos Alimentos. 9. ed. São Paulo, Editora Atheneu, 1999. 307p.
- Freire, M.M., Santos, V.G., Ginuino, I.S.F., Arias, A.R.L. 2008. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasil* 12(3), 347-354.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* ., 681, 80–92.
- Garcia, M.A.A. 1999. O manganês e seus usos industriais. Campinas – São Paulo. Unicamp.
- Gomez-Mendikute, A., Elizondo, M., Venier, P., Cajaraville, M.P. 2005. Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro. *Cell and Tissue Research* .321, 131–140.
- Gonçalves, M.W., Carvalho, W.F., Pereira, R.R., Silva, D.M., Bastos, R.P., Cruz, A.D. 2014. Avaliação de danos genômicos em anfíbios anuros do cerrado goiano. *Estudos, Goiânia*, 41(especial), 89-104.
- Grazeffe, V., Tallarico, L.F, Pinheiro, A.S., Kawano, T., Suzuki, M.F., Okazaki, K., Pereira, C.A., Nakano, E. 2008. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 654(1), 58-63.
- Groot, A. J., Salomons, W. e Allersma, E. 1976. Processes Affecting Heavy Metals in Estuarine Sediments. In: J. D. Burton and P. S. Liss (ed.) *Estuarine Chemistry*. Academic Press. 131-153 p.
- Grotto, H.Z.W. 2008. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 30(5), 390-397.

- Gu, J., Li, Y., Xie, L., Zhang, R. 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.*, v. 144, p. 184–190
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakob, W.B. 1974. Glutathione s-Transferases. The first enzymatic in mercapturic acid formation. *The J. of Biol. Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Hogarth, P.J. 2007. *The Biology of Mangroves and Seagrasses*. Oxford Universit Press, Oxford, MA, USA.
- Honkoop, P.J.C., Bayne, B.L., Underwood, A.J., Svensson, S. 2003. Appropriate experimental design for transplanting mussels (*Mytilus* sp.) in analyses of environmental stress: an example in Sydney Harbour (Australia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 297, 253–268.
- Huber, P.C., Almeida, W.P. 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, 1170-1179.
- Ivanina, A.V., Habinck, E., Sokolova, I.M. 2008. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 148, 72-79.
- Kimbrough, K.L. 2008. An assessment of two decades of contaminant monitoring in the nation's coastal zone. Silver Spring, MD.: NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS. Disponível em: <<http://ccma.nos.noaa.gov/publications/MWTwoDecades>> Acesso em: 12 jun. 2016.
- Laodong, G., Santschi, P.H., Sammy, M.R. 2002. Metal partitioning between colloidal and dissolved phases and its relation with bioavailability to American oysters. *Marine Environmental Research*, 64, 54-49.
- Lee, R.F., Steinert, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544, 4364.
- Lekhi, P., Cassis, D., Pearce, C.M., Ebell, N., Maldonado, M.T., Orians, K.J. 2008. Role of dissolved and particulate cadmium in the accumulation of

- cadmium in cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Science of the Total Environment*. 393(2), 309–325.
- Levy J.L., Angel, B.M., Stauber, J.L., Poon, W.L., Simpson, S.L., Cheng, S.H., Jolley, D.F. 2008. Uptake and internalization of copper by three marine microalgae: Comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. *Aquatic Toxicology* 89, 82-93.
- Lima, I., Pedrozo, M. 2001. *Ecotoxicologia do Ferro e seus Compostos*. Disponível:<http://web.cena.usp.br/apostilas/Regina/PG/CEN%205738%20Ecotoxicologia/Ferro.pdf>[Consultado em 29/12/2016].
- Magalhães, D.D.P., Ferrão Filho, A.D.S., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Ecologia Brasiliensis*, 12, 355–381.
- Maniserry, M. 1995. Copper induced damage o the hepatopancreas of the penaeid shrimp *Metapenaeus dobsoni*- an ultra structural study. *Diseases of Aquatic Organisms Journal*. 22, 51–57.
- Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E., Giamberini, L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*. 56, 358-392.
- Martin, K., Huggins, T., King, C., Carroll, M.A., Catapane, E.J., 2008. The neurotoxic effects of manganese on the dopaminergic innervation of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica* *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 148, 152–159.
- Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C., Marin-Morales, M.A. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 148-158.
- Mendil, Durali, Uluozlu, Ozgur D. 2007. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chemistry*.102, 415–421.
- Monroy, M., Maceda-Veiga, A., Sostoa, A. 2014. Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. *Science of the Total Environment*, 487, 233–244.

- Moura, A.C., Assumpção, R.A.B., Bischoff, J. 2009. Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006. *Arquivo do Instituto Biologia*, 76(1),17-22.
- Nascimento V.A., Mittaraquis A.S.P., Travália B.M., Santos R.C.A., Nunes M.L., Aquino L.C.L. 2011. Qualidade Microbiológica de Moluscos Bivalves – Sururu e Ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada, *Scientia Plena*, 7, 4.
- Ng, J.S.S., Lui, K.K.Y., Lai, C.-H., Leung, K.M.Y., 2007. *Harpisquilla harpax* (Crustacea, Stomatopoda) as a biomonitor of trace metal contamination in benthic sediments in Hong Kong waters. *Marine Pollution Bulletin*. 54, 1523–1529.
- NRC – National Research Council, 1987. Biological Markers in Environmental Health Research. *Environmental Health Perspectives*, 74, 3–9.
- Nusetti, O., Esclapes, M., Salazar, G., Nusetti, S. and Pulido, S. 2001. Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short-term copper exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66, 576-581.
- Olivier, F., Ridd, M., Klumpp, D. 2002. The use of transplanted cultured tropical oysters (*Saccostrea commercialis*) to monitor Cd levels in North Queensland coastal waters (Australia). *Marine Pollution Bulletin*, 44, 1051-1062.
- Pandrangi, R.; Petras, M.; Ralph, S.; Vrzoc, M. 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis.*, 26, 345–356.
- Pedrosa, L.F.C.; Cozzolino, S.M.F. 2001. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da Cidade de Natal/RN. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(2), 154-157.
- Pereira, A.A., Hattum, B. Van, Brouwer, A., Bodegom, P.M. Van. 2008. Effects of iron-ore mining and processing on metal bioavailability in a tropical coastal lagoon. *Journal of Soils and Sediments.*, 239–252.
- Pisoni, M., Cogotzi, L., Frigeri, A., Corsi, I., Bonacci, S., Iacocca, A., Lancini, L., Mastrototaro, F., Focardi, S., Svelto, M., 2004. DNA adducts, benzo[a]pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane

- stability in *Mytilus galloprovincialis* from different áreas in Taranto coastal waters (Italy). *Environmental Research.*, 96, 163–175.
- Polidoro, B.A., Carpenter, K.E., Collins, L., Duke, N.C., Ellison, A.M. 2010. The loss of species: mangroves extinction risk and geographic areas of global concern. *PLoS ONE* 5, e10095. doi:10.1371/journal.pone.0010095.
- Potasman, I., Paz, A., Odeh, M. 2002. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases*, 35(8), 921-928.
- Rank, J., Jensen, K. 2003. Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, 54, 323-329.
- Rank, J., 2009. Intersex in *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, 72, 1271–1277. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.12.008.
- Rebelo, M.F., Amaral, M.C.R., Pfeiffer, W.C. 2005. Oyster condition index in *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) from a heavy-metal polluted coastal lagoon. *Brazilian Journal of Biology.* 65(2), 345-351.
- Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E. 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic Toxicology*, 40, 375-392.
- Reis, É.L., Faria, G.L., Araújo, F.G.D.S., Faria, G.L., Tenório, J.A.L., Vieira, C.B., Júnior, N.J. 2010. "Characterization of a Brazilian Manganese Ore Typology", *Revista Escola de Minas*, 63(3), 517-521.
- Rios, E.C. 1994. *Seashells of Brazil*. Rio Grande, RS, Ed. Fundação Universidade Rio Grande. 368 p.
- Rocha, R.A., Afonso, J.C. 2012. Manganês. *Química Nova Escola*, 34(2), 103–105.
- Rönnbäck, P., 1999. The ecological basis for economic value of seafood production supported by mangrove ecosystems. *Ecological Economics* 29, 235-252.
- Salami, I.R.S, Rahmawati, S., Sutarto, R.I.H., Jaya, P.M. 2008. Accumulation of Heavy Metals in Freshwater Fish in Cage Aquaculture at Cirata Reservoir, West Java, Indonesia. *Anna NY Acad Sci*. Blackwell Publishing, 1140(1), 290-296(7).

- Salvador, G.A., Uranga, R.M., Giusto, N.M. 2011. Iron and Mechanisms of Neurotoxicity. *International Journal of Alzheimer's Disease*, p 1- 9.
- Shi, B., Allen, H.E., Grassi, M.T., Huizhong. 1998. M. Modeling copper partitioning in surface waters. *Water Research*, 32, 3756-3764.
- Souza, E. M. Avaliação da contaminação por metais pesados (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, e Zn) nos manguezais dos rios Aribiri, Bubu e Santa Maria da Vitória Grande Vitória/ES - utilizando *Crassostrea rhizophorae* (Guildins, 1928) e *Mytella guyanensis* (Lamark, 1812) como biomonitores. 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Programa de pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 2002. p. 105.
- Spacie, A.; Mccarty, L.S., Rand, G.M. 1995. Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems. In. Rand, G.M. (ed.) *Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. 2ed. Taylor & Francis Washington, DC, USA., p.493-521.
- Speit G., Rothfuss A. 2012. The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair, *DNA Repair Protocols, Methods in Molecular Biology*, 920, 79-89.
- Szefer, P.S.W., Fowler, K.I., Ikuta, F.P., Osuna, A.A., Fali, B.S., Kim, H., Fernandez, M., Belzunce, B., Guterstam, H., Kunzendorf, M., Wolowicz, H., Hummel, Deslous
- Paoli, M., 2006. A comparative assessment of heavy metal accumulation in soft parts and byssus of mussels from sub arctic, temperate, subtropical and tropical marine environments. *Environmental Pollution*. 139, 70–78.
- Torres, M.A., Testa, C.P., Gáspari, C., Musutti, M.B., Panitz, C.M.N., Pedrosa, R.C., Almeida, E.A., Mascio, P.D. 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 923-932.
- Tulli, L.M.A. 2007. Vulnerabilidade à ação antrópica e uso e ocupação do solo para a Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão, Vitória-ES. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de pós-graduação em engenharia ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 106 p.

- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 178-189.
- Valko, M., Morris, H., M.T.D. 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12, 1161-1208.
- Vannucchi, H., Moreira, E.A.M., Bernardes, M.M. 1998. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e na defesa antioxidante. *Medicina (Ribeirão Preto)* 31, 31-44.
- Vega López, A., 2015. Biomarkers involved in energy metabolism and oxidative stress response in the liver of *Goodea gracilis* Hubbs and Turner, 1939 exposed to the micro cyst in producing *Microcystis saeruginosa* LB85 strain. *Environmental Toxicology* 30(10), 1113–1124.
- Vernier, P. 2001. DNA adducts detection in mussels exposed to bulky aromatic compounds in laboratory and field conditions. *Environmental Research*. 96, 163–175.
- Vieira, R.H.S.F., Morelli, A.M.F., Reis, C.M.F., Rodrigues, D.P., Fonteles Filho, A.A. 2003. Indicadores de contaminação fecal para ostra do mangue (*Crassostrea rhizophorae*) comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. *Higiene Alimentar, São Paulo*, 17(113), 81-88.
- Wheaton, F. 2007. Review of the properties of Eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Part I- Physical properties. *Aquacultural Engineering*, 37, 3–13.
- Yeung, J.W.Y., Zhou, G.-J., Leung, K.M.Y. 2016. Sub-lethal effects of cadmium and copper on RNA/DNA ratio and energy reserves in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 132, 59–67.
- Zanette, J., Medeiros, I.D., Siebert, M.M., Mattos, J.J, Luchmann, K.H., Melo, C.M.R. e Bainy, A.C.D. 2008. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. *Marine Environmental Research*, 66(1), 196-198.
- Zanette, J., Monserrat, J.M., Bianchini, A. 2006. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian

estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 143(2), 187-195.

Zimmermann, C.M., Guimarães, O.M., Peralta-Zamora, P.G. 2008. Avaliação da qualidade do corpo hídrico do rio Tibagi na região de Ponta Grossa utilizando análise de componentes principais (PCA). *Química Nova*, 31(7), 1727-1732.