

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
BACHARELADO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO MAR

ANA JULYA LUNA ANDRADE DE OLIVEIRA

ALTERAÇÕES DE CONCHA NO GASTRÓPODE *STRAMONITA BRASILIENSIS*
COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO EM ZONAS
COSTEIRAS

SANTOS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
BACHARELADO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO MAR

ANA JULYA LUNA ANDRADE DE OLIVEIRA

ALTERAÇÕES DE CONCHA NO GASTRÓPODE *STRAMONITA BRASILIENSIS*
COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO EM ZONAS
COSTEIRAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto do Mar como parte do processo avaliativo
para a obtenção do título de Bacharel em Ciência e
Tecnologia do Mar.

Orientador: Ítalo Braga de Castro

SANTOS

2021

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48a Luna Andrade de Oliveira , Ana Julya .
Alterações de concha no gastrópode stramonita
brasiliensis como possíveis biomarcadores de
contaminação em zonas costeiras.. / Ana Julya Luna
Andrade de Oliveira ; Orientador Ítalo Braga de
Castro; Coorientador . -- Santos, 2021.
36 p. ; 30cm

TCC (Graduação - Bacharelado Interdisciplinar em
Ciências e Tecnologia do Mar) -- Instituto do Mar,
Universidade Federal de São Paulo, 2021.

1. Molusco. 2. Gastrópode. 3. Stramonita
brasiliensis. 4. Biomarcadores. 5. Contaminação. I.
Castro, Ítalo Braga de , Orient. II. Título.

CDD 551.46

Aos meus pais, por todo amor,
dedicação e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me sustentado até aqui e me dado forças para nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço a minha mãe, por sempre ser minha maior encorajadora durante o período da graduação, pois sem o amor e a dedicação dela, não teria chegado nesta etapa decisiva e gratificante da minha vida acadêmica. Assim como todas as minhas realizações não seriam exequíveis sem o apoio dela.

Agradeço ao meu pai, por ser uma pessoa presente e incentivadora, por me dar a oportunidade de morar próximo à faculdade e garantir que minha jornada na vida acadêmica fosse facilitada. Além de que minhas conquistas foram possíveis graças aos ensinamentos dele.

Agradeço aos meus irmãos por sempre acreditarem no meu potencial e torcerem pelo meu sucesso.

Agradeço ao meu querido orientador Dr. Ítalo Braga de Castro, por todos os ensinamentos, que com certeza me permitiram crescer e amadurecer durante o período da graduação. Agradeço pela paciência e dedicação exercida durante todo o período de desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso. Sem ele não teria concluído essa etapa tão importante na minha vida.

Agradeço a minha coorientadora Dra. Cyntia Ayumi Yokota Harayashiki por me ajudar em todas as etapas do trabalho, desde as análises das amostras, interpretação dos resultados, ajuda com a escrita e até os tombos das coletas de campo. Ela com certeza foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho e meu crescimento acadêmico.

Agradeço ao meu namorado Renan Yukio por todo o amor, carinho e dedicação que tem por mim. Assim como também, por nunca ter me deixado desistir dos meus objetivos e sempre ter me apoiado em todos os momentos, tornando a minha jornada muito mais leve.

Agradeço aos meus amigos, Alice, Beatriz, Giovanna e Henrique por sempre estarem ao meu lado me apoiando, incentivando e tornando meus dias em Santos

melhores.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, em especial a Nayara Gouveia, por se tornar uma grande amiga e estar sempre disponível para me auxiliar, principalmente durante essa etapa final de execução do trabalho.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida (Processo FAPESP nº 2019/23310-1) que possibilitou a dedicação integral ao trabalho.

RESUMO

Moluscos são tradicionalmente usados no biomonitoramento de ambientes aquáticos devido à sua abundância, sedentarismo, facilidade de amostragem, alta sensibilidade aos efeitos dos compostos químicos perigosos e por possuírem a capacidade de armazenar em sua concha, o histórico das alterações ambientais ocorridas em seu habitat. O gastrópode marinho *Stramonita brasiliensis* é um predador ativo que habita zona entremarés em costões rochosos, sendo amplamente distribuído no litoral brasileiro com potencial para se tornar uma promissora ferramenta de avaliação da qualidade ambiental em zonas costeiras. Portanto, o presente estudo verificou alterações biométricas, morfológicas e de resistência das conchas, além de alterações bioquímicas (nas atividades das enzimas anidrase carbônica, Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase) no manto de *S. brasiliensis* ao longo de um gradiente de contaminação presente no Estuário de Santos. Para o procedimento das análises, foram coletados 120 organismos de *S. brasiliensis* ao longo do gradiente de contaminação que percorre desde a Balsa de Santos, local que representa a maior contaminação, seguido da Praia do Góes e, finalmente, o local de menor contaminação, Ilha das Palmas. Os resultados mostraram alterações biométrica e morfométricas consistentes com níveis de contaminação ambiental observados ao longo do gradiente de contaminação no Sistema Estuarino de Santos. Dessa forma, as *S. brasiliensis* oriundas das áreas contaminadas, apresentaram concha mais delgadas e com abertura menor que os organismos da região de menor contaminação. Analogamente, a resistência a compressão foi menor nos organismos obtidos em zonas mais contaminadas e aumentou proporcionalmente nas áreas limpas. Porém, as atividades das enzimas Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase não apresentaram alterações ao longo dos pontos de amostragem. Similarmente, a atividade específica da anidrase carbônica não foi consistente ao gradiente de contaminação. Esses resultados demonstram que embora, alterações morfométricas e estruturais relacionadas a contaminação estejam presentes nas conchas de *S. brasiliensis*, as enzimas estudadas não sofreram alterações. Dessa forma, esse conjunto de achados sugerem que os parâmetros morfométricos e estruturais para as conchas de *Stramonita brasiliensis* podem vir a ser utilizados como biomarcadores da contaminação em zonas costeiras, devido a sua simplicidade e baixo custo.

Palavras-chave: Molusco, Gastrópode, *Stramonita brasiliensis*, Biomarcadores.

ABSTRACT

Mollusks are traditionally used in monitoring studies of aquatic environments due to their abundance, sedentary lifestyle, easy sampling, high sensitivity to the effects of hazardous chemicals they have the ability to store in their shells, the history of environmental changes occurred in their habitat. The marine gastropod *Stramonita brasiliensis* is an active predator inhabiting intertidal zones on rocky shores, being widely distributed on the Brazilian coast with potential to become a promising tool for assessing environmental quality in coastal areas. Therefore, the present study verified biometric and morphological and shell strength changes, as well as biochemical changes (in the activities of carbonic anhydrase, Ca²⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase enzymes) in the mantle of *S. brasiliensis* along a contamination gradient present in the Santos Estuary. For the analysis procedure, 120 *S. brasiliensis* organisms were collected along the contamination gradient including the Balsa de Santos (the more contaminated site), followed by Praia do Góes and, finally, the site under least contamination rates, Palmas Island. The results showed biometric, morphometric changes consistent with environmental contamination levels observed along the contamination gradient in the Estuarine System of Santos. Thus, *S. brasiliensis* from the contaminated areas presented a thinner shell with a smaller opening than the organisms from the less contaminated region. Similarly, the compressive strength was lower in organisms obtained in more contaminated areas and increased proportionally in the clean site (Palmas). However, the activities of the enzymes Ca²⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase did not show changes along the sampling points. Similarly, the specific activity of carbonic anhydrase was not consistent with the contamination gradient. These results demonstrate that although, morphometric and structural changes related to contamination are present in shells of *S. brasiliensis*, the enzymes studied were not affected. Thus, this set of findings suggests that the morphometric and structural parameters for *Stramonita brasiliensis* shells may be used as biomarkers of contamination in coastal areas, due to their simplicity and low cost.

Keywords: Mollusk, Gastropod, *Stramonita brasiliensis*, Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sistema Estuarino de Santos (SES) localizado no Estado de São Paulo. Pontos indicam os pontos amostrais e a coloração o grau de contaminação. Vermelho = maior contaminação → S1 (Balsa). Amarelo = contaminação intermediária → S2 (Góes). Verde = menor contaminação → S3 (Palmas).....15
- Figura 2: Visão ventral de concha de *Stramonita brasiliensis* com landmarks (pontos vermelhos) definidos.....16
- Figura 3: Regressão linear entre atividade enzimática no manto e altura da concha de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.....19
- Figura 4: Médias e desvios padrões do (A) comprimento, (B) largura e (C) profundidade das conchas de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.....21
- Figura 5: A) Análise dos componentes principais e B) análise de variáveis canônicas das conchas de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.....23
- Figura 6: Médias e desvios padrões da força de compressão exercida sobre as conchas de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.....25
- Figura 7: Médias e desvios padrões das atividades da enzima anidrase carbônica em tecidos de manto de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.....27
- Figura 8: Médias e desvios padrões das atividades da enzima Ca^{2+} -ATPase (A) e Mg^{2+} -ATPase (B) em tecidos de manto de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.....28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. "Eigenvalues" e variância explicada de cada uma das 16 componentes.....	22
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Área de estudo e amostragem	16
3.2. Análises biométricas e morfométricas.....	17
3.3. Análise de compressão	18
3.4. Análises bioquímicas	18
3.4.1. Preparo do homogeneizado.....	18
3.4.2. Anidrase carbônica	18
3.4.3. Ca ²⁺ -ATPase e Mg ²⁺ -ATPase.....	19
3.5. Análise estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Análises biométricas e morfométricas.....	21
4.2. Análise de compressão.....	26
4.3. Análises bioquímicas	27
4.3.1. Anidrase carbônica	27
4.3.2. Ca ²⁺ -ATPase e Mg ²⁺ -ATPase.....	29
5. CONCLUSÃO	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

Atividades antrópicas tem se tornado cada vez mais intensas ao longo dos últimos anos. Muitas dessas atividades contribuem com descargas de resíduos perigosos oriundos de fontes industriais, domésticas, agrícolas e portuárias (Aly et al., 2013). Adicionalmente, em função do aumento populacional em regiões costeiras ao redor do mundo nas últimas décadas, os fluxos turísticos e a exploração de recursos naturais cresceram também vertiginosamente (Aly et al., 2013; OSPAR, 2009). Apesar de necessárias, tais atividades podem gerar pressões ambientais que incluem: perda de habitats, introdução de espécies invasoras, sobre exploração de recursos, mudanças climáticas e poluição (Borja et al., 2016; Crain et al., 2008). Desta forma, o aumento das pressões sobre ambientes naturais tem intensificado a frequência e a magnitude das perturbações, principalmente sobre as zonas costeiras afetando as interações biológicas e a competição por recursos e habitats (Nõgoes et al., 2016).

Nesse aspecto, avaliações da qualidade ambiental são frequentemente necessárias para estimar os impactos antrópicos sobre ambientes naturais e orientar a gestão e as políticas públicas para conservação dessas áreas. Para isso, mensuração de níveis e efeitos da contaminação tem sido realizadas através de determinações analíticas de alta complexidade as quais, muitas vezes, não podem ser empregadas a baixos custos. Portanto, o uso de organismos indicadores através da avaliação de respostas biológicas tem despontado como alternativas eficientes e baratas para estimar os impactos da poluição em áreas submetidas a contaminação (Begliomini et al., 2017; Harayashiki et al. 2020; Harayashiki et al. 2021; Laitano et al., 2013; Marquez et al., 2011; Marquez et al., 2017; Nuñez et al., 2012; Oliveira et al., 2020). Vários grupos de organismos foram historicamente empregados para essa finalidade, permitindo estimativas relativamente precisas e de mais fácil execução.

Moluscos são tradicionalmente usados como bioindicadores devido à sua abundância, sedentarismo, facilidade de amostragem e alta capacidade de bioacumular contaminantes (Laitano et al., 2013). Estes organismos apresentam uma estrutura rígida (concha) cujas funções incluem a sustentação do tecido mole e a proteção contra predação e dessecação (Marin et al., 2012). Sabe-se também que

as conchas apresentam o registro de vida dos moluscos, incluindo informações sobre alterações ambientais que ocorreram durante a vida dos mesmos e que são observadas através de mudanças estruturais, morfológicas e químicas dessas estruturas (Nunez et al., 2012). Estudos com gastrópodes (Begliomini et al., 2017; Harayashiki et al. 2020; Harayashiki et al. 2021; Laitano et al., 2013; Marquez et al., 2011; Marquez et al., 2017; Nuñez et al., 2012; Oliveira et al., 2020) e bivalves (Alzieu, 2000; Alzieu et al. 1986) expostos a substâncias perigosas em condições laboratório ou ao longo de gradientes de contaminação evidenciaram alterações químicas e morfológicas das conchas. Além disso, o estudo conduzido por Oliveira et al. (2020) mostrou alterações na resistência a compressão e na composição protéica de conchas do gastrópode herbívoro *Lottia subrugosa* que foram consistentes com os níveis de contaminação química local. Portanto, o conjunto de evidências produzidos até o momento demonstram que estas estruturas podem ser utilizadas como ferramentas em estudos de monitoramento ambiental.

Entre os esforços realizados nesse sentido, estudos envolvendo diferentes espécies de gastrópodes ao longo do litoral sul-americano mostraram que as conchas destes organismos apresentam alterações na sua composição e morfologia (Begliomini et al., 2017; Harayashiki et al. 2020; Harayashiki et al. 2021; Laitano et al., 2013; Marquez et al., 2011; Marquez et al., 2017; Nuñez et al., 2012; Oliveira et al., 2020). Particularmente, aos estudos realizados no litoral brasileiro, as alterações de concha de *L. subrugosa* observadas ao longo de gradientes de contaminação foram relacionadas com respostas de biomarcadores tradicionais como a peroxidação lipídica e danos no DNA (Begliomini et al., 2017, Gouveia et al., 2019). Desta forma, alterações morfológicas nas conchas de moluscos têm sido sugeridas como uma possibilidade viável frente a alguns métodos caros de avaliação de contaminação atualmente usados (Begliomini et al., 2017; Gouveia et al. 2019). Entretanto, antes que essa ferramenta possa ser universalmente utilizada, deve ser validada pelo emprego em diferentes espécies, localidades e condições ambientais.

Adicionalmente, considerando que as conchas são compostas principalmente por carbonato de cálcio e que estes íons precisam ser transportados do meio externo até o espaço extrapalial (compartimento entre o manto e a concha) é necessário que enzimas catalisem esse transporte para que ocorra o processo de biomineralização (Marin et al., 2012). As enzimas anidrase carbônica, Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase exercem esse papel importante no metabolismo dos moluscos

(Erulkar 1981; Nozadze et al., 2015; Zebral et al. 2019). A Ca^{2+} -ATPase e a Mg^{2+} -ATPase regulam a concentração de íons cálcio e magnésio, respectivamente, através das membranas biológicas (Lionetto et al., 2016; Supuran, 2008, 2016; Zebral et al., 2019). A anidrase carbônica é uma metaloenzima onipresente em todos os organismos vivos (Lionetto et al., 2012), é responsável por catalisar a hidratação reversível do dióxido de carbono em bicarbonato, além de participar do controle do pH e do processo de calcificação da concha (Lionetto et al., 2012; Supuran 2008; Harayashiki et al. 2020 Harayashiki et al. 2021; Zebral et al. 2019). Desta forma, as alterações de concha observadas em organismos que habitam áreas contaminadas podem ser resultantes dos efeitos destas substâncias sobre a atividade destas enzimas. Portanto, investigações referentes às alterações das atividades da anidrase carbônica, Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase devido à ação de contaminantes são importantes para o melhor entendimento de como estas substâncias podem afetar a produção/regeneração das conchas de moluscos.

Comparados a herbívoros, organismos carnívoros são susceptíveis a uma maior acumulação de contaminantes devido ao processo de biomagnificação, por esse motivo, moluscos carnívoros costumam apresentar melhor performance quando empregados como bioindicadores da qualidade ambiental (Goessler, et al., 1997; Maher e Butler, 1988). O gastrópode marinho *Stramonita brasiliensis* é um predador ativo que habita zona entre marés em costões rochosos entre a Colômbia e o Uruguai (Claremont et al., 2011; Veiga et al., 2015) sendo amplamente distribuído no litoral brasileiro. Essa espécie tem sido amplamente utilizada para monitorar a contaminação costeira por tributílo-estanho (um biocida anti-incrustante utilizado em pinturas de embarcações) através da manifestação do imposex (surgimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de gastrópodes) (Castro et al., 2012a e Rossato et al., 2018). Sendo assim, *S. brasiliensis* tem sido reconhecida como uma espécie altamente sensível a contaminação química (Castro et al., 2012b) de zonas costeiras e, conseqüentemente, empregada em um grande número de estudos ecotoxicológicos (Castro et al., 2012c). Apesar disso, nenhum estudo relacionou alterações nas conchas desse gastrópode Muricídeo a níveis de contaminação ambiental até o momento.

2. OBJETIVOS

Considerando o exposto, o presente estudo teve por objetivo verificar as alterações biométricas, morfológicas e de resistência das conchas, além de alterações bioquímicas (anidrase carbônica, Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase) no manto de *S. brasiliensis* ao longo de um gradiente de contaminação conhecido em Santos. Portanto, essa iniciativa visou fornecer evidências do potencial de utilização das alterações de conchas como biomarcadores de contaminação ambiental para zonas costeiras.

Os objetivos específicos incluíram:

- a. Avaliar variações do formato das conchas de *S. brasiliensis* dentro de um gradiente de contaminação conhecido no Sistema Estuarino de Santos;
- b. Avaliar se a resistência das conchas de *S. brasiliensis* é comprometida ao longo do gradiente de contaminação.
- c. Avaliar alterações nas atividades enzimáticas (anidrase carbônica, Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase) no manto de *S. brasiliensis* amostradas ao longo do gradiente de contaminação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo e amostragem

O presente estudo foi realizado dentro de um gradiente de contaminação e toxicidade previamente estabelecido (Begliomini et al., 2018, Pusceddu et al., 2019, Buruaem et al, 2013) ao longo do canal de acesso ao terminal portuário de Santos (Figura 1). Mais especificamente, S1 (Balsa) representa o local de maior contaminação, seguido por S2, intermediário (Góes) e, finalmente, o local de menor contaminação, S3 (Palmas).

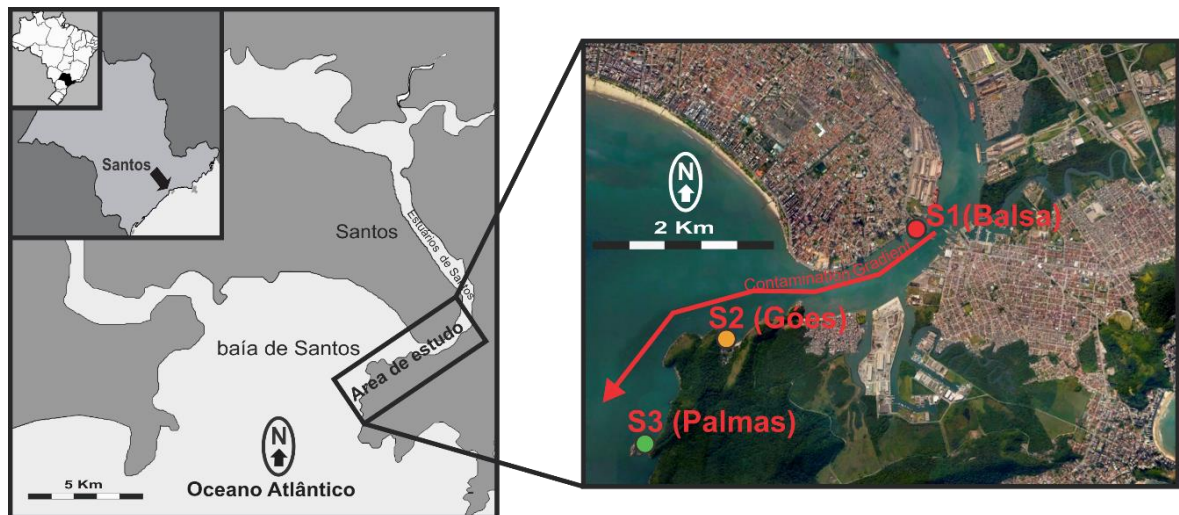


Figura 1. Sistema Estuarino de Santos (SES) localizado no Estado de São Paulo. Pontos indicam os pontos amostrais e a coloração o grau de contaminação. Vermelho = maior contaminação → S1 (Balsa). Amarelo = contaminação intermediária → S2 (Góes). Verde = menor contaminação → S3 (Palmas).

Organismos adultos (>20 mm) da espécie *S. brasiliensis* (n = 40) foram coletados manualmente em cada um dos pontos amostrais (Figura 1) durante o mês de setembro de 2019. Após a amostragem, os animais foram acondicionados em sacolas plásticas, transportados até o laboratório da Universidade Federal de São Paulo e armazenados à -80 °C por, pelo menos, 1 hora. Posteriormente, os moluscos foram parcialmente descongelados para a retirada de amostras do manto, com auxílio de um bisturi (n = 15 por ponto amostral), as quais foram armazenadas novamente à -80 °C até a realização das análises bioquímicas.

As conchas de todos os organismos coletados foram individualmente

identificadas e efetuou-se a remoção dos tecidos moles por fervura em água à 100°C. As conchas livres dos tecidos moles foram então lavadas com água e solução de hipoclorito de sódio (5%) e secas no sol. Após essa etapa, as amostras foram submetidas a avaliações biométricas, morfométricas e compressão conforme descrito a seguir.

3.2. Análises biométricas e morfométricas

Parâmetros biométricos (altura, comprimento, largura e peso) das conchas foram medidos com um paquímetro digital (± 0.01 mm) e balança de precisão (± 0.0001 g). Para as análises morfométricas, o método descrito por Primost et al. (2016) foi utilizado. Para cada uma das conchas, foram obtidas fotos com a abertura da concha voltada pra cima usando uma câmera digital (Canon T6i; lente 50 mm). Para reduzir os efeitos de rotação (movimento na direção ventro-dorsal ao longo do eixo transversal da concha), translação (movimento na direção anteroposterior ao longo do eixo transversal da concha) e escala nas imagens, as conchas foram fixadas sobre uma massa de modelar. Posteriormente as imagens foram tratadas no *software* tpsDig para adição de 10 *landmarks*, conforme indicado na Figura 2.

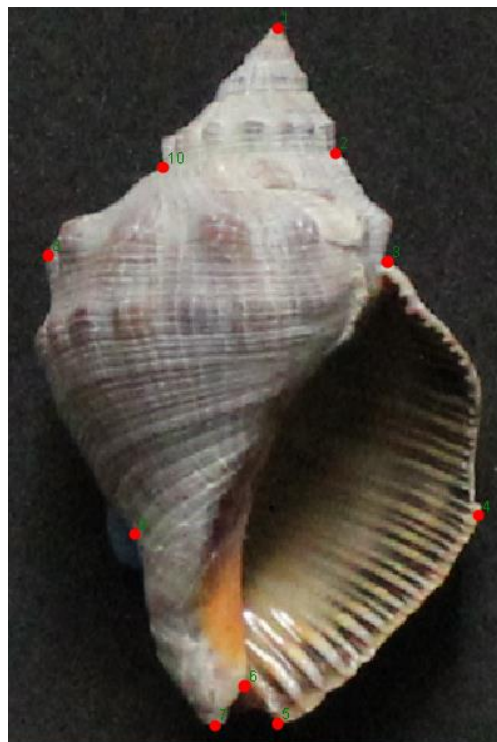


Figura 2: Visão ventral de concha de *Stramonita brasiliensis* com *landmarks* (pontos vermelhos).

Após essa etapa, os possíveis efeitos de rotação, translação e escala foram eliminados com a análise de Procrustes no *software* TPS Relw, cujas coordenadas alinhadas de Procrustes geradas foram utilizadas no *software* MorphoJ para as análises estatísticas multivariadas.

3.3. Análise de compressão

Quinze conchas de cada ponto amostral (as mesmas utilizadas nas análises bioquímicas), foram submetidas a um ensaio de compressão para quantificar a sua resistência a forças mecânicas. O teste foi realizado na Máquina Universal de Ensaio EMIC linha DL, na função compressão, com uma taxa de avanço definida de 1 mm minuto⁻¹ e faixa de medição entre 22 e 1501 N. Submeteu-se cada concha ao ensaio individualmente e a força máxima de resistência foi obtida pela análise dos resultados gerados no *software* TESC SCRIPT. Foram considerados para essa análise o ponto inicial de ruptura. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Ensaio Mecânicos, da Universidade Santa Cecília.

3.4. Análises bioquímicas

3.4.1. Preparo do homogeneizado

As amostras de manto foram individualmente homogeneizadas com tampão HEPES (pH 7.4), contendo 10 mM de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (HEPES), 250 mM de sacarose, 1mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e 1 mM de *fenil-metil-sulfonil-fluoreto* (PMSF). As amostras foram pesadas em uma balança de precisão (0,0001 g) e homogeneizadas com um disruptor de célula ultrassônica à 30 kHz (2 × 20 s) em solução 10% (m/V) em 10mM HEPES (pH 7,4). Os homogeneizados foram centrifugados à 12000 g (20 min, 4 °C), os sobrenadantes foram aliquoteados em microtubos e armazenado, à -80 °C, para análise posterior das atividades enzimáticas. A quantificação da proteína para a normalização dos resultados enzimáticos foi determinada com o reagente usado por Bradford (1979).

3.4.2. Anidrase carbônica

A determinação da atividade da anidrase carbônica foi realizada de acordo com Vitale et al. (1999). Foi preparado um meio de reação (pH 7,4) contendo 10 mM de Tris-base, 10 mM de fosfato de sódio monobásico monohidratado, 75 mM de sacarose e 225 mM de manitol. A análise constituiu-se de misturar o tampão HEPES (como branco; 50 μ L) ou as amostras (50 μ L) com o meio de reação (7,5 ml) e 1 ml de água destilada enriquecida com CO₂ à 2,5 °C. Com um pHmetro de bancada (SP2000, Sensoglass), foi feita a leitura do decaimento do pH devido a liberação de H⁺ durante a catálise da reação $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ promovida pela anidrase carbônica, a cada 4s durante 20s, resultando em 5 leituras. Os brancos foram medidos no início e no final da análise, e após 10 leituras de amostra consecutivas. A atividade da anidrase carbônica (AAC) foi calculada como $\text{AAC} = [\text{TC} / (\text{TNC} - 1) / \text{mg de proteína total}]$, onde TC é a taxa da reação catalisada pela enzima no tecido homogeneizado, TNC é a taxa média da reação não catalisada. AAC foi expressa como atividade específica / mg de proteína.

3.4.3. Ca²⁺-ATPase e Mg²⁺-ATPase

As atividades das Ca²⁺-ATPase e da Mg²⁺-ATPase foram determinadas usando a metodologia descrita por Jorge et al. (2013). O meio de reação da Ca²⁺-ATPase consistiu em 5 mM de CaCl₂, 5 mM de MgCl₂, 189 mM de NaCl, 20 mM de Tris-base, 2 mM ouabaína e 3 mM de ATP; já o meio de reação da Mg²⁺-ATPase conteve 5 mM de MgCl₂, 14 mM de KCl, 189 NaCl, 0,2 mM de EDTA, 20 mM de Tris-base, 2 mM ouabaína e 3 mM de ATP. As amostras homogeneizadas foram misturadas com seu respectivo meio de reação, incubada por 30 minutos a 30°C e em seguida resfriada no gelo por 10 minutos. As atividades da Ca²⁺-ATPase e da Mg²⁺-ATPase foram determinadas por espectrofotometria (620 nm), através da liberação de fosfato (Pi) liberado durante a incubação, sendo proporcional ao conteúdo de fosfato inorgânico com a atividade enzimática que reage com a solução de cor (10% de ácido ascórbico e 0,42% de molibdato de amônio em 0,5 mM de H₂SO₄) (Santini et al., 2011; Vijaavel et al., 2007).

Todas as análises bioquímicas foram realizadas nas dependências da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com o apoio do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA).

3.5. Análise estatística

Durante a amostragem, apenas o tamanho mínimo das conchas dos organismos (>20 mm de altura) foi selecionado. Desta forma, o tamanho dos organismos, além da contaminação, poderia estar influenciando a atividade enzimática. Para verificar esta influência, uma regressão linear entre a atividade enzimática e a altura da concha (maior dimensão) foi realizada. Os resultados dessa análise preliminar (Figura 3) indicaram que apenas a atividade da anidrase carbônica está relacionada ao tamanho do molusco. Portanto, a comparação da atividade da anidrase carbônica entre os diferentes pontos amostrais foi realizado através da análise de covariância (ANCOVA), utilizando a altura das conchas como co-fator, com o teste *a posteriori* de Bonferroni.

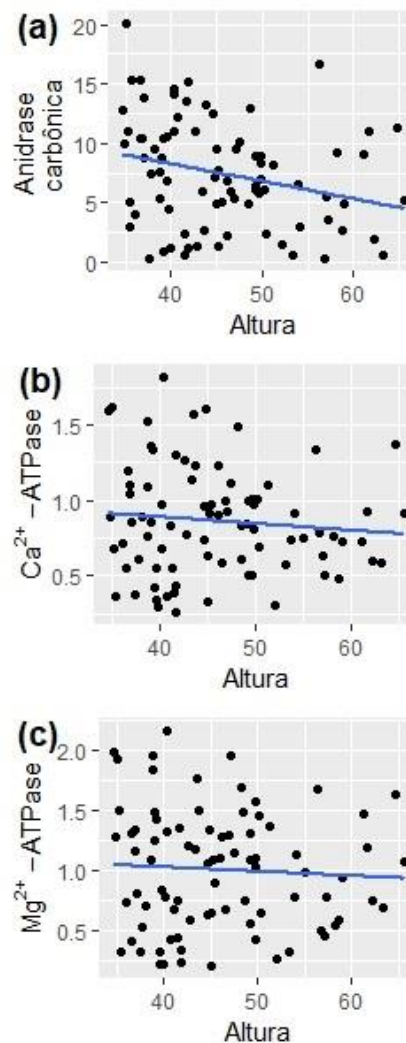


Figura 3: Regressão linear entre atividade enzimática no manto e altura da concha de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.

Para os demais dados de enzimas (Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase), biometria e compressão mecânica, a normalidade e homoscedasticidade foram verificadas através de testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Quando esses pressupostos foram atendidos, as comparações foram realizadas por Análise de Variância (ANOVA) e teste *a posteriori* de Dunnet. Nas situações em que os dados não atenderam as exigências do ANOVA foram realizadas análises não paramétricas de Kruskal-Wallis com teste *a posteriori* de Dunnet.

As análises estatísticas para a morfometria das conchas foram realizadas no software MorphoJ. Os efeitos de alometria (relação da dependência entre forma e tamanho) foram verificados através da regressão multivariada (Klingenberg, 2011). A análise dos componentes principais (PCA) foi realizado para a determinação das alterações do formato das conchas, enquanto a análise de variáveis canônicas (CVA), baseada na distância de Mahalanobis (Primost et al., 2016), foi realizada para a verificação da diferença entre os pontos amostrais. Todos os testes estatísticos usaram o nível de significância de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises biométricas e morfométricas

As três dimensões medidas (comprimento, largura e profundidade) apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os pontos de amostragem (Figura 4). De forma geral os organismos obtidos na Praia do Góes tiveram tamanhos maiores que animais obtidos na Balsa e na Ilha das Palmas. Considerando todas as localidades comprimento das conchas foi positivamente correlacionado com largura (Spearman, $p < 0.05$ e $r = 0,92$) e altura (Spearman, $p < 0.05$ e $r = 0,89$). Tais correlações indicam a existência de efeito alométrico entre as amostras analisadas. Estudos realizados avaliando alterações nas conchas de moluscos como possíveis biomarcadores de contaminação marinha frequentemente podem ter os resultados enviesados como resultado de alterações alométricas. Entretanto, nas análises empregando morfometria geométrica esse efeito costuma ser matematicamente removido (Begliomini et al., 2017; Gouveia et al., 2019; Márquez et al., 2017a, 2011; Primost et al., 2016). Esse tipo de abordagem tem sido empregada com sucesso em estudos que avaliaram variações na forma e estrutura

de conchas de moluscos ao longo de gradientes de contaminação tanto na Argentina como no Brasil (Idaszkin et al., 2019; Harayashiki et al., 2021).

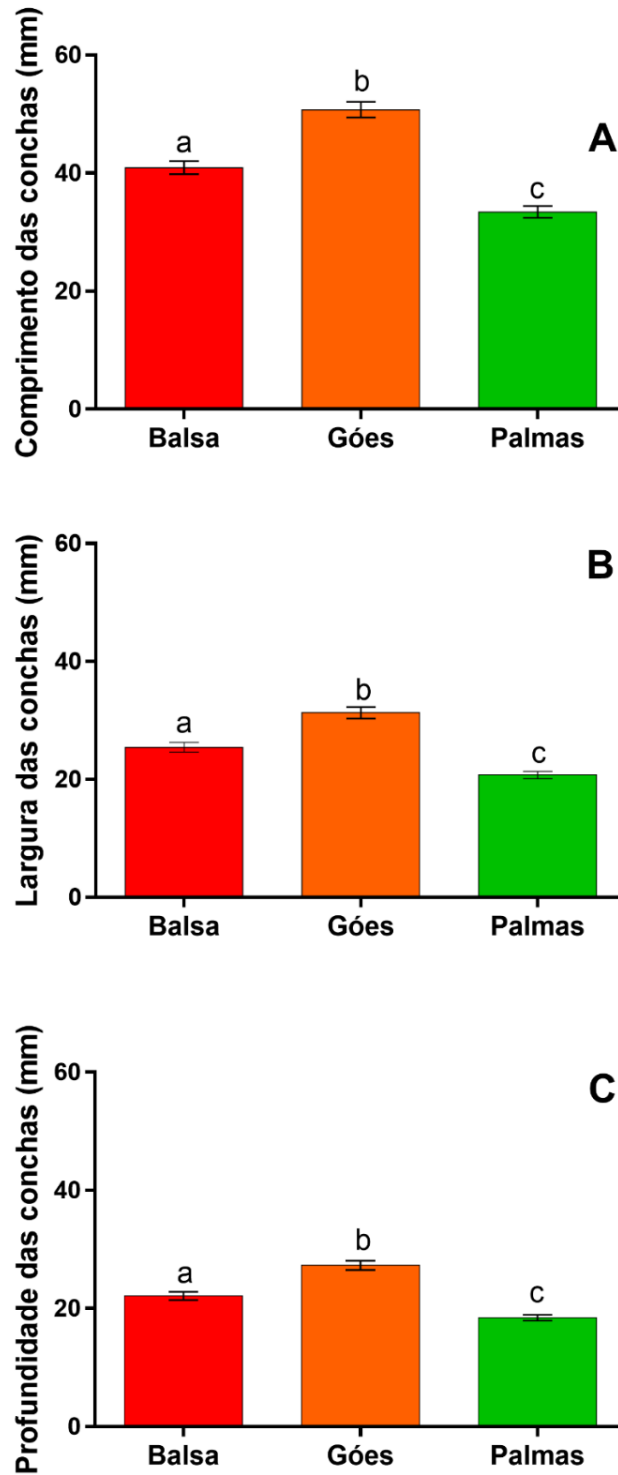


Figura 4: Médias e desvios padrões do (A) comprimento, (B) largura e (C) profundidade das conchas de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.

A análise de regressão multivariada indicou que o formato das conchas amostradas apresentou efeito alométrico ($p > 0,05$), isto é, as conchas apresentam crescimento proporcional entre as suas dimensões. Sendo assim, análises subsequentes foram feitas nos resíduos da regressão, considerados como novas variáveis de forma e livres do efeito alométrico. A análise dos componentes principais mostrou que os 8 primeiros componentes principais explicaram 91,2% da variação do formato das conchas (Tabela 1).

Tabela 1. “Eingenvales” e variância explicada de cada uma das 16 componentes.

PC	Eingenvales	% de variância total	% de variância total cumulada
1.	0,001059	28,46	28,464
2.	0,000657	17,65	46,117
3.	0,000536	14,41	60,523
4.	0,000430	11,57	72,091
5.	0,000268	7,22	79,308
6.	0,000181	4,87	84,175
7.	0,000157	4,21	88,385
8.	0,000105	2,82	91,205
9.	0,000089	2,42	93,605
10.	0,000083	2,23	95,834
11.	0,000041	1,11	96,945
12.	0,000037	0,10	97,943
13.	0,000030	0,80	98,743
14.	0,000023	0,62	99,363
15.	0,000013	0,34	99,703
16.	0,000011	0,30	100

O primeiro componente principal (PC1 = 28,5%) foi relacionado à abertura da concha (Figura 5A), com os valores positivos indicando conchas com maior abertura e os valores negativos o padrão oposto. Por outro lado, o segundo componente (PC2 = 17,7%) explicou a diferença entre na região da espira das conchas (Figura 7A) uma vez que valores positivos indicam espirais mais bem definidas.

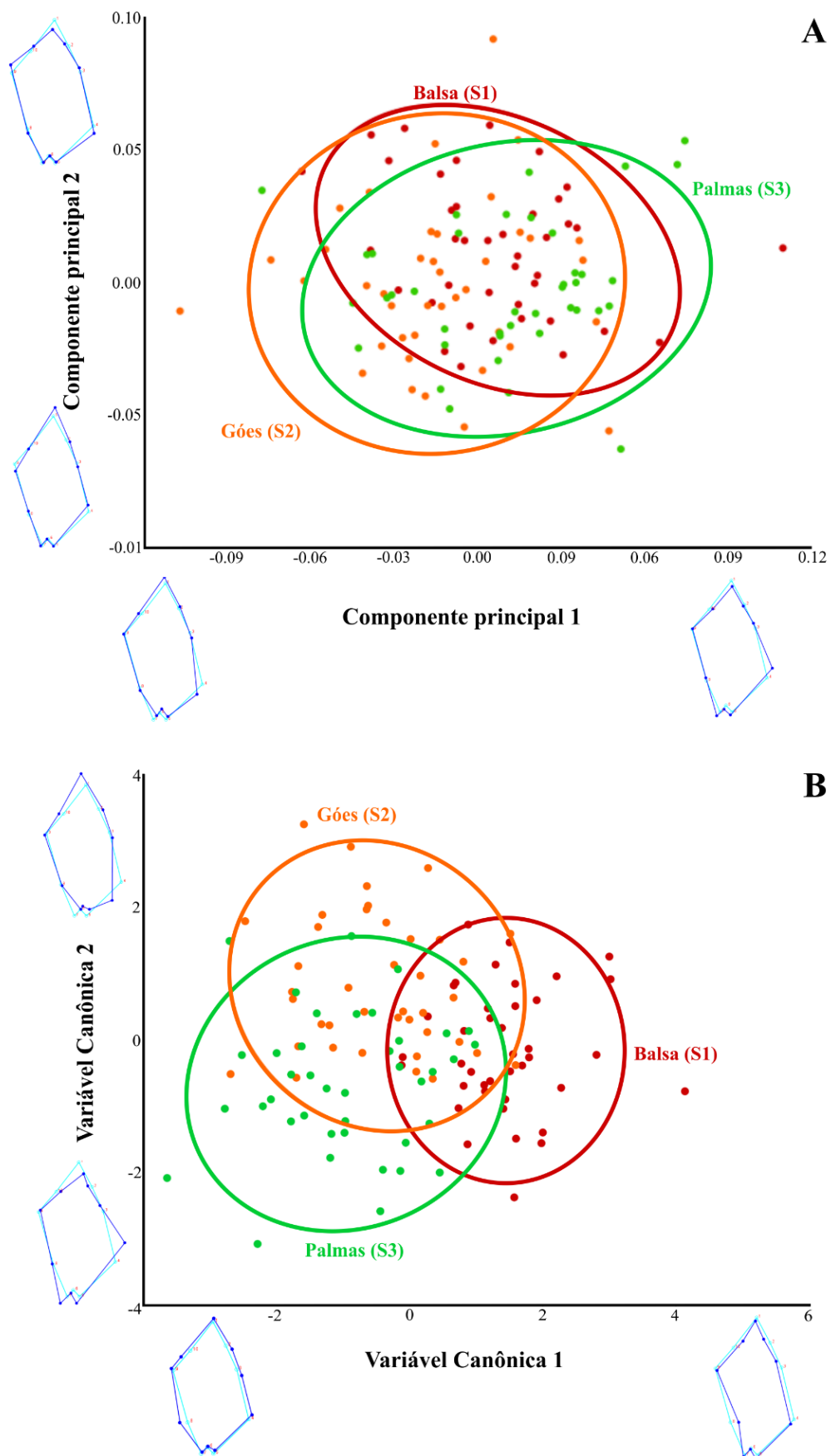


Figura 5: A) Análise dos componentes principais e B) análise de variáveis canônicas das conchas de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.

De acordo com os resultados da análise de variáveis canônicas (Figura 7B), as conchas dos três pontos amostrais diferem entre si ($p < 0,05$). De uma maneira geral, é possível observar que o agrupamento entre organismos da Balsa é maior que o dos outros pontos amostrais, indicando que a variação no formato das conchas destes organismos é menor nessa área (Figura 5B). Além disso, a separação entre os organismos das Palmas e da Balsa ocorre de acordo com as variações observadas na CV1, enquanto os organismos do Góes podem ser separados dos das Palmas pelas alterações na CV2 (Figura 5B). Mais especificamente, *S. brasiliensis* que habitam as Palmas estão agrupados nos valores negativos da CV1 e da CV2, apresentam conchas com um formato mais arredondado e com uma maior abertura da concha. Organismos da Balsa apresentaram valores de CV1 negativos, i.e., conchas com formato mais delgado. Enquanto exemplares do Góes apresentam uma menor abertura das suas conchas (valores da CV2 positivos).

Estudos utilizando morfometria geométrica demonstraram que esta ferramenta apresenta maior sensibilidade, uma vez que é capaz de detectar alterações que não podem ser observadas com dados biométricos (Márquez et al., 2011). Estudos empregando essa técnica realizados na Argentina e no Brasil demonstraram que conchas de gastrópodes (Begliomini et al., 2017; Gouveia et al. 2019; Marquez et al., 2011; Marquez et al., 2017) e bivalves (Rajaei et al., 2014; Wilk, J., & Bieler, R., 2009) que habitam áreas contaminadas apresentam alterações, quando comparados com organismos de áreas menos contaminadas. Da mesma forma, os resultados obtidos no presente estudo com *S. brasiliensis* mostraram que as conchas destes organismos amostrados dentro de um gradiente de contaminação apresentam variações de forma.

Nesse aspecto, *S. brasiliensis* das áreas contaminadas (Góes e Balsa), apresentaram conchas mais delgadas e com uma abertura menor que os organismos das Palmas. Um padrão semelhante foi encontrado para *Odontocymbiola magellanica* (Márquez et al., 2011), mas o padrão oposto foi encontrado para *Buccinanops globulosus* (Márquez et al., 2017). No caso de *B. globulosus*, autores atribuíram a forma globular da concha encontrada em áreas contaminadas como um mecanismo de proteção, uma vez que este formato permitiria um maior isolamento do organismo com o sedimento (Márquez et al., 2017). Diferentemente de *B. globulosus*, *S. brasiliensis* é encontrada em costões

rochosos e não se enterra no sedimento, o que pode explicar a diferença encontrada entre essas duas espécies.

4.2. Análise de compressão

A análise de compressão mecânica mostrou que foi necessário aplicar em média 91,2 N, 196,7 N e 457,7 N para produzir a primeira ruptura nas conchas da Balsa, Góes e Palmas, respectivamente (Figura 6). Esses resultados apresentaram variações significativas ($p < 0,0001$), demonstrando que conchas obtidas nas Palmas exigiram expressivamente mais força de compressão antes da ruptura. Além disso, as conchas de organismos obtidos no Góes e na Balsa, requereram progressivamente menos energia para o rompimento. Sendo assim, de modo similar ao que foi observado para as atividades morfométricas, foi observado um gradiente de respostas consistentes com os níveis de contaminação reportados para cada ponto de amostragem.

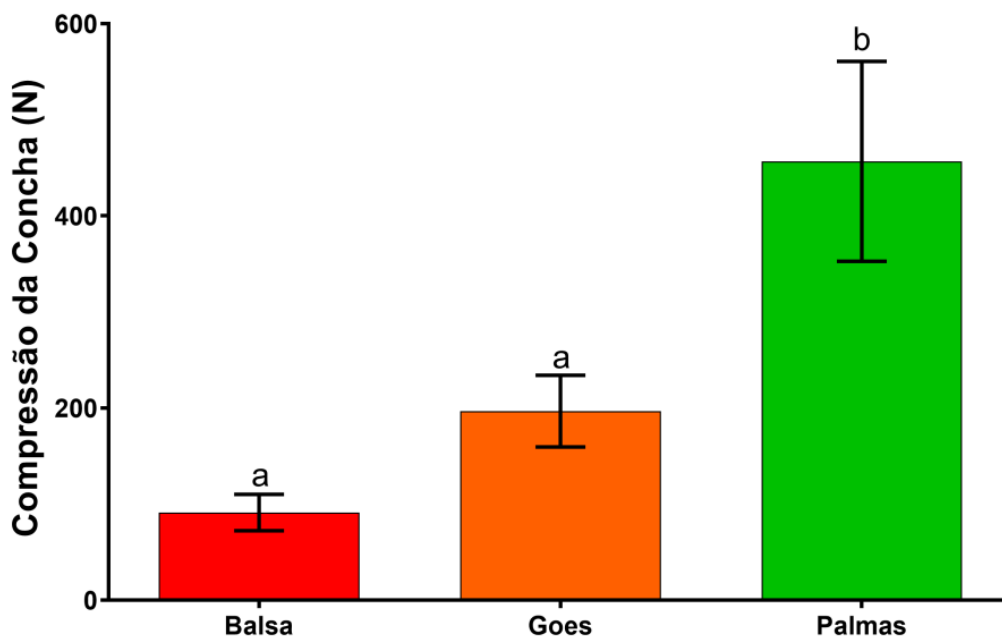


Figura 6: Médias e desvios padrões da força de compressão exercida sobre as conchas de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.

O estudo realizado por Oliveira et al. (2020) no mesmo gradiente de contaminação, demonstrou um padrão similar para conchas do gastrópode pateliforme *Lottia subrugosa*. Tais observações foram acompanhadas de uma redução de espessura em camadas intermediárias das conchas (prismática) de *L. subrugosa*. Portanto, nossos achados sugerem a existência de um padrão para diferentes espécies de moluscos expostas a áreas altamente contaminadas. Nesse sentido, um aspecto importante a ser considerado, é que tais alterações estruturais sugerem que organismos expostos à contaminação parecem desenvolver conchas mais vulneráveis a predação. Isso é particularmente relevante, considerando que esses organismos são frequentemente predados por caranguejos (Marin et al., 2007). Dessa forma, como reportado por Oliveira et al., 2020, danos na matriz orgânica dessas conchas estão possivelmente relacionadas a menor resistência a compressão observada. Entretanto, para *Stramonita brasiliensis*, análises de composição e microestrutura de conchas ainda não foram realizadas. Nesse contexto, antes que essas alterações possam ser propostas como ferramentas válidas para análise de qualidade ambiental em relação a contaminação, estudos adicionais devem ser empreendidos visando verificar um maior número de respostas e também em cenários temporais e experimentais.

4.3. Análises bioquímicas

4.3.1. Anidrase carbônica

A anidrase carbônica é uma enzima que desempenha papéis-chave em uma ampla variedade de processos fisiológicos envolvendo CO_2 e HCO_3^- , inclusive os necessários para a formação das conchas (Lionetto et al., 2012). A hidratação reversível de dióxido de carbono (CO_2) em bicarbonato (HCO_3^-) é a principal função da anidrase carbônica, desta forma evitando a perda difusa de CO_2 . Além disso, a anidrase carbônica desempenha um papel fundamental no fornecimento do carbono orgânico dissolvido para a calcificação (da Silva Fonseca et al., 2019). Os resultados do presente estudo mostraram que a atividade da anidrase carbônica de espécies amostradas no Góes foi significativamente maior que as da Balsa e Palmas (Figura 7). Nesse sentido os valores médios obtidos foram 6,52, 9,07 e 7,11 mg ptn^{-1} respectivamente em S1, S2 e S3. Enquanto organismos amostrados na Balsa e nas Palmas apresentaram atividade da anidrase carbônica semelhantes.

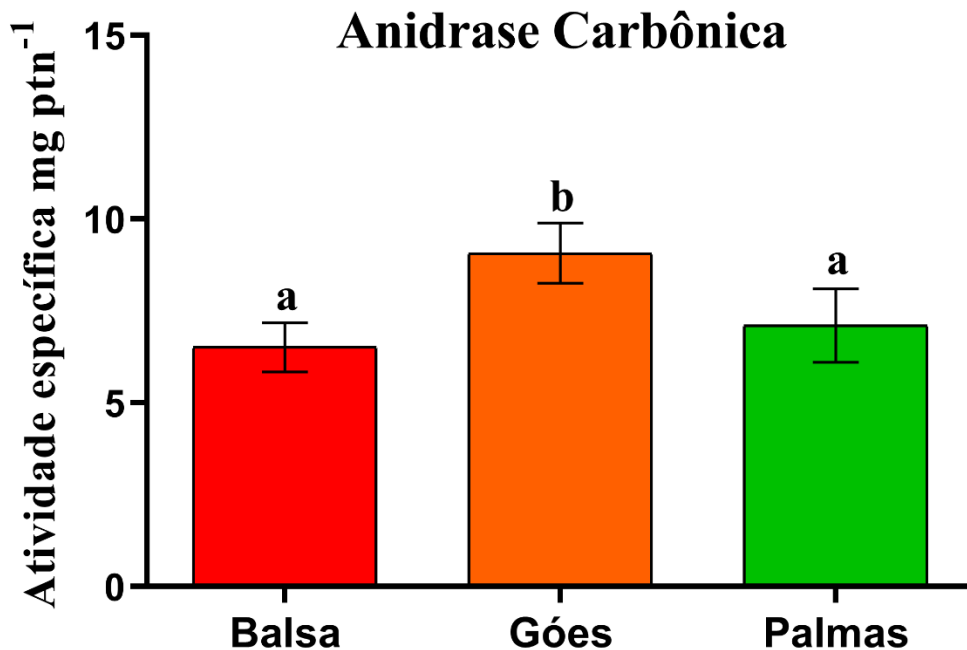


Figura 7: Médias e desvios padrões das atividades da enzima anidrase carbônica no manto de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.

Diversos estudos que avaliaram as alterações de conchas de *L. subrugosa* ao longo do gradiente de contaminação do estuário de Santos tem mostrado variação de forma, composição e estrutura consistentes com níveis locais de contaminação (Begliomini et al., 2017; Gouveia et al., 2019; Oliveira et al., 2020). Por esse motivo, e considerando o papel da anidrase carbônica no processo de biomineralização das conchas de moluscos, era esperado que tal gradiente refletisse também na atividade desta enzima. Entretanto, conforme indicado na Figura 7, isso não ocorreu, visto que as atividades não foram consistentes com os níveis de contaminação. Essas observações sugerem que outros fatores, diferentes da contaminação química, estão provavelmente influenciando a atividade enzimática para *S. brasiliensis*. Por outro lado, para *Lottia subrugosa* Harayashiki et al. (2021) observou que organismos transplantados para a área contaminada (Balsa) tiveram a atividade da anidrase carbonica afetada, em comparação com aqueles do local de referência (Palmas). Nesse caso, houve um aumento na atividade específica da enzima no local mais contaminado provavelmente relacionado aos maiores níveis de contaminação, inclusive por metais (Kim et al., 2017).

4.3.2. Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase

A Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase são enzimas que catalisam o transporte de cálcio e magnésio usados nos processos metabólicos dos organismos (Lionetto et al., 2016; Supuran, 2008, 2016; Zebral et al., 2019). Como pode ser observado na Figura 8, as atividades de ambas as ATPases (Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase) não apresentaram diferenças significativas entre os locais amostrados ($p > 0,05$), o que indica que a contaminação local não afetou o funcionamento dessas enzimas.

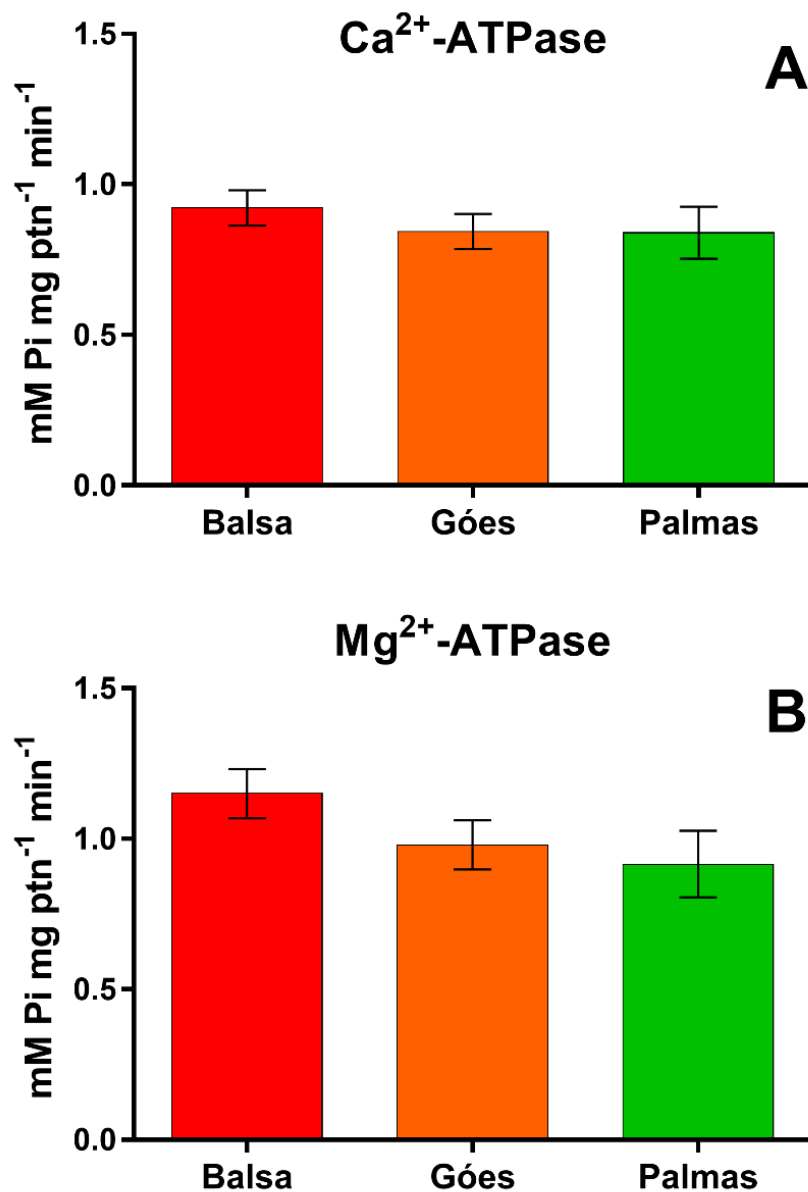


Figura 8: Médias e desvios padrões das atividades da enzima Ca^{2+} -ATPase (A) e Mg^{2+} -ATPase (B) em tecidos de manto de *Stramonita brasiliensis* coletadas ao longo de um gradiente de contaminação no estuário de Santos.

Esses resultados podem ser relacionados ao estudo feito por Jorge et al. (2013), em que os mexilhões juvenis de água doce *Lampsilis siliquoidea* sofreram exposição crônica ao cobre. Observou-se que durante os primeiros 7 dias de exposição, a atividade enzimática da Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase teve um aumento, porém o mesmo não foi visto quando se prolongou o período de exposição. O estudo conduzido por Harayashiki et al. (2021) mostrou um padrão similar em organismos de *L. subrugosa* que foram transplantadas para a zona com maior nível de contaminação. Dessa forma, os resultados do presente estudo possivelmente estão relacionados ao fato que as enzimas Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase tiveram a capacidade de regular sua atividade enzimática devido à exposição crônica dos contaminantes presentes no estuário de Santos, não apresentando assim alterações relevantes.

5. CONCLUSÃO

Os padrões encontrados na biometria e morfometria das conchas foram consistentes ao gradiente de contaminação, o mesmo foi observado para resistência a compressão das conchas desses organismos, onde os moluscos coletados na Palmas exigiram consideravelmente mais força de compressão antes da ruptura das conchas. Entretanto, esse padrão não foi verificado para as análises bioquímicas, não havendo diferenças estatísticas para as enzimas Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase. Como também para a enzima anidrase carbônica, em que atividade específica no Góes foi significativamente maior que as encontradas na Balsa e nas Palmas. Esses resultados sugerem que outros fatores, além da contaminação química, influenciam a atividade destas enzimas. Similarmente, os resultados da biometria não foram consistentes ao gradiente de contaminação, pois os organismos amostrados no Góes apresentaram um tamanho maior que os coletados na Balsa e nas Palmas. Tais resultados indicam que as respostas biológicas observadas para morfometria e resistência das conchas de *Stramonita brasiliensis* podem vir a ser utilizados como biomarcadores da contaminação em zonas costeiras. Entretanto, estudos adicionais envolvendo um maior número de respostas, assim como avaliações temporais e experimentais precisam ser realizadas antes que a ferramenta seja validada para uso universal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aly, W., Williams, I.D., Hudson, M.D. 2013. Metal contamination in water, sediment and biota from a semi-enclosed coastal area. *Environ. Monit. Assess.* 185, 3879–3895.

Alzieu, C. 2000. Environmental impact of TBT: the French experience. *Sci. Total Environ.* 258,99e102.

Alzieu, C.L., Sanjuan, J., Deltreil, J.P., Borel, M., 1986. Tin contamination in Arcachon Bay: effects on oyster shell anomalies. *Mar. Pollut. Bull.* 17, 494e498.

Begliomini, F.N., Maciel, D.C., de Almeida, S.M., Abessa, D.M., Maranhão, L., Pereira, C.S., Yogui, G.T., Zanardi-Lamardo E., Castro, Í.B. 2017. Shell alterations in limpets as putative biomarkers for multi-impacted coastal areas. *Environmental Pollution*, 226, 494–503. doi:10.1016/j.envpol.2017.04.045

Borja, A., Elliott, M., Andersen, J.H., Berg, T., Carstensen, J., Halpern, B.S., Heiskanen, A., Korpinen, S., Lowndes, J.S.S., Martin, G., Rodriguez-Ezpeleta, N. 2016. Overview of integrative assessment of marine systems: The ecosystem approach in practice. *Frontiers in Marine Science*, 3. doi:10.3389/fmars.2016.00020

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*. Academic Press, 72(1–2), pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Buruaem, L.M.; Castro, Í.B.; Hortellani, M.A.; Taniguchi, S.; Fillmann, G.; Sasaki, S.T.; Varella Petti, M.A.; Sarkis, J.E. de S.; Bicego, M.C.; Maranhão, L.A.; Davanzo, M.B.; Nonato, E.F.; Cesar, A.; Costa-Lotufo, L.V.; Abessa, D.M. de S. 2013. Integrated quality assessment of sediments from harbour areas in Santos-São Vicente Estuarine System, Southern Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130, 179-189.

Castro, Í.B.; Perina, F.C.; Fillmann, G. 2012. Organotin contamination in South

American coastal areas. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 1781-1799. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-011-2078-7>

Castro, Í.B.; Rocha-Barreira, C. de A.; Fernandez, M.A.; Bigatti, G. 2012. Transplant bioassay induces different imposex responses in two species of the genus. *Marine Biology Research*, 8, 397-404. <http://dx.doi.org/10.1080/17451000.2011.627923>

Castro, Í.B.; Rossato, M.; Fillmann, G. 2012. Imposex reduction and residual butyltin contamination in southern Brazilian harbors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 947-954.

Claremont, M.; Williams, S.T.; Barraclough, T.G.; Reid, D.G. 2011. The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. *Journal of Biogeography*, 38 (6), 1016-1032. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02482.x>

Crain, C.M.; Kroeker, K.; Halpern, B.S. 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters*, 11(12), 1304– 1315. [doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x)

da Silva Fonseca, J., de Barros Marangoni, L. F., Marques, J. A., & Bianchini, A. (2019). Carbonic anhydrase activity as a potential biomarker for acute exposure to copper in corals. *Chemosphere*, 227, 598-605.

Erulkar, S. D. 1981 The Versatile Role of Calcium in Biological Systems. *Interdisciplinary Science Reviews* 6(4).

Goessler, W.; Maher, W.; Irgolic, K.J.; Kuehnelt, D.; Schlagenhaufen, C.; Kaise, T. 1997. Arsenic compounds in a marine food chain. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 359(4-5), 434–437. [doi:10.1007/s002160050605](https://doi.org/10.1007/s002160050605)

Gouveia, N.; Oliveira, C.R.M.; Martins, C.P.; Maranhão, L.A.; Seabra Pereira, C.D.; de Orte, M.R.; Harayashiki, C.A.Y.; Almeida, S.M.; Castro, I.B. 2019. Can shell

alterations in limpets be used as alternative biomarkers of coastal contamination?
Chemosphere, 224, 9-19.
doi:10.1016/j.chemosphere.2019.02.122

Harayashiki, C. A. Y., Martins, C. P., Márquez, F., Bigatti, G., & Castro, Í. B. (2020). Historical shell form variation in *Lottia subrugosa* from southeast Brazilian coast: Possible responses to anthropogenic pressures. *Marine Pollution Bulletin*, 155, 111180.

Harayashiki, C. A. Y., Sadauskas-Henrique, H., de Souza-Bastos, L. R., Gouveia, N., Dal Pont, G., Ostrensky, A., & Castro, I. B. (2021). Shell form and enzymatic alterations in *Lottia subrugosa* (Gastropoda, Lottiidae) transplanted to a contaminated site. *Marine Pollution Bulletin*, 164, 112075.

Idaszkin, Y. L., Márquez, F., Mateos-Naranjo, E., de la Paz Pollicelli, M., & Cisneros, H. S. (2019). Multidimensional approach to evaluate *Limonium brasiliense* as source of early biomarkers for lead pollution monitoring under different saline conditions. *Ecological Indicators*, 104, 567-575.

Jorge, M. B., Loro, V. L., Bianchini, A., Wood, C. M., & Gillis, P. L. (2013). Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*) chronically exposed to copper. *Aquatic toxicology*, 126, 137-147.

Kim, B.S.M., Angeli, J.L.F., Ferreira, P.A. de L., Sartoretto, J.R., Miyoshi, C., de Mahiques, M.M., Figueira, R.C.L., 2017. Use of a chemometric tool to establish the regional background and assess trace metal enrichment at Baixada Santista e Southeastern Brazil. *Chemosphere* 166, 372e379. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.132.

Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. Wiley/Blackwell (10.1111), 11(2),

353–357. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x.

Laitano, M.V., Nunez, J.D., Cledón, M., 2013. Shell alterations in the limpet *Bostrycapulusodites*: a bioindicator of harbour pollution and mine residuals. *Ecol. Indic.* 34, 345e351.

Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Erroi, E., & Schettino, T. (2012). Carbonic anhydrase as pollution biomarker: an ancient enzyme with a new use. *International journal of environmental research and public health*, 9(11), 3965-3977.

Maher, W.; Butler, E. 1988. Arsenic in the marine environment. *Applied Organometallic Chemistry*, 2(3), 191–214. doi:10.1002/aoc.590020302

Marin, F., Luquet, G., Marie, B., & Medakovic, D. (2007). Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current topics in developmental biology*, 80, 209-276.

Marin, F.; Le Roy, N.; Marie, B. 2012. The formation and mineralization of mollusk shell. *Frontiers in Bioscience*, 4, 1099-1125.

Márquez, F.; González-José, R.; Bigatti, G. 2011. Combined methods to detect pollution effects on shell shape and structure in Neogastropods. *Ecological Indicators*, 11(2), 248–254. doi:10.1016/j.ecolind.2010.05.001

Márquez, F.; Primost, M.A.; Bigatti, G. 2017. Shell shape as a biomarker of marine pollution historic increase. *Marine Pollution Bulletin*, 114(2), 816–820. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.11.018

Nöges, P.; Argillier, C.; Borja, Á.; Garmendia, J.M.; Hanganu, J.; Kodeš, V.; Pletterbauer, F.; Sagouis, A.; Birk, S. 2016. Quantified biotic and abiotic responses to multiple stress in freshwater, marine and ground waters. *Science of The Total Environment*, 540, 43–52. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.045

Nuñez, J.D.; Laitano, M.V.; Cledón, M. 2012. An intertidal limpet species as a bio-

indicator: pollution effects reflected by shell characteristics. *Ecol. Indic.* 14, 178e183.

Oliveira, C. R. M., de Castro, L. M., da Cruz Nazareth, M. A., Harayashiki, C. A. Y., & Castro, Í. B. (2020). Shell structure and composition alterations in the limpet *Lottiasubrugosa* along a contamination gradient in the Santos Estuary, Brazil. *Ecological Indicators*, 115, 106417.

Nozadze, Eka, Nana Arutinova, Leila Tsakadze, et al. 2015 Molecular Mechanism of Mg-ATPase Activity. *The Journal of Membrane Biology* 248(2)295–300. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9769-2>,

OSPAR (2009). Trend analysis of maritime human activities and their collective impact on the OSPAR maritime area, Publication Number: 443/2009. London: OSPAR Commission.

Pattnaik, S., Chainy, G. B. N., & Jena, J. K. (2007). Characterization of Ca²⁺-ATPase activity in gill microsomes of freshwater mussel, *Lamellidens marginalis* (Lamarck) and heavy metal modulations. *Aquaculture*, 270(1-4), 443–450. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.05.012 .

Primost, M.A.; Bigatti, G.; Márquez, F. 2016. Shell shape as indicator of pollution in marine gastropods affected by imposex. *Marine and Freshwater Research*, 67(12), 1948–1954. Available at:<https://doi.org/10.1071/MF15233>.

Pusceddu, F.H.; Sugauara, L.E.; de Marchi, M.R.; Choueri, R.B.; Castro, Í.B. 2019. Estrogen levels in surface sediments from a multi-impacted Brazilian estuarine system. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 576-580. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.052>

Rajaei, M., Poorbagher, H., Farahmand, H., Mortazavi, M. S., & Eagderi, S. (2014). Interpopulation differences in shell forms of the pearl oyster, *Pinctada imbricata radiata* (Bivalvia: Pterioidea), in the northern Persian Gulf inferred from principal component analysis and elliptic Fourier analysis. *Turkish Journal of Zoology*, 38(1), 42-48.

Rossato, M.; Costa, M.B.; Castro, I.B.; Pinho, G.L.L. 2018. Size, season and origin of gastropods matter in imposex assessments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 159, 324-331.

[Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Ecoenv.2018.05.013](http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.013)

Santini, O.; Chahbane, N.; Vasseur, P.; Frank, H. 2011. Effects of low-level copper exposure on Ca²⁺-ATPase and carbonic anhydrase in the freshwater bivalve *Anodonta anatina*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(9), 1826-1837.

Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases-an overview. *Current pharmaceutical design*, 14(7), 603-614.

Veiga, M.P.T.; Gutierrez, S.M.M.; Castellano, G.C.; Freire, C.A. 2015. Tolerance of high and low salinity in the intertidal gastropod *Stramonitabrasiliensis*(Muricidae): behaviour and maintenance of tissue water content. *Journal of Molluscan Studies*, 82(1), 154–160. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyv044>.

Wilk, J., & Bieler, R. (2009). Ecophenotypic variation in the Flat Tree Oyster, *Isognomonalatus* (Bivalvia: Isognomonidae), across a tidal microhabitat gradient. *Marine Biology Research*, 5(2), 155-163.

Zebral, Y. D., da Silva Fonseca, J., Marques, J. A., & Bianchini, A. (2019). Carbonic anhydrase as a biomarker of global and local impacts: Insights from calcifying animals. *International journal of molecular sciences*, 20(12), 3092.