

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Ciclo reprodutivo de *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia,  
Mytilidae): um biomarcador para bancos naturais de áreas  
antrópicas?**

**Millena Araujo França**

**Vitória/ES  
Março, 2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Ciclo reprodutivo de *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Mytilidae): um biomarcador para bancos naturais de áreas antrópicas?**

**Millena Araujo França**

**Orientador(a): Dra. Mércia Barcellos da Costa**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

**Vitória/ES  
Março, 2020**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

F814c França, Millena Araujo, 1994-  
Ciclo reprodutivo de Perna perna (Linnaeus, 1758) (Bivalvia,  
Mytilidae) : um biomarcador para bancos naturais de áreas  
antrópicas? / Millena Araujo França. - 2020.  
108 f. : il.

Orientadora: Mércia Barcellos da Costa.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e  
Naturais.

1. Ecotoxicologia. 2. Biologia Marinha. 3. Poluição Marinha.  
4. Malacologia. 5. Histologia. 6. Parasitologia. I. Costa, Mércia  
Barcellos da. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro  
de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

---

Millena Araujo França

**“Ciclo reprodutivo de *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Mytilidae):  
um biomarcador para bancos naturais de áreas antrópicas?”**

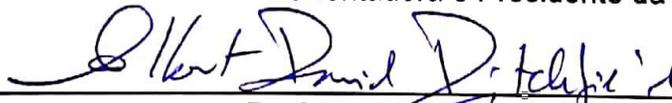
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em 02 de março de 2020.

Comissão Examinadora:



Profª Drª Mercia Barcellos da Costa (UFES)  
Orientadora e Presidente da Comissão



Prof. Dr. Albert David Ditchfield (UFES)  
Examinador interno



Profª Drª Teofânia Heloisa Dutra Amorim Vidigal (UFMG)  
Examinadora externa

*“Eu sei. Isso não é justo. Na verdade, nem deveríamos estar aqui. Mas estamos. É como nas grandes histórias, Mr. Frodo. As que tinham mesmo importância eram repletas de escuridão e perigo. E, às vezes, você não queria saber o fim, porque, como poderiam ter um final feliz? Como poderia o mundo voltar a ser o que era depois de tanto mal? Mas, no fim, essa sombra é só uma coisa passageira. Até a escuridão tem de passar. Um novo dia virá e quando o sol brilhar, brilhará ainda mais forte. Eram essas as histórias que ficavam na lembrança, que significavam algo. Mesmo que você fosse pequeno demais para entender o porquê. Mas acho, Mr. Frodo, que eu entendo, sim. Agora eu sei. As pessoas dessas histórias tinham várias oportunidades de voltar atrás, mas não voltavam. Elas seguiam em frente, porque tinham no que se agarrar. [...] O que tinham é o bem que há neste mundo, Mr. Frodo, pelo qual vale a pena lutar.”*

Samwise Gamgee – The Lord of Rings (2002)

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, meu irmão e irmã de alma, pelo amor e apoio.

Aos meus familiares. Especialmente meus padrinhos e a Ivanete França.

Ao Zeca Martins (*in memorian*), meu grande apoiador. Sinto saudades.

A Mércia Barcellos da Costa, minha querida orientadora, pelo apoio, confiança, conselho e amor. Você sempre acreditou que eu poderia ir além e eu estou indo.

Ao Nyam Florêncio da Silva, meu orientador e amigo, pelas longas conversas, acolhida, questionamentos, preocupação, tempo e por me fazer pensar fora da caixa.

Ao Bruno Neres, amigo, companheiro de trabalho, mestrado e vida! Sem você o mestrado não teria feito sentido.

A Viviana e a Luciene, por me ensinarem tudo que sei sobre histologia.

Aos Malacogatos Arthur, Grazielli, Jheynifer, Macley, Mateus, Midiã, Valéria e Vitória que auxiliaram nas coletas e análises, pelas risadas, músicas e longas conversas.

A Gabriela Zamprogno e Mariana Otegui, pela conversa, troca e informações.

Aos professores Maria do Carmo Batitucci e Geraldo Cuzzuol, além de seus alunos, pela fornecimento de seus laboratórios para a realização de alguns experimentos.

Aos professores colaboradores Hudson Alves Pinto e Narcisa Imaculada Brandt, pela fixação e identificação dos parasitos, pela disponibilidade e o apoio fornecido.

Ao Daniel Motta, biólogo e amigo que auxiliou nas análises de taxonomia.

Aos amigos Ricardo Santa' Anna, Josué King, João Marco Schuab, Jonatan, Peterson Hallack, Kamila Zambom, minhas âncoras de sanidade durante esse período.

Ao Costão Rochoso: Bruno, Bruna, Christian, Izabella, Ganso, Mateus e Natália. Tenho outra visão do mundo, da natureza e do nosso papel como cientista graças à vocês.

Aos coroinhas e cerimoniaários do Santuário do Bom Pastor.

Aos professores do programa, pelo incremento profissional e pessoal fornecido, em especial ao professor Gustavo Leite e o professor Albert David Ditchfield.

A FAPES pela obtenção dos recursos necessários para a realização dos experimentos e testes. Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Por fim, um agradecimento especial para Timão e Pumba, por me ensinarem a melhor filosofia de vida: Hakuna Matata!

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	16
-----------------------	----

## CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO .....	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
3.1 ESTÁDIO ZERO (0) .....	38
3.2 ESTÁDIO I.....	41
3.3 ESTÁDIO II.....	43
3.4 ESTÁDIO III .....	46
3.4.1 Estádio III-A .....	46
3.4.2 Estádio III-B.....	49
3.4.3 Estádio III-C.....	52
4. CONCLUSÃO .....	55
REFERÊNCIAS .....	56

## CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO .....	61
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	63
2.1. ÁREA DE ESTUDO.....	63
2.2. COLETA DOS INDIVÍDUOS .....	64
2.3. TEMPERATURA ATMOSFÉRICA E MÉDIA DE PRECIPITAÇÃO.....	65
2.4. ANÁLISES MACROSCÓPICAS .....	65
2.5. ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....	65
2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	65
3. RESULTADOS.....	66
3.1. RAZÃO SEXUAL.....	67
3.2. TEMPERATURA ATMOSFÉRICA E PRECIPITAÇÃO MÉDIA .....	67
3.3. ESTÁDIOS DE MATUREZAÇÃO GONADAL .....	68
3.2.1. Avaliação microscópica dos estádios de maturação gonadal.....	68
3.2.2. Avaliação macroscópica dos estádios de maturação gonadal.....	70
3.2.3. Prevalência de acerto entre metodologias .....	71
3.4. VIABILIDADE GAMÉTICA FEMININA.....	71

3.5. MEDIDAS HISTOLÓGICAS DOS ÓVULOS MADUROS TOTAIS .....	73
4. DISCUSSÃO .....	75
REFERÊNCIAS .....	79

### **CAPÍTULO 3**

1. INTRODUÇÃO .....	86
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	88
3. RESULTADOS .....	91
3.1. ANÁLISE TAXONÔMICA E MOLECULAR .....	91
3.2. ANÁLISE MACROSCÓPICA .....	93
3.3. ANÁLISE MICROSCÓPICA .....	96
4. DISCUSSÃO .....	100
REFERÊNCIAS .....	105

## **LISTA DE SIGLAS**

**BUC** – Filamentos do parasita bucefalídeo

**BIN** – Óvulos binucleados

**COEs** - Compostos Orgânicos de Estanho

**FNPP** – Fontes Não Pontuais de Poluição

**FPP** – Fontes Pontuais de Poluição

**MP** – Microplástico

**OAT** – Óvulos Atrésicos

**OMN** – Óvulos Maduros Nucleados

**OMT** – Óvulos maduros totais

**OPV** – Ovócito pré-vitelogênico

**OVP** – Ovócito vitelogênico pedunculado

**PIB** – Produto Interno Bruto

**TBT** – Tributilestanho

**TIF** – Tecido interfolicular

**TPT** - Trifenilestanho

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- FIGURA 1:** Gônada e folículo de *Perna perna* em estágio 0. Nesse estágio não é possível diferenciar os sexos, visualizando-se em ambos os tecidos reprodutivos semitransparência que possibilita, nos folículos, por exemplo, a visualização da camada nacarada bem como de suas características peculiares e particulares, como pequenas lesões, abaulações ou marcas oriundas da deposição de cálcio. Aumento de 10x. ....40
- FIGURA 2:** Gônada e folículo de *Perna perna* em estágio I. Note-se que não é possível fazer a sexagem nesse estágio, entretanto, é possível observar a opacidade da gônada bem como o início do preenchimento dos folículos a partir das vias gaméticas. Aumento de 10x. ....42
- FIGURA 3:** Gônada e folículo de *Perna perna* macho em estágio II. Nota-se o aspecto arborescente e ramificado dos folículos dos machos. Aumento de 10x. ....44
- FIGURA 4:** Gônada e folículo de *Perna perna* fêmea em estágio II. Nota-se o aspecto arredondado dos folículos das fêmeas e borda opaca nas gônadas. Aumento de 10x. ....45
- FIGURA 5:** Gônada e folículo de *Perna perna* macho em estágio III-A. Na região anterior dos machos podemos observar altura maior na região anterior da gônada, se comparado ao seu comprimento. Aumento de 10x. ....47
- FIGURA 6:** Gônada e folículo de *Perna perna* fêmea em estágio iii-a. na região anterior dos machos podemos observar altura maior da região anterior da gônada, se comparado ao seu comprimento. já nas fêmeas a porção anterior tem menor altura, conferindo aspecto longilíneo a mesma. aumento de 10x. ....48
- FIGURA 7:** Gônada e folículo de *Perna perna* macho em estágio III-B. É possível observar gametas remanescentes, indicando esvaziamento parcial dos mesmos. Aumento de 10x. ....50
- FIGURA 8:** Gônada e folículo de *Perna perna* fêmea em estágio III-B. É possível observar gametas remanescentes, indicando esvaziamento parcial dos mesmos. Aumento de 10x. ....51

**FIGURA 9:** Gônada e folículo de *Perna perna* macho no estágio III-C. Neste estágio não há gametas nos folículos, sendo possível visualizar a camada nacarada. Todavia, as gônadas apresentam gametas remanescentes que tornam possível a distinção entre os sexos. Aumento de 10x. ....53

**FIGURA 10:** Gônada e folículo de *Perna perna* fêmeas no estágio III-C. Neste estágio não há gametas nos folículos, sendo possível visualizar a camada nacarada. Todavia, as gônadas apresentam gametas remanescentes que tornam possível a distinção entre os sexos. Aumento de 10x. ....54

## **CAPÍTULO 2**

**FIGURA 1:** Localização dos pontos onde foram amostrados os exemplares de *Perna perna*. Vitória (P1) localizado na região central e Setiba (P2) localizado na região sul do Estado do Espírito Santo. ....64

**FIGURA 2:** Indivíduo de *Perna perna* hermafrodita encontrado em Vitória no mês de março de 2018. GF, gametas femininos; GM, gametas masculinos. ....67

**FIGURA 3:** Valores médios mensais da precipitação e temperatura do ar entre os pontos amostrais P1 e P2 ao longo dos meses de estudo. Fonte: INCAPER (2020). ....68

**FIGURA 4:** Distribuição temporal (%) dos estádios gametogênicos microscópicos de *Perna perna*, machos e fêmeas, coletados em P1 e P2, ao longo de um ciclo anual. ....69

**FIGURA 5:** Distribuição temporal (%) dos estádios gametogênicos macroscópicos de *Perna perna*, machos e fêmeas, coletados em P1 e P2, ao longo de um ciclo anual. ....70

**FIGURA 6:** Exemplificação das fases de maturação gamética de *Perna perna* em cada estágio sexual baseado na classificação macroscópica, sendo: TIF – tecido interfolicular; BUC – filamentos do parasito bucefálideo; OPV – ovócito pré-vitelogênico; BIN – óvulos binucleados; OAT – óvulo atrésico; OVP – ovócito vitelogênico pedunculado; OMT – óvulo maduro total; OMN – óvulo maduro nucleado. ....72

**FIGURA 7:** Frequência relativa (%) dos estádios de maturação gamética em P1 e P2 entre

os meses amostrais. PO, ovócitos pré-vitelogênicos; PVO, ovócitos vitelogênicos pedunculados; TMO, óvulos maduros totais; OMN, óvulos maduros nucleados; OAT, óvulos atrésicos. ....73

**FIGURA 8:** Valores médios do diâmetro e comprimento dos óvulos maduros totais (TMO) ( $\mu\text{m}$ ) de *Perna perna* coletados em P1 e P2 ao longo do ano amostral. ....74

### CAPÍTULO 3

**FIGURA 1:** Localização dos pontos amostrais. Setiba ( $20^{\circ}38'07.6''\text{S}$   $40^{\circ}25'23.6''\text{W}$ ) à esquerda e Vitória ( $20^{\circ}18'27.9''\text{S}$   $40^{\circ}16'44.5''\text{W}$ ) à direita. ....90

**FIGURA 2:** Cercárias (A) e esporocistos (B, C e D) de trematódeos da subfamília Bucephalinae encontrados na gônada e manto de *P. perna*. Aumento 100x. ....91

**FIGURA 3:** Análise filogenética entre a larva de trematódeo encontrado em *P. perna* (em negrito) no presente estudo e representantes da família Bucephalidae com sequências disponíveis no GenBank. A árvore foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana utilizando-se sequências parciais do gene 28S rRNA. Probabilidades posteriores ( $>0.9$ ) e valores de bootstrap ( $>50$ ) são apresentados nos nós. ....92

**FIGURA 4:** Alterações macroscópicas verificadas em gônada e folículo de *P. perna*, machos e fêmeas, infectados por Bucephalidae. Imagens de animais não infectados são apresentadas para comparação. ....93

**FIGURA 5:** Valores médios e desvio padrão da prevalência de infecção por Bucephalidae observados macroscopicamente nos dois pontos amostrais. ....94

**FIGURA 6:** Prevalência de infecção (%) de parasitos a partir de análise macroscópica em mexilhões *P. perna* nos dois pontos amostrais e em relação ao sexo. ....95

**FIGURA 7:** Frequência relativa mensal da prevalência de parasitos analisados macroscopicamente em fêmeas e machos de *P. perna* para os dois pontos amostrais. ....96

**FIGURA 8:** Alterações histopatológicas observadas em tecido gonadal de *P. perna*, machos

e fêmeas, infectados por Bucephalidae. imagens de animais não infectados são apresentadas para comparação.....**97**

**FIGURA 10:** Prevalência (%) de parasitos a partir de análises microscópicas de mexilhões *P. perna* machos e fêmeas, nos dois pontos amostrais.....**99**

**FIGURA 11:** Frequência relativa da prevalência média de parasitos analisados microscopicamente em fêmeas e machos no que tange os pontos e meses amostrais. ....**100**

## RESUMO

As populações costeiras usufruem dos oceanos para comunicação, transporte, lazer ou fonte alimentar. Todavia, essas fontes alimentares, no decorrer dos últimos séculos, sofreram e sofrem rotineiramente com os impactos oriundos de ação antrópica. Dentre os organismos utilizados para o consumo humano destacam-se os mariscos, em especial os mexilhões. No Brasil, o mexilhão mais utilizado é *Perna perna*. Ciente de sua importância econômica e social, identificar e compreender possíveis alterações advindas da ação humana tornam-se necessários tanto para a espécie de molusco quanto para os seus consumidores. Desta maneira, objetivou-se nessa dissertação analisar o uso do ciclo reprodutivo de *Perna perna* como possível biomarcador de contaminação ambiental. Para tal, foram coletados organismos em uma área antrópica (Vitória) e uma área de referência (Setiba) ao longo de um ciclo anual. Os animais foram analisados macroscopicamente e encaminhados para as análises microscópicas a partir de processos histotécnicos padrões. As análises de 712 organismos indicaram que os animais do ponto amostral Vitória são afetados diretamente pela ação antrópica presente na região, uma vez que apresentam maior incidência parasitária por trematódeos bucefalídeos (44,16% de prevalência em Vitória e 18,46% em Setiba). Esses parasitas se alimentam das reservas energéticas dos tecidos reprodutivos, especialmente dos óvulos maduros das fêmeas. Isso ocasiona a ruptura dos óvulos gerando assim, maior percentagem de óvulos atrésicos (média de 3,825 em Vitória para 1.58 em Setiba), o que indica menor viabilidade dos gametas e conseqüentemente influencia no sucesso reprodutivo da espécie neste local. Em decorrência desses fatores, é provável que para compensar o baixo recrutamento esses organismos estejam produzindo e liberando gametas continuamente durante o decorrer do ano, vide que Vitória apresenta significância para o estágio III-A. A somatória desses resultados corrobora o desvio na razão sexual dessa espécie para os machos de Vitória ( $X^2$  1,20), uma vez que as fêmeas são os maiores alvos de estressores e contaminantes ambientais. Como produto deste estudo desenvolveu-se um guia macroscópico para os estádios sexuais gonadais, vitais para o entendimento da reprodução desta espécie. Portanto, conclui-se que o ciclo reprodutivo de *P. perna* é um excelente biomarcador para a contaminação ambiental.

**Palavra chave:** Ecotoxicologia marinha. Antropogênico. Eutrofização. Mexilhão marrom. Reprodução.

## ABSTRACT

Coastal populations use the oceans for communication, transportation, recreation or food sources. However, these food sources have suffered and routinely suffer from the impacts of anthropic action. Among the target organisms for human consumption, shellfish stand out, especially mussels. In Brazil, the most used mussel as food source is *Perna Perna*. Aware of its economic and social importance, identifying and understanding possible changes arising from human action have become necessary for both species and consumers. Thus, the objective of this work was to analyze the use the reproductive cycle of *P. perna* as a possible biomarker of environmental contamination. For this, individuals of *P. perna* were collected in an anthropic area (Vitória) and a reference area (Setiba) over an annual cycle. The animals were macroscopically analyzed and forwarded for microscopic analysis using standard histotechnical processes. The analysis of 712 organisms indicated that the animals from Vitória sampling point are directly affected by the anthropic action occurring in the region, once they have a higher parasitic incidence of bucefalids trematodes (44,16% prevalence in Vitória and 18,46% in Setiba) that feeds on the energetic reserves of the reproductive tissues, mainly of female mature eggs. This causes eggs disruption and thus generating a higher percentage of atresic egg (mean from 3,825 in Vitória to 1,58 in Setiba), which indicates lower gamete viability and consequently influences reproductive success of the species at this location. As result of these factors, it is likely that to compensate the low recruitment, these organisms are continuously producing and releasing gametes throughout the year. The association of these results corroborates the deviation in the sex ratio of this species for males of Vitória ( $X^2$  1,20), since females are the main targets of stressors and environmental contaminants. As a product of this study, a macroscopic guide was developed for gonadal sexual stages, which are vital for understanding the reproduction of this species. Therefore, the reproductive cycle of *P. Perna* is an excellent biomarker for environmental contamination.

**Keywords:** Marine ecotoxicology. Anthropogenic. Eutrophication. Brown mussel. Reproduction.

## INTRODUÇÃO GERAL

A origem da vida ocorreu no oceano e até os dias atuais ele continua sendo o lar da maior parte das plantas e animais presentes no planeta (DAMINELI & DAMINELI, 2007). Não é ao acaso que este é o maior ecossistema entre todos os existentes e, por conseguinte, são classificados como grandes massas de água que dominam a superfície da terra (UCMP, 2019) ocupando mais de 70% do seu espaço (NATIONAL GEOGRAPHIC, 2018). Os oceanos em conjunto contêm 1,35 bilhões de quilômetros cúbicos de água, incluindo aproximadamente 3,5% de sal e apresentando resíduos de todos os elementos químicos descritos até a atualidade (SCAPUCIN *et al.*, 2018).

Desde os primórdios da evolução humana, utilizou-se os oceanos como fonte indispensável para a vida e sobrevivência. Dentre os benefícios indispensáveis para os seres humanos se destacam: a produção de mais de 50% do oxigênio que o planeta produz, além da captura, absorção e retenção de cinquenta vezes mais dióxido de carbono da atmosfera; regulação do clima ao transportar o calor do Equador para os pólos, estabilizando os padrões climáticos; transporte da maior parte dos produtos comercializados, cerca de 90% em todos os países do mundo, sendo então uma das principais fontes de movimentação da economia; fonte de muitos medicamentos; fonte de alimento como os frutos do mar e o sal de cozinha; e por fim, são fundamentais para o ciclo da água, que é o formador das nuvens e das chuvas que irrigam e fornecem água potável para a humanidade (SODRÉ, 1980; FOGAÇA *et al.*, 2017; GRILO *et al.*, 2017; GUEVARA *et al.*, 2019).

Não é de se estranhar, portanto, que a maior parte da população está inserida a no máximo, 100 quilômetros dos oceanos e que os principais centros econômicos estão contidos nas zonas costeiras (MARINHA DO BRASIL, 2012), fazendo com que na sociedade atual, estas regiões sejam as de maior importância para as nações.

A partir do século XX, com a evolução tecnológica, mostraram-se outras vertentes na exploração das zonas costeiras, corroborando que os oceanos são uma importante fonte de riqueza e matéria-prima, consagrando ainda mais o espaço marítimo como fundamental para a economia internacional (SODRÉ, 1980). Esse cenário é encontrado no Brasil, onde 70% do Produto Interno Bruto (PIB) está concentrado no litoral, seja na forma de turismo, indústria, agricultura, pesca, exploração mineral, biotecnologia e energia (ABREU, 2015).

Em decorrência desse extrativismo e exploração dos oceanos, as áreas costeiras estão entre as mais ameaçadas de poluição e declínio do planeta, principalmente devido à pressão sofrida sobre sua integridade, equilíbrio ambiental, conflitos de uso (ABREU, 2015) e do falso pensamento de que a capacidade do mesmo de receber dejetos e resíduos era ilimitada (ASLAN *et al.*, 2017). Essa poluição, dependendo da origem de introdução no meio ambiente pode ser considerada pontual ou não pontual.

Fontes Pontuais de Poluição (FPP) são aquelas onde o poluente atinge o corpo d'água de forma concentrada no espaço, com localização definida e frequentemente com regime contínuo de produção, assim, podemos destacar como as principais FPP os efluentes domésticos e as descargas industriais (LIMA *et al.*, 2016). Por outro lado, Fontes Não Pontuais de Poluição (FNPP) são aquelas produzidas por fontes difusas, não sendo originada de apenas uma fonte, mas sim de mistura de diferentes poluentes (tais como agrotóxicos, resíduos de recreação, comércio, derrames acidentais e intencionas) (CARPENTER *et al.*, 1998; FLORY & ALBENDER, 2005; LIMA *et al.*, 2016).

Logo, os oceanos recebem tanto FPP quanto FNPP, resultando então em poluição por compostos antropogênicos, que são as substâncias produzidas pelo homem e que entram no meio ambiente a partir da atividade humana (COSTA, 2012). Como resultado dessas práticas são originados milhões de toneladas de produtos químicos sintéticos, nutrientes, vários compostos e substâncias antropogênicas que se dirigem para lagos, rios e oceanos a cada ano, resultando uma série de efeitos adversos no metabolismo de organismos não alvos, bem como a acumulação e persistência na cadeia alimentar (DAVIES & MCKIE, 1987; BAYNI & MARQUES, 2003). Os impactos causados por essas substâncias que entram nos oceanos não são facilmente estimados, mas sabe-se que a toxicidade é aumentada se o composto é persistente e móvel no ambiente (ROMANO, 2007).

Desta maneira, no cenário atual observam-se efeitos adversos causados pela antropização, que incluem a perda de importantes habitats como manguezais e recifes de corais, menor qualidade da água costeira e subterrânea, proliferação de algas, diminuição da disponibilidade de oxigênio, declínio da pesca comercial e artesanal, diminuição da fauna e de substâncias químicas vitais pra esse ambiente, aumento de inundações e erosão costeira (ABREU, 2015) resultando em pressões sobre os ecossistemas marinhos (CHAMP, 2000; TURNER, 2010).

Os aportes tóxicos mais comuns em áreas costeiras são os de origem orgânica, oriundos de despejos de esgotos e constituídos basicamente de matéria orgânica (ASLAN *et al.*, 2017). Como a matéria orgânica é composta principalmente de nitrogênio e fósforo, ocorre o crescimento desordenado de microalgas que culminam na eutrofização do ambiente em virtude do desequilíbrio entre os processos de fotossíntese e decomposição (BARRETO *et al.*, 2013; ASLAN *et al.*, 2017). Isto acarreta o aparecimento de espécies indesejáveis como as cianobactérias que são potencialmente tóxicas, aumento da concentração iônica, aumento da condutividade elétrica, diminuição da diversidade de espécies de fitoplâncton e zooplâncton e, diminuição do oxigênio dissolvido na água (CETESB, 2017).

Outrossim, além de toda a matéria orgânica encontrada nos resíduos de origem doméstica, agrícola e na drenagem urbana, diversos tipos de contaminantes podem ser observados, em particular aqueles originados de resíduos industriais, como hidrocarbonetos e substâncias químicas inorgânicas (ASLAN *et al.*, 2017).

Os hidrocarbonetos, especialmente os derivados do petróleo, afetam todos os organismos invertebrados e vertebrados da biota marinha, podendo levar a permanentes mudanças na estrutura biológica dos mares e oceanos (MIRONOV, 1968). Segundo Crapez (2001) essa substância tem considerável efeito nas propriedades estruturais e funcionais das membranas celulares, agindo concomitantemente com as estruturas hidrofóbicas da membrana celular (*i.e.*, ácidos graxos, fosfolipídeos e a parte central das proteínas integrais) ocasionando a perda da integridade e a característica de barreira seletiva da membrana, tornando-a permeável a prótons e outros íons. A toxicidade dos hidrocarbonetos varia de 50-150 mg/L<sup>-1</sup> com lesão celular ocorrendo de 24-96 horas após exposição inicial, assim, como consequência da perda de seletividade, causa nos organismos uma disfunção no transporte de solutos, liberação dos resíduos produzidos no metabolismo e na manutenção do controle do pH intracelular (SIKKEMA *et al.*, 1994; SIKKEMA *et al.*, 1995; CRAPEZ, 2001).

Grande parte dos bens de consumo que fornecem aos humanos as tecnologias atuais são proporcionadas mediante a manipulação de produtos químicos, que precisam ser retirados de alguma fonte natural ou ser sintetizados em laboratório. Em decorrência deste fato, esses produtos são armazenados, transportados, processados, transformados e misturados a outros produtos (GREIF, 2006). Por serem resultados de ação antrópica, qualquer erro no processo, acidente e manipulação de elementos químicos podem introduzir

essas substâncias na natureza. As substâncias químicas inorgânicas mais tóxicas introduzidas nos oceanos são conhecidas como metais. Esses metais podem ser elementos essenciais, micro-contaminantes ambientais (metais pesados) ou ambos.

Os metais essenciais são aqueles (sódio, potássio, cálcio e magnésio) imprescindíveis para todos os organismos vivos, porém são sempre requisitados em baixas concentrações, pois podem causar efeitos colaterais (NAKATO & AVILA-CAMPOS, 2012). Os metais pesados, segundo esses autores, ao contrário de outros agentes tóxicos, não são sintetizados ou destruídos pelo homem, são altamente reativos e acumulativos. Os metais mistos são aqueles que são essenciais, porém, acumulativos. Assim, são observados que concentrações maiores do que as permitidas pela legislação são passíveis de intoxicar a biota marinha. Essa toxicidade oriunda de diversas atividades antrópicas são uns dos maiores agentes de contaminação das águas oceânicas (NAKATO & AVILA-CAMPOS, 2012; GREIF, 2006).

Outra importante fonte de substâncias químicas para os oceanos são os resíduos de agrotóxicos empregados na agricultura (JARDIM *et al.*, 2009). A toxicidade dos agrotóxicos é influenciada e potencializada dependendo de suas propriedades físico-químicas, da quantidade empregada, a frequência do uso, os métodos de aplicação, as características do ambiente – bióticas e abióticas – e as condições meteorológicas (BORSOI *et al.*, 2014). Ferreira *et al.* (2006) salientam que a crescente utilização dos agrotóxicos tem trazido diversos transtornos e modificações na biota, seja pela bioacumulação nos organismos ou seja pela contaminação dos ecossistemas. Assim, países como o Brasil que só em 2019 liberou o uso de mais 189 agrotóxicos, totalizando 382 produtos (em 2016 eram apenas 90 agrotóxicos legalizados e liberados para uso) (GREENPEACE, 2019; TOOGE, 2019) que por lixiviação, aplicação intencional, deriva ou contaminação dos solos e lençóis freáticos, são lançados ao mar diariamente (JARDIM *et al.*, 2009), podem gerar graves danos ao ecossistema. Agrotóxicos contendo organofosforados e carbamatos são apontados como causadores de morte, pois são acumulados principalmente no cérebro, gerando lesões no sistema nervoso; outros à base de organoclorados são persistentes no meio ambiente, lipofílicos e se acumulam em tecidos gordurosos de organismos vivos, interferindo no sistema endócrino e provocando o fracasso reprodutivo de alguns animais e até câncer (BORSOI *et al.*, 2014; FONSECA, 2018).

Além dos agrotóxicos com agente biocida à base de fósforo e cloro, há décadas vem

sendo utilizados biocidas à base de estanho (ALZIEU *et al.*, 1986; CASTRO, 2002; FERNANDEZ, 2006). Os Compostos Organoestânicos (COEs), especificamente o Tributilestanho (TBT), passou a ser utilizado como estabilizador de cloreto de polivinila (PVC) contra a ação da luz e do calor (COSTA, 2012). Porém, na década de 50, estudos feitos pelo Instituto de Química em Utrecht na Alemanha, descobriram a finalidade biocida deste composto, os quais começaram a ser empregados como pesticidas, pois verificou-se que os COEs agiam sobre fungos e bactérias, organismos marinhos, vermes parasitas, caramujos aquáticos e insetos (GODOI *et al.*, 2003). As propriedades desses COEs foram então descobertas e passaram a ser exploradas comercialmente (COSTA, 2012). No final da década de 60, os COEs, especialmente o TBT e TPT (Trifenilestanho) passaram a ser os componentes ativos em tintas biocidas de ação anti-incrustante, substituindo as tintas à base de cobre anteriormente utilizadas e sendo extensivamente aplicadas em estruturas *off-shore*, dutos, estruturas para aquicultura, além de embarcações (SCHATZBERG, 1987; GARAVENTA *et al.*, 2006). Goldberg (1986) e Stewart *et al.* (1992), afirmam que o TBT é a substância mais tóxica produzida pelo homem e deliberadamente introduzida no meio ambiente.

Como consequências da ação do TBT, são descritos quatro fenômenos: *balling*, descrito em bivalves, onde ocorre formação de septos entre as camadas de carbonato de cálcio, conferindo aspecto arredondado nas valvas que acarretam na diminuição do valor de mercado destes animais (ALZIEU *et al.*, 1986; RUIZ *et al.*, 1996; CASTRO, 2002); *intersex*, a disrupção endócrina que consiste na transformação gradual do órgão reprodutivo palial feminino por uma próstata, bem como o desenvolvimento de pênis e ducto espermático (BAUER *et al.*, 1995); *imposex*, síndrome caracterizada pela formação de um pênis e vaso deferente não funcional em indivíduos do sexo feminino (SMITH, 1981), ocorrendo em concentrações abaixo de  $1\text{ng/L}^{-1}$  (AXIAK *et al.*, 1995), utilizado assim como biomarcador para detectar diferentes níveis de concentração de TBT (SMITH, 1996), sendo considerado a resposta biológica mais sensível a este contaminante (GIBBS & BRYAN, 1994 e 1996); por fim, *ovotestis*, na qual ocorre a masculinização do ovário, onde o tecido gonadal da fêmea desenvolve tecido testicular, sem formação de pênis (HORIGUCHI *et al.*, 2000). Devido à sua toxicidade, tintas anti-incrustantes à base de TBT foram banidos mundialmente em 2008 pela Organização Internacional Marítima (IMO, 2008). No Brasil

foram normatizados pelo CONAMA (2005), entretanto ainda são produzidas, comercializadas e usadas tintas anti-incrustantes à base de TBT aqui e em países não signatários do acordo (CASTRO, 2002).

Outra fonte de liberação de substâncias químicas são os fármacos ou nanofármacos. Com as populações humanas vivendo tão perto da costa, é crescente a preocupação com aumento dos insumos medicamentosos humanos e seus metabólitos nos ambientes costeiros (GAW *et al.*, 2014). As fontes básicas de fármacos são os esgotos (domiciliares, hospitalares e das indústrias farmacêuticas), medicamentos usados na aquicultura, criação de animais, na horticultura e depósito de lixo (GAW *et al.*, 2014). Uma vez descarregados em ambientes aquáticos, os produtos farmacêuticos e seus metabólitos podem sofrer transformação biótica e abiótica (degradação), serem adsorvidos a material particulado em suspensão ou sedimentos e podem até acumular-se nos tecidos de organismos aquáticos (RAMIREZ *et al.*, 2009). A maior frequência de notificação para o ambiente marinho são antibióticos, analgésicos, antidepressivos e anti-hipertensivos (GAW *et al.*, 2014). Os efeitos na vida marinha vão desde o plâncton até vertebrados e incluem: à nível celular, como atividade da catalase, sensibilidade da membrana plasmática, atividade da acetilcolinesterase; na reprodução, prejudicando o desenvolvimento embrionário, tamanho e peso de juvenis, taxa de reprodução e espermotoxicidade; no metabolismo, afetando a metamorfose, a excreção e o consumo de energia; na locomoção e no comportamento; na resposta de estresse; na biodiversidade e composição da comunidade; na dinâmica de nutrientes; na estrutura do habitat; e na dinâmica de doenças (PRICHARD & GRANEK, 2016).

Recentemente houve crescente detecção de prejuízos na biota marinha causados por Microplásticos (MPs). Os MPs são comumente definidos como partículas com tamanho inferior a 05 mm e originados de duas fontes principais: podem ser derivados a partir da degradação e quebra de detritos plásticos maiores, ou podem ser produzidos e introduzidos diretamente em ambientes aquáticos com tamanho microscópico (ANDRADY, 2011).

As principais consequências dos microplásticos no ambiente marinho estão relacionadas ao sistema digestivo, uma vez que o consumo destes materiais por organismos vivos podem provocar o bloqueio do trato intestinal ocasionando úlceras no estômago, redução na absorção de nutrientes vitais para a manutenção da vida dos organismos marinhos, além de alterar a reprodução dos animais (BUGONI *et al.*, 2001; DERRAIK,

2002; COLABUONO *et al.*, 2009; GREGORY, 2009). Além desses prejuízos relacionados ao consumo de MPs, diferentes compostos e elementos químicos podem se associar a esses, aumentando assim seu potencial tóxico no ambiente (LIU *et al.*, 2016). MPs podem também absorver metais (ROCHMAN *et al.*, 2014; BRENNECKE *et al.*, 2016).

Assim, para o monitoramento desses diferentes tipos de poluentes, técnicas químicas, físicas e biológicas podem ser empregadas. As técnicas físico-químicas são mais precisas no sentido de quantificar os poluentes ou os parâmetros abióticos, entretanto, estudos utilizando química e física são caros e demorados, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, que ainda não possuem as condições necessárias para que essas análises aconteçam de forma rotineira. Dessa forma, os estudos biológicos são os mais indicados, uma vez que, podem delimitar dois tipos de informações sobre os poluentes ao nível de parâmetros bióticos, indicando organismos bioindicadores ou indicando organismos com funções biomarcadoras para a presença de poluentes no ambiente.

Organismos bioindicadores são aquelas espécies, grupos taxonômicos ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e condição são indicativos biológicos de certa condição ambiental (MARQUES *et al.*, 2016). Cada espécie bioindicadora responde às alterações na qualidade da água de acordo com seu tempo e com a sua especificidade com relação às mudanças, assim, por exemplo, se o estudo tem por meta monitorar os níveis de contaminantes na água, o mais indicado é escolher uma espécie que seja capaz de bioacumular os elementos químicos em questão (MARQUES *et al.*, 2016). Esses autores ainda completam afirmando que “espécies capazes de refletir com segurança os níveis ambientais de contaminantes em seus próprios tecidos, são conhecidas como biomonitoras” (MARQUES *et al.*, 2016, pág. 225). Todavia, biomarcadores são mais específicos, pois são alterações a nível molecular, celular, fisiológico ou comportamental que são expressados quando o organismo é exposto aos efeitos subletais dos contaminantes ou condições ambientais adversas, servindo portanto, como sinais de aviso prévio da degradação dos ecossistemas (MARQUES *et al.*, 2016).

Os bivalves, pertencentes ao Filo Mollusca, por serem em sua maioria organismos filtradores, são os invertebrados mais utilizados em biomonitoramentos ao redor do mundo (FERREIRA *et al.*, 2013). São inteiramente aquáticos, em geral com simetria bilateral e corpo comprimido lateralmente por uma concha externa formada por duas valvas (RIOS,

1994) unidas dorsalmente por um ligamento, geralmente são de sexos separados e sua fecundação ocorre livremente na água (HENRIQUES, 2004; GALVÃO *et al.*, 2006).

Os bivalves utilizam as brânquias para respirar e se alimentar, uma vez que filtram grandes volumes de água que as banham e onde ficam retidos o fitoplâncton, os microrganismos e as partículas orgânicas em suspensão (RAINBOW, 1995). Dentre essas partículas orgânicas estão associadas, em águas contaminadas, agentes patogênicos (por exemplo, bactérias, vírus e parasitas) e químicos (metais pesados, hidrocarbonetos, resíduos de pesticidas, TBT, entre outros) (MORAES, 2000). Desta maneira, a bioacumulação e biomarcação desses materiais nos animais reflete as características ambientais do corpo d'água onde o animal está inserido (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2013), uma vez que pela quantidade de água filtrada ao dia, esses animais podem acumular em seus tecidos 1.000 à 10.000 vezes mais contaminantes inorgânicos do que aquelas encontradas nas FPP (UNEP, 2004).

Todas essas características peculiares dos bivalves que os tornam imprescindíveis nos monitoramentos ambientais, estão reunidas em Mytilidae, a família dos bivalves mais abundante e com a maior riqueza. Os mitilídeos, conhecidos popularmente como mexilhões, ocorrem em costões rochosos e estuários, sendo fonte de alimentação das populações viventes na região litorânea (FERREIRA *et al.*, 2013). Dos mitilídeos comestíveis e de importância comercial, destacam-se o gênero *Perna*, especialmente a espécie *Perna perna*, maior mitilídeo nativo brasileiro (KLAPPENBACH, 1965; FERREIRA *et al.*, 2013; PIERRI *et al.*, 2016) e distribuído na maior parte da costa do país (RIOS, 1994 e 2009), na Venezuela e Uruguai e na África (PIERRI *et al.*, 2016).

O *P. perna*, também conhecido como mexilhão marrom, pode atingir até 182 milímetros (MAGALHÃES, 1998). Sua filtração ocorre continuamente, com exceção nos momentos que são expostos ao ar ou quando submetidos a condições ambientais desfavoráveis, como a baixa salinidade (MARQUES & LIMA-PEREIRA, 1998). Não há dimorfismo sexual externo, mas no período reprodutivo, machos apresentam coloração gonadal branco leitoso e as fêmeas, gônadas alaranjadas/vermelho tijolo (HENRIQUES, 2004).

A fecundação ocorre na água, os gametas são liberados por estímulos físico-químicos e climáticos, especialmente a concentração de nutrientes e variação repentina da

temperatura ou salinidade (LUNETTA, 1969; HENRIQUES, 2004). O hermafroditismo já foi descrito por alguns autores (GALVÃO *et al.*, 2006; MARCHIORI, 2013). A larva da espécie é planctônica e sua fixação ocorre em substratos como talos da alga *Ulva fasciata* (fixação primária), costão rochoso ou outra superfície dura (fixação definitiva), onde formam densas populações (*i.e.*, bancos naturais) que podem se localizar em áreas expostas a ação das ondas ou áreas abrigadas (FREITAS, 1997). Porém, a reprodução pode ser prejudicada pela presença de patógenos, especialmente trematódeos Bucephalinae, que parasitam o sistema reprodutor, provocando a esterilidade e enfraquecimento, podendo até ocasionar a morte dos animais (HENRIQUES, 2004). Além desse parasito, ainda podem ser encontrados poliquetas (Annelida) e caranguejos (Crustacea), que perfuram as conchas e danificam o manto, respectivamente (MARQUES & LIMA-PEREIRA, 1998).

Devido à sua ampla distribuição na costa brasileira “é a espécie amplamente utilizada como indicadora do grau de poluição marinha” (FERREIRA *et al.*, 2013, pág. 03). Para tal, diferentes tipos de metodologia vem sendo utilizadas a fim de detectar a bioacumulação de contaminantes nestes animais (MALAGRINO, 2003; MAIA *et al.*, 2006; GALVÃO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2013; CAMARGO, 2018), entretanto, poucos estudos utilizaram técnicas histomorfológicas com esse propósito (LIMA *et al.*, 2001; HENRIQUES, 2004, GARCIA & MAGALHÃES, 2008).

Procedimentos histotécnicos incluem análises citoquímicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas, dependendo do objetivo que se tem com os tecidos a serem analisados (CAPUTO *et al.*, 2012). A importância dessas análises se deve ao fato de que grandes mudanças causadas pelos poluentes ocorrem nos tecidos celulares, assim, para visualização das estruturas teciduais e os constituintes da matriz extracelular, esta técnica é necessária.

Tendo ciência de que o ecossistema aquático é considerado o mais susceptível à contaminação (BERTOLETTI, 1990) por diferentes compostos antropogênicos, que os principais detectores de poluição são os moluscos bivalves (especialmente *P. perna* no Brasil), aliado ao fato da espécie *P. perna* ser amplamente usada para fins alimentícios e possuir alto valor proteico e econômico, e que a detecção dos efeitos tóxicos dos poluentes pode se dar ao nível tecidual, justifica-se a realização desse estudo.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C.T. Brazilian Coastal and marine protected areas importance, current status and recommendations. Nippon Foundation of Japan Fellowship Programme, p. 1-126, 2015.
- ALZIEU, C.; SANJUAN, J.; DELTRIEL, J.P.; BOREL, M. Tin contamination in Arcachon bay: Effects on oyster shell anomalies. *Mar. Pollut. Bull.*, v, 17, 494–498, 1986.
- ANDRADY, A.L. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 62, p. 1596-1605, 2011.
- ARAÚJO, A.A.B. Obtenção de sementes de mexilhão *Perna perna* (Bivalvia – Mytilidae) em estruturas manufaturadas, na Ponta do Papagaio, Palhoça – Santa Catarina. Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 1994.
- ASLAN, J.F.; PINTO, A.E.M.; OLIVEIRA, M.M. Poluição do meio ambiente marinho: um breve panorama dos princípios, instrumentos jurídicos e legislação brasileira. *Revista Internacional de Direito Ambiental e Políticas públicas*, n. 9, p. 175-186, 2017.
- AXIAK V.; VELLA A.J.; MICALLEF D.; CHIRCOP P.; MINTOFF B. Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Mar. Biol.*, v. 121, n.685 - 691, 1995.
- BAINY, A.C.; MARQUES, M.R.F. Global analysis of biomarker responses in aquatic organisms exposed to contaminants. *Comment. on Toxicol.*, v. 9, p. 271-278, 2003.
- BARREIRA, C.A.R.; ARAÚJO, M.L.R. Ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca* 31, v.1, p. 9-20, 2005.
- BARRETO, L.V.; BARROS, F.M.; BONOMO, P.; ROCHA, F.A.; AMORIM, J.S. Eutrofização em rios brasileiros. *Enciclopédia biosfera*, v. 9, p. 2165-2179, 2013.
- BAUER, B.; FIORONI, P.; IDE, I.; LIEBE, S.; OEHLMANN, J.; STROBEN, E.; WATERMANN, B. TBT effects on the female genital system of *Littorina littorea*: a possible indicator for tributyltin pollution. *Hydrobiology*. v. 309, 15-27, 1995.
- BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. *Revista Ciência e Cultura*, v. 43, n. 3/4, p. 271-277, 1990.
- BIRCHENOUGH, A.C.; BARNES, N.; EVANS, S.M.; HINZ, H.; KRONKE, I.; MOSS, C. A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods. *Mar. Pol. Bull.*, v. 44, p. 534-543, 2002.
- BORSOI, A.; SANTOS, P.R.R.; TAFFAREL, L.E.; JÚNIOR, A.C.G. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. *Acta Iguazus*. v. 3, n. 1, p. 86-100, 2014.
- BRENNECKE, D.; DUARTE, B.; PAIVA, F.; CAÇADOR, I.; CANNING-CLODE, J. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, v. 178, p. 189–195, 2016.
- BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M.V. Marine debris and human impacts on sea turtles in Southern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.*, v.42, n.12, p.1330-1334, 2001.

CAMARGO, J.B.D.A. Efeitos biológicos da contaminação sobre bivalves filtradores de regiões do litoral de São Paulo, com ênfase na Baixada Santistas. Dissertação apresentada ao Departamento de Oceanografia Biológica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2018.

CAPUTO, E.L.; SILVA, M.C.; ROMBALDI, A.J. Comparação da frequência cardíaca máxima obtida por diferentes métodos. Rev. Educ. Fis/UEM, v. 23, p. 277-284, 2012.

CARPENTER, S.R.; CARACO, N.F.; CORRELL, R.W.; HOWARTH, R.W.; SHARPLEY, A.N.; SMITH, V.H. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. Ecol. Applicat., v. 8, n. 3, p. 559-568, 1998.

CASTRO, I.B. Imposex em *Thais haemastoma* no estado do Ceará. Monografia de Especialização. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2002.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Matéria orgânica e nutrientes. 2017. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/alteracoes-fisicas-e-quimicas/materia-organica-e-nutrientes/>. Acesso em: 24 de agosto de 2019.

CHAMP, M.A. A Review of Organotin Regulatory Strategies, Pending Actions, Related Costs and Benefits. Sci. Tot. Environ., v.258, p. 21-71, 2000.

CHONCHEUNCHOB, P. Handing culture of the green mussel (*Mytilus smaragdinus*) (Chemnitz) in Thailand. Manila: ICLARM, p. 102, 1980.

COCHÔA, A.R.; MAGALHÃES, A.R.M. Perdas de sementes de mexilhões *Perna perna* (L., 1758), cultivados na baía norte – Ilha de Santa Catarina/SC. Boletim do Instituto de Pesca, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2008.

COE, W.R. Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. Quart. Jour. Rev. BioI., n. 18, v. 2, p. 154-164, 1943.

COLABUONO, F.I.; BARQUETE, V.; DOMINGUES, B.S.; MONTONE, R.C. Plastic ingestion by Procellariiformes in southern Brazil. Mar. Pollut. Bull., v. 58, p. 93-96, 2009.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução 357/2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 20 de janeiro de 2019.

CORTE, G.N. An attempt to extend the habitat harshness hypothesis to tidal flats: A case study of *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae) reproductive biology. Estuar. Coast. Shel. Sci., v. 150, p. 136-141, 2014.

COSTA, M.B. Avaliação da contaminação por compostos organoestânicos (COEs) no litoral do Espírito Santo por meio de indicadores biológicos, imposex e intersex: uma análise espacial e temporal. Tese apresentado no Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2012.

COSTA, M.B.; FERNANDEZ, M.A.S.; BARBIERO, D.C.; MELO, F.T.V.; OTEGUI, M.B.P.; FERREIRA, B.S. First record imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. Brazil. Journ. Oceanog., v. 56, p. 145-148, 2008.

COSTA, M.B.; ZAMPROGNO, G.C.; OTEGUI, M.B.P.; DE MORAIS, L.; PEDRUZZI, F.C.; DALBEM, G.B.; SILVA, D.A.; RESENDE, A.C.B. A temporal and spatial monitoring of organotins

pollution in harborside region of Brazil by imposex and ecological quality ratio using *Leucozonia nassa*. Environ. Monit. Assess., v. 189, n. 650, p. 1-16, 2017.

COSTA, M.B.; ZAMPROGNO, G.C.; PEDRUZZI, F.C.; DALBEM, G.B.; TOGNELLA, M.M.P. Assessing the Continuous Impact of Tributyltin from Antifouling Paints in a Brazilian Mangrove Area Using Intersex in *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) as Biomarker. Inter. Journ. Oceanog., v. 2013, p. 1-8, 2013.

CRAPEZ, M. A. C. Efeitos de Hidrocarbonetos de Petróleo Na Biotá Marinha. In: Efeitos dos Poluentes em Organismos Marinhos. (Moraes, R.; Crapez, M. A. C.; Pfeiffer, W.; Farina, M.; Bainy, A.; e Teixeira, V. Editores). São Paulo: Vilipress, p. 255-270, 2001.

DAMINELLI, A.; DAMINELLI, D.S.C. Origens da vida. Estudos avançados, v. 21, n. 59, p. 263-284, 2007.

DAVIES, I.M.; MCKIE, J.C. Accumulation of total tin and tributyltin in muscle tissue of farmed Atlantic salmon. Mar. Pollut. Bull., v. 18, n. 7, p. 405-407, 1987.

DERRAIK, J.G.B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar. Pollut. Bull., v. 44, p. 842–852, 2002.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.S.F. Moluscos bivalves: Organismos Bioindicadores da Qualidade Microbiológica das Águas: Uma Revisão. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 2, n. 2, p. 18– 31, 2008.

EVANS, S.M.; HUTTON, A.; KENDALL, M.A.; SAMOSIR, A.M. Recovery in populations of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) suffering from imposex. Mar. Pollut. Bull., v.22, p. 331–333, 1991.

FERNANDEZ, M.A.; LIMAVERDE, A.M.; SCOFIELD, A.L.; WEGENER, A.L.R. Preliminary evaluation of human health risks from ingestion of Organotin contaminated seafood in Brazil. Brazil. Journ. Oceanog., v.53, n. 1-2, 2006.

FERREIRA, A.P.; CUNHA, C.L.N.; WERMELINGER, E.D.; SOUZA, M.B.; LENZI, M.F.; MESQUITA, C.M.; JORGE, L.C. Impactos de pesticidas na atividade microbiana do solo e sobre a saúde dos agricultores. Revista Baiana de Saúde Pública, Salvador, v. 32, n. 2, p. 309-321. 2006.

FERREIRA, G.A.C.; FERREIRA, G.L. Dinâmica urbano regional do Espírito Santo: uma trajetória marcada pela intensificação das relações capitalistas globalizadas. 2017. Disponível em: <https://online.unisc.br/acadnet/anais/index.php/sidr/article/download/16816/4379>. Acesso em: 14 de outubro de 2019.

FERREIRA, M.S.; MÁRSICO, E.T.; C.A.C.J.; JÚNIOR, A.M.N.M.; MANO, S.B.; CLEMENTE, S.C.S. Contaminação por metais traço em mexilhões *Perna perna* da costa brasileira. Cienc. Rura., v. 43, n. 6, p. 1012-1020, 2013.

FLORY, J.; ALBENDER, M. Marinas: Best management practices and water quality: Prepared for GA DNR - Coastal Resources Division. Georgia Coastal Research Council, p. 58, 2005.

FOGAÇA, F.H.S.; FURTADO, A.A.L.; SILVA, C.A.; TAVARES-DIAS, M.; KEMENES, A.; ROUTLEDGE, E.A.B. Vida na água: conservação e uso responsável dos mares, oceanos e ambientes costeiros. 2017. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1096294/1/cap.1.pdf>. Acesso em: 29 de dezembro de 2019.

FONSECA, B. Agrotóxicos intoxicaram 26.000 brasileiros em dez anos. 2018. Disponível em: [https://brasil.elpais.com/brasil/2018/08/11/politica/1533993943\\_113452.html](https://brasil.elpais.com/brasil/2018/08/11/politica/1533993943_113452.html). Acesso em: 31 de janeiro de 2020.

FREITAS, M. Incrustações biológicas no mexilhão *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia), cultivado na Ilha de Ratoes, SC: efeito da exposição ao ar. Dissertação apresentado ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade de Santa Catarina. Santa Catarina, 1997.

GALVÃO, M.S.N.; HENRIQUES, M.B.; PEREIRA, O.M.; MARQUES, H.L.A. Ciclo reprodutivo e infestação parasitária de mexilhões *Perna perna* (LINNAEUS, 1758). B. Inst. Pesca, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 59-71, 2006.

GALVÃO, P.M.A.; REBELO, M.F.; GUIMARÃES, J.R.D.; TORRES, J.P.M.MALM, O. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração dos ambientes marinhos. Braz. J. Aquat. Sci. Technol., v. 13, n. 2, p. 59-66, 2009.

GARAVENTA, F.; FAIMALI, M.; TERLIZZI, A. Imposex in pre-pollution times: is TBT to blame? Mar. Pollut. Bull., v. 52, 696-718, 2006.

GARCIA, R.; MAGALHÃES, A.R.M. Protocolo de identificação e quantificação de bucefalose (enfermidade laranja) em mexilhões *Perna perna*. B. Inst. Pesca, v. 34, n. 1, p. 11-19, 2008.

GAW, S.; THOMAS, K.V.; HUTCHINSON, T.H. Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., v. 9, 2014.

GIBBS, P.E. Oviduct malformation as a sterilising effect of tributyltin (TBT)-induced imposex in *Ocenebrae rinacea* (Gastropod: Muricidae). Malac. Soc. Lond., v. 62, p. 403-413, 1996.

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W. Biomonitoring of tributyltin pollution using the imposex response of neogastropod mollusks. In: Kramer, K.J.M. (Ed.), Biomonitoring of Coastal Waters. Estuar., p. 205-226, 1994.

GODOI, A.F.L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. Química Nova., v. 26, n. 5, 708-716, 2003.

GOLDBERG, E.D. TBT: an environmental dilemma. Environm: Sci. Pol. Sust. Develop., v.28, p. 17-44, 1986.

GREENPEACE. Capítulo Venenoso na História do Brasil. 2019. Disponível em <https://www.greenpeace.org/brasil/blog/capitulo-venenoso-na-historia-do-brasil/>. Acesso em: 31 de janeiro de 2020.

GREGORY, M.R. Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. Philos. Trans. Royal. Soc. B. Biol. Sci., v. 364, n. 1526, p.2013-3025, 2009.

GREIF, A. Family Structure, Institutions, and Growth: The Origins and Implications of Western Corporations. Sea Papers and Proceedings. v. 96, n. 2, 2006.

GRILO, C.; SALDANHA, F.; CALADO, G. Os valores dos oceanos. 2017. Disponível em: [https://content.gulbenkian.pt/wp-content/uploads/2017/10/25113516/GulbenkianBrochura\\_ValorOceanos\\_PTweb.pdf](https://content.gulbenkian.pt/wp-content/uploads/2017/10/25113516/GulbenkianBrochura_ValorOceanos_PTweb.pdf). Acesso em: 29 de dezembro de 2019.

GUEVARA, A.J.H.; SOUZA, R.O.C.; AMBROGI, V.B. Sustentabilidade. 2019. Disponível em: <https://www.pucsp.br/sites/default/files/download/eventos/bisus/13-vida-na-agua.pdf>. Acesso em: 29 de dezembro de 2019.

HENRIQUES, M.B. Resistência do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) proveniente de bancos naturais da baixada santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2004.

HORIGUCHI, T.; TAKIGUCHI, N.; CHO, H.S.; KOJIMA, M.; KAYA, M.; SHIRAISHI, M.; MORITA, M.; HIROSE, H.; SHIMIZU, M. Ovo-testis and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, *Haliotis madaka*: possible linkage with organotin contamination in a site of population decline. Mar. Environ. Resear., v. 50, p. 223-229, 2000.

INCAPER. Boletim climatológico. 2020. Disponível em: <https://meteorologia.incaper.es.gov.br/boletim-climatologico>. Acesso em: 20 de março de 2020.

IMO - INTERNATIONAL MARINE ORGANIZATION. IMO: 60 Years in the Service of Shipping. IMONEWS. n. 3, p. 26-48. 2008.

JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J.A.; QUEIROZ, QUEIROZ, S.C.N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. Química Nova, v. 32, n. 4, 2009.

JESUS, H.C.; COSTA, E.A.; MENDONÇA, A.S.F.; ZANDONADE, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. Química Nova, v. 27, n. 3, p. 378-386, 2004.

KENCHINGTON, E.; MACDONALD, B.; CAO, L.; TSAGKARAKIS, D.; ZOUROS, E. Genetics of mother-dependent sex ratio in blue mussels (*Mytilus* spp.) and implications for doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. Genetics, v. 161, n. 4, p. 1579–1588, 2002.

KLAPPENBACH, M.A. Lista preliminar de los mytilidae brasilenos con claves para su determinación y notas sobre su distribución. An. Acad. Bras. Ciênc., v. 37 (supl.), p. 327-352, 1965.

KRAMPAH, E. A.; YANKSON, K.; BLAY, J. Aspects of reproduction of the brown mussel *Perna perna* at the Iture rocky beach near Cape Coast, Ghana. African Journal of Marine Science, v. 38, n. 4, p. 503-5012, 2016.

LEE, S.Y. The reproductive cycle and sexuality of the green mussel *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilacea) in Victoria Harbour, Hong Kong. Journal of Molluscan Studies v. 54, p. 317–323, 1988.

LENZ, T.M. Biologia reprodutiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828)(Bivalvia: Ostreidae) como subsídio à implantação de ostreicultura na Baía de Camamu (BA). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Aquáticos Tropicais – Ecologia, da Universidade Estadual de Santa Cruz. Bahia, 2008.

LIMA, F.C.; ABREU, M.G.; MESQUITA, E.F.M. Monitoramento histopatológico de mexilhão *Perna perna* da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 53, n. 2, p. 1-5, 2001.

LIMA, R.N.S.; RIBEIRO, C.B.M.; BARBOSA, C.C.F.; FILHO, O.C.R. Estudo da poluição pontual e difusa na bacia de contribuição do reservatório da usina hidrelétrica de Funil utilizando modelagem espacialmente distribuída em Sistema de Informação Geográfica. Rio de Janeiro: Revista Engenharia Sanitária Ambiental, v. 21, n. 1, p. 139-150, 2016.

LIU, L.; FOKKINK, R.; KOELMANS, A.A. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to

polystyrene nanoplastic, Environ. Toxicol. Chem., v. 35, p. 1650-1655, 2016.

LUNETTA, J.E. Fisiologia da reprodução de mexilhões (*Mytilus perna*) (Mollusca: Lamellibranchia). Bol. Fac. Ciên. Letr. Universidade de São Paulo, 324. Zool. Biol. Mar., n. 26, p. 33-111, 1969.

MAGALHÃES, A.R.M. Efeito da parasitose por Trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição de mexilhões *Perna perna* (L.). Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Geral do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1998.

MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F.; CASAS, M.G. Ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Mytilidae) na região do Pântano do Sul – Ilha de Santa Catarina, SC. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, São Paulo, 1987. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Malacologia, p.113-116, 1987.

MAIA, C.B.; ALMEIDA, A.C.M.; MOREIRA, F.R. Avaliação do teor de chumbo em mexilhões da espécie *Perna perna* na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 1, n. 2, p. 195-198, 2006.

MALAGRINO, W. Bioacumulação e eliminação de mercúrio ( $^{203}\text{Hg}$ ) no mexilhão (*Perna perna*, Linné, 1758). Modelo cinético para avaliar o risco de ingestão no homem. Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 98, 2003.

MARCHIORI, N.C. Oviposição, eclosão e desenvolvimento de *Aphnoblattella mastigatus* (Suriano, 1986) (Platyhelminthes, Monogenea), parasito de *Rhombia quelen*, e sua relação com a temperatura e salinidade da água. Tese apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

MARINHA DO BRASIL. Preservação do meio ambiente marinho: principais preocupações dos navegantes. 2012 Disponível em: <http://www.redebim.dphdm.mar.mil.br/vinculos/000007/000007f4.pdf>. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

MARQUES, H.L.A.; LIMA-PEREIRA, R.T. Mexilhões: Biologia e Criação. Bol. Téc. Inst. Pesca, São Paulo, v. 12, p. 1-31, 1998.

MARQUES, L.A.; SILBERBERG, C.; ABRANTES, D.P.; MACHADO, L.F.; MARANGONI, L.F.B. Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, p. 360, 2016.

MESQUITA, E.F.M.; ABREU, M.G.; LIMA, F.C. Ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus) (Mollusca, Bivalvia) da Lagoa de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. Revta. Bras. Zool., n. 18, v. 2, p. 631-636, 2001.

MIRONOV, O.G. Hydrocarbon pollution of the sea and its influence on marine organisms. Helgoländer wiss. Meeresunters, v. 17, p. 335-339, 1968.

MORAES, D.S.L. Avaliação dos potenciais tóxico, citotóxico e genotóxico de águas ambientais do município de Corumbá, MS, em raízes de *Allium cepa*. Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2000.

MORALES, J.C. Acuicultura Marina Animal. Madri: Mundi-Prensa, p. 423, 1983.

MORSAN, E.M.; KROECK, M.A. Reproductive cycle of purple clam, *Amiantis purpurata* (Bivalvia: Veneridae) in northern Patagonia (Argentina). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 85, p. 367-373, 2005.

NAKATO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J. Resistance to heavy metals of intestinal species from human and animals origins. *In: 11th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas*, 2012, San Francisco, California. *Anaerobe*, v. 99, n. 3, 2012.

NATIONAL GEOGRAPHIC. Tudo o que você precisa saber sobre os oceanos. 2018. Disponível em: <https://www.nationalgeographicbrasil.com/perpetual-planet/2018/06/tudo-o-que-voce-precisa-saber-sobre-os-oceanos>. Acesso em: 20 de agosto de 2019.

ORTIZ, L.C. Resíduos sólidos em praias do Espírito santo sob diferentes regimes de uso. Monografia apresentada ao Departamento de Oceanografia da Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2010.

OTEGUI, M.B.P.; ZAMPROGNO, G.C.; FRANÇA, M.A.; DAROS, B.N.; ALBINO, J.; COSTA, M.B. Imposex response in shell sizes of intertidal snails in multiple environments. *Journal of Sea Research*, v. 147, p. 10-18, 2019.

PAVANI, F. Determinação da direção e da taxa de transporte longitudinal no arco praiado compreendido entre a praia da Ponta da Fruta, Vila Velha e Setiba, Guarapari – ES. Monografia apresentada ao Departamento de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2006.

PIERRI, B.S.; FOSSARI, T.D.; MAGALHÃES, A.R.M. O mexilhão *Perna perna* no Brasil: nativo ou exótico? *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 68, n. 2, p. 404-414, 2016.

PODRATZ, P.L.; MERLO, O.; SENA, G.C.; BONOMO, M.M.; COSTA, M.B.; ZAMPROGNO, G.C.; BRANDÃO, P.A.; CARNEIRO, M.T.; MIQUEL, E.C. MIRANDA-ALVES, L.; SILVA, I.V.; GRACELI, J.B. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. *Reprod. Toxicol.* n. 57, p. 29-42, 2015.

PRICHARD, E.; GRANEK, E.F. Effects of pharmaceuticals and personal care products on marine organisms: from single-species studies to an ecosystem-based approach. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, v. 23, n. 22, p. 22365-22384, 2016.

RAINBOW, P.S. Physiology, physicochemistry and metal uptake: a crustacean perspective. *Marine Pollution Bulletin*, v.31, n.1-3, p.55-59, 1995.

RAMIREZ, A.J.; BRAIN, R.A.; USENKO, S.; MOTTALEB, M.A.; O'DONNELL, J.G.; STAHL, L.L.; WATHEN, J.B.; SNYDER, B.D.; PITT, J.L.; PEREZ-HURTADO, P.; DOBBINS, L.L.; BROOKS, B.W.; CHAMBLISS, C.K. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 28, n. 12, p. 2587-97, 2009.

RIISGÅRD, H.U. On measurement of filtration rates in bivalves – The stony road to reliable data: review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series*, v. 211, p. 275-291, 2001.

RIOS, E.C. Compendium of Brazilian sea shells. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande. p. 668, 2009.

RIOS, E.C. Seashells of Brazil. Rio Grande: Editora da Fundação Universidade do Rio Grande, 492p, 1994.

ROCHMAN, C.M.; HENTSCHEL, B.T.; TEH, S.J. Long-Term Sorption of Metals Is Similar among

- Plastic Types: Implications for Plastic Debris in Aquatic Environments. *PLoS ONE* 9, e85433, 2014.
- ROMANO, J.A. Acute toxicity and sun-lethal effects of non-point source pollutants on invertebrates. Thesis of Doctorate. University Program in Integrated Toxicology in the Graduate School of Duke University, 2007.
- RUIZ, J. M.; BACHELET, G.; CAUMETTE, P.; DONARD, O F. X. Three Decades of Tributyltin in the Coastal Environment with Emphasis on Arcachon Bay, France. *Environmental Pollution*. v.93, n.2, p.195-203, 1996.
- SAAVEDRA, C.; REYERO, M.I.; ZOUROS, E. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics*, v. 145, p. 1073–1082, 1997.
- SCAPUCIN, C.; TALARICO, M.F.; MOURA, R. Boletim de inovação e sustentabilidade. 2018. Disponível em: <https://www.pucsp.br/sites/default/files/download/bisus2018-vol2-poluicao-dos-mares.pdf>. Acesso em: 15 de dezembro de 2019.
- SCHATZBERG, P. Organotins antifouling hull paints and the U.S. Navy – A historical perspective. *Proceedings, The Ocean – An International Workplace Conference*. Canadá. v. 9, p. 1324-1333, 1987.
- SIKKEMA J., WEBER F.J., HEIPIEPER H.J. & DE BONT J.A.M. Cellular toxicity of lipophilic compounds: Mechanisms, implications, and adaptations. *Biocat. Biotransform.*, v. 10, n. 1, p. 113-122, 1994.
- SIKKEMA, J.; DE BONT J.A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.*, v. 59, p. 201–222, 1995.
- SILVESTRI, M.F.; CORDEIRO, G.B.; COSTA, P.M.S. Parâmetros reprodutivos do mexilhão *Perna perna* (L. 1758) em fazendas marinhas na Ilha Grande (RJ). *Acta. Fish.*, v. 6, n. 1, p. 43-49, 2018.
- SMITH, B. S. Tributyltin compounds induced male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Llyanassa obsoleta*. *Journal of Applied Toxicology*, v. 1, n. 3, p. 141-144, 1981.
- SMITH, P. J. Selective Decline in Imposex levels in the *Dogwhelk* *Lepsiella scobina* following a ban on the use of TBT Antifoulants in New Zealand. *Marine Pollution Bulletin*. v. 32 (4), 362-365, 1996.
- SODRÉ, A.C.A. Defesa dos oceanos: Algumas considerações. São Paulo: Bolm. Inst. Oceanografia, n. 29, v. 2, p. 383, 1980.
- SOUZA, T.B.; SILVA, B.R.; PEREIRA, R.M.; ARIDE, P.H.R.; OLIVEIRA, A.T.; SOUZA, A.B.; LAVANDER, H.D.; POLESE, M.F.; KROHLING, W. Artificial selection and size at first sexual maturity of *Perna perna* mussels (Linnaeus, 1758) in southeastern Brazil. *Journal of Shellfish Research*, v. 38, n. 1, p. 63-69, 2019.
- STEWART, C.; DE MORA, S.J.; JONES, M.R.L.; MILLER, M.C. Imposex in New Zealand Neogastropods. *Marine Pollution Bulletin*. v. 24, n. 4, p. 204-209, 1992.
- TOOGE, R. Governo autoriza mais de 57 agrotóxicos: total de registros em 2019 chega a 382. 2019. Disponível em <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2019/10/03/governo-autoriza-mais-57-agrotoxicos-total-de-registros-em-2019-chega-a-382.ghtml>. Acesso em: 31 de janeiro de 2020.
- TURNER, A. Marine pollution from antifouling paint particles. *Marine Pollution Bulletin*. v.60. p.159-

171, 2010.

UCMP - MUSEUM OF PALEONTOLOGY. The marine biome. 2019. Disponível em: <https://ucmp.berkeley.edu/exhibits/biomes/marine.php>. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

UNEP - UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. Guidance for a global monitoring programme for persistent organic pollutants. Geneva (Switzerland): Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, p. 105, 2004.

WOOD, A.R.; APTE, S.; MACAVOY, E.S.; GARDNER, J.P. A molecular phylogeny of the marine mussel genus *Perna* (Bivalvia: Mytilidae) based on nuclear (ITS1&2) and mitochondrial (COI) DNA sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, v. 44, p. 685-698, 2007.

YUSA, Y.; BRENTON, S.; HOEH, W.R. Population genetics of sex determination in *Mytilus* mussels: reanalyzes and a model. *Journal of Heredity*, v. 104, n. 3, p. 380-385, 2013.

# CAPÍTULO 1

---

**COMO IDENTIFICAR OS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO  
GONADAL EM *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) (BIVALVIA:  
MYTILIDAE) NA AUSÊNCIA DE HISTOTÉCNICAS: UM GUIA  
MACROSCÓPICO**

# **Como identificar os estádios de desenvolvimento gonadal em *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Mytilidae) na ausência de histotécnicas: um guia macroscópico**

FRANÇA, M.A.<sup>1</sup>; DAROS, B.N.<sup>1</sup>; SCHUAB, J.M.F.M.<sup>1</sup>; MILAGRES, M.R.<sup>1</sup>; PAULA, M.S.<sup>1</sup>; SANTOS, M.O.<sup>1</sup>; PEREIRA, V.G.S.<sup>1</sup>; SIQUEIRA, A.S.<sup>1</sup>; ZAMPROGNO, G.C.<sup>1</sup>; OTEGUI, M.B.P.<sup>1</sup>; SILVA, N.F.<sup>2</sup>; COSTA, M.B.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Malacologia/Coleção Malacológica, Depto. Ciências Biológicas/UFES.

<sup>2</sup> Laboratório de Neuromorfologia Celular, Centro de Ciências da Saúde, UFES.

*(Artigo a ser submetido)*

## **RESUMO**

Nas zonas costeiras diversas espécies de animais marinhos são utilizados como fonte alimentar, sendo os mexilhões um dos principais grupos consumido. No Brasil, a espécie *Perna perna*, também conhecida como mexilhão marrom, obtidas a partir de bancos naturais e de cultivo, são amplamente usadas como fonte alimentar. Sabe-se que compreender os ciclos reprodutivos dos organismos vivos auxilia na preservação da espécie, especialmente se estas têm valor comercial e são fontes de extrativismo. Assim, a fim de auxiliar na identificação dos estádios sexuais por meio de uma metodologia de baixo custo proporcionando o entendimento dos períodos de liberação de gametas, bem como impulsionar o consumo consciente e o extrativismo controlado desta espécie, produziu-se este guia fornecendo subsídios claros e ilustrativos sobre os diferentes estádios do ciclo reprodutivo de *Perna perna*. Para tanto, foram coletados 712 exemplares dessa espécie na costa do Espírito Santo, Sudeste do Brasil, em bancos naturais durante a maré baixa ao longo de um ano. Os estádios sexuais dos indivíduos foram identificados com auxílio de bibliografia especializada, observando a olho nu a gônada e o folículo. Posteriormente, esses estádios foram confirmados a partir de análises em Estereomicroscópio Leica Mod S8APO. Neste equipamento os tecidos reprodutivos de todos os animais foram fotografados com câmera acoplada Leica MC170 HD. Os estádios apresentam especificações que os tornam distintos uns dos outros, principalmente se associados as informações obtidas a partir das gônadas em conjunto com as informações contidas no folículo. Os estádios III-A, III-B e III-C apresentam distinção bem definida e demarcada, contudo, os estádios 0, I e II apresentam detalhes que, se não observados, podem culminar em erro de identificação. A produção desse guia descritivo e ilustrado pretende fornecer uma ferramenta clara, rápida e de baixo custo para futuros estudos sobre o ciclo reprodutivo de *Perna perna*.

**Palavras-chave:** Mexilhão marrom. Reprodução. Cultivo. Bancos naturais. Estádios sexuais.

## 1. INTRODUÇÃO

Conhecer a biologia reprodutiva de uma espécie é necessário para entender a sua história de vida bem como o manejo de seus bancos naturais para possíveis aplicações de normas conservacionistas e exploratórias de organismos que são comercializáveis (AVENDAÑO & LA PENNEC, 1997; GARNER *et al.*, 1999). Por esta razão, é de se esperar que estudos se concentrem nos grupos taxonômicos mais abundantes.

O Filo Mollusca é o maior grupo taxonômico depois de Insecta (MAGALHÃES, 1987) e os bivalves são utilizados em larga escala para manejo e comercialização (MAGALHÃES, 1998), por isso diversos estudos foram realizados ao longo dos últimos anos visando descrever e elucidar o ciclo reprodutivo desses organismos (NARCHI, 1976; NASCIMENTO & LUNETTA, 1978; POUVREAU *et al.*, 1999; GIL & THOMÉ, 2004; MORSAN & KROECK, 2005; WOLFF & SANTOS, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2010; AVEIRO *et al.*, 2011; PEHARDA *et al.*, 2013; BRAHIM & BELDI, 2016; GADELHA *et al.*, 2019). Dentre esses, destacam-se os estudos sobre reprodução e desenvolvimento sexual dos mitilídeos (MESQUITA *et al.*, 2001), seja em virtude da sua distribuição geográfica, abundância em costões rochosos de todos os continentes ou pela importância econômica (MAGALHÃES, 1998; KRAMPAH *et al.*, 2016).

A espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758), conhecida como mexilhão marrom, da família Mytilidae, apresenta ocorrência no Brasil, de Pernambuco à Santa Catarina, na Venezuela, no Uruguai, na costa atlântica da África e em Madagascar, representando fonte alimentar para os seres humanos e com grande potencial de cultivo (FERREIRA, 1997; MAGALHÃES, 1998; KRAMPAH *et al.*, 2016). Esta espécie é o maior mitilídeo brasileiro (KLAPPENBACH, 1965) podendo chegar à 182mm de comprimento (MAGALHÃES, 1998).

No geral, mitilídeos não possuem dimorfismo sexual externo e as gônadas se desenvolvem no interior do folículo (*i.e.*, manto). Em *P. perna*, a coloração das gônadas e folículos reprodutivos difere: os machos apresentam a coloração creme e as fêmeas coloração alaranjada (MAGALHÃES, 1998; HENRIQUES, 2004). Essa coloração das fêmeas decorre da deposição lipídica e glicogênica (LUNETTA, 1969). Segundo Magalhães (1998), o arranjo gonadal se dá na forma de um conjunto de canais genitais ramificados que entram em outros órgãos e tecidos, cuja porção mais fina desemboca no folículo (onde ocorre a oogênese e/ou espermatogênese) e a outra extremidade desemboca

no poro genital situado próximo do músculo adutor. Por esta última via, de acordo com Camacho (1991), são eliminados os gametas. A reprodução é sexuada com fecundação externa e ocorre na água, sendo a desova estimulada por fatores mecânicos, biodisponibilidade de nutrientes, variações bruscas de temperatura ou salinidade (LUNETTA, 1969; HENRIQUES, 2004). Casos de hermafroditismo já foram descritos para a espécie (GARCIA *et al.*, 1991; MAGALHÃES, 1998; GALVÃO *et al.*, 2006).

Posteriormente à fecundação ocorre o processo de clivagem holoblástica espiral. Sua segmentação origina uma larva trocófora entre 31 à 102 horas após o início dessa fase (VÉLEZ & MARTINEZ, 1967; MAGALHÃES, 1998). Em seguida, ocorre a última fase planctônica da espécie, com formação da larva véliger (MAGALHÃES, 1998). Entre 30 a 40 dias após a fecundação, dependendo de fatores bióticos e abióticos, o pequeno mexilhão de 20mm, plantígrado, passa para a vida bentônica (MAGALHÃES, 1998), a partir da fixação em superfícies basibiontes pelo bisso (KRAMPAH *et al.*, 2016). O bisso, de acordo com Henriques (2004) é composto por filamentos proteicos produzidos por glândulas bissogênicas localizadas no pé. Até 30mm os indivíduos são imaturos (GALVÃO *et al.*, 2006) e a partir desse tamanho ocorre o início da gametogênese.

As informações fornecidas pelo conhecimento dos estádios sexuais podem auxiliar em atividades de cultivo e extrativismo de mitilídeos. A identificação macroscópica dos estádios e a identificação dos períodos de liberação de gametas (que estão correlacionados com a massa úmida total da carne do animal que pode ser perdida em apenas um evento de desova) (SCHURINK & GRIFFITHS, 1991), juntamente com a descrição detalhada e ilustrada de cada etapa dos estádios sexuais poderão contribuir como uma ferramenta objetiva, fácil e de baixo custo quando comparado as técnicas histológicas de identificação dos estádios sexuais. Portanto, objetivou-se com este guia fornecer subsídios claros e ilustrativos sobre os diferentes estádios do ciclo reprodutivo de *P. perna*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de descrever macroscopicamente os estádios gonadais de *P. perna*, coletou-se indivíduos ao longo de doze meses (entre maio de 2017 e abril de 2018) no litoral do Estado do Espírito Santo, Sudeste do Brasil (20°18'27.9"S 40°16'44.5"W e 20°38'07.6"S 40°25'23.6"W). Foram coletados durante a maré baixa em costão rochoso, 712 indivíduos, todos maduros sexualmente. No instante de coleta, o costão estava completamente exposto

ao ar. Para desprender os filamentos do bisso do substrato, os organismos foram removidos com auxílio de faca de mergulho. Os espécimes coletados foram acondicionados em potes plásticos contendo água do mar e encaminhados vivos para o laboratório.

Em laboratório, imediatamente após a chegada dos espécimes, os epibiontes foram removidos para facilitar o manejo e acurção das análises. O músculo adutor posterior foi seccionado para a separação das valvas a fim de expor os tecidos reprodutivos. A gônada e o folículo foram observados a fim de acurar na definição dos estádios sexuais, os sexos foram identificados e os estádios gametogênicos foram classificados segundo Lunetta (1969), inicialmente à olho nu e em seguida confirmados com auxílio do Lupa Leica Mod S8APO com câmera acoplada Leica MC170 HD. Neste equipamento, todos os indivíduos tiveram suas gônadas e folículos fotografados, não sendo necessários programas para edição de imagens.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A literatura disponível para a distinção dos estádios gonadais macroscópicos de *P. perna* baseia-se no estudo de Lunetta (1969) que por sua vez fundamentou-se nos estudos de Chipperfield (1953) para *Mytilus edulis* e Lubet (1959) para Mytilidae e Pectinidae. Assim, existe apenas uma descrição dos estádios pobremente ilustrada e sem um guia que descreva e exemplifique ilustrativamente os mesmos. Além disso, a maior parte das observações realizadas por estes autores focaram em modificações e fenômenos nos folículos, deixando em segundo plano as modificações ocorridas nas gônadas. Dessa forma, este guia se propôs a detalhar os eventos que estão ocorrendo em ambos os tecidos e as modificações ocorridas neles em todos os estádios sexuais.

#### 3.1 ESTÁDIO ZERO (0)

Este estágio inicial do ciclo gametogênico se caracteriza pelo repouso sexual dos organismos, no qual nota-se a ausência de gametas nas gônadas e nos folículos (LUNETTA, 1969), como demonstrado pela Figura 1. Desta maneira, não há distinção entre machos e fêmeas, pois com a ausência de gametas há ausência da coloração característica e distintiva dos sexos (*i.e.*, alaranjado para fêmeas e creme para os machos).

Isso confere ao folículo uma semitransparência, sendo possível a observação da

coloração e de aspectos da camada nacarada das valvas. O folículo é espesso em virtude da abundância de reservas energéticas contidas nos tecidos conjuntivos ali presentes (CHIPPERFIELD, 1953), podendo chegar de 01 à 03mm. Essa espessura pode ser observada com o toque ou com objetos não-pontiagudos que adentram no folículo. Entretanto, em locais com baixa disponibilidade de alimento pode ocorrer diminuição na espessura (ao tocar, não há afundamento dos folículos ou chega-se a no máximo 1 mm) em virtude da menor disponibilidade de material de reserva. Importante destacar que as características gerais de semitransparência do folículo e observação da camada nacarada são perceptíveis em qualquer espessura.

As gônadas também são semitransparentes, com tamanho reduzido (em geral, de 05 a 12 mm de comprimento e área total de 10 a 15 mm) apresentando maleabilidade ao toque (*i.e.*, não apresenta rigidez ou tração em virtude da presença apenas dos tecidos conjuntivos interfoliculares).

## GÔNADA



## FOLÍCULO



**Figura 1:** Gônada e folículo de *Perna perna* em estágio 0. Nesse estágio não é possível diferenciar os sexos, visualizando-se em ambos os tecidos reprodutivos semitransparência que possibilita, nos folículos, por exemplo, a visualização da camada nacarada bem como de suas características peculiares e particulares, como pequenas lesões, abaulações ou marcas oriundas da deposição de cálcio. Aumento de 10x.

### 3.2 ESTÁDIO I

Este estágio é marcado pelo início dos primeiros sinais da gametogênese (Figura 2), caracterizado pelas perdas do aspecto homogêneo e da semitransparência dos folículos (LUNETTA, 1969) e das gônadas, mas não sendo possível ainda diferir os sexos pela ausência de gametas.

Nos folículos são observados esboços foliculares gaméticos que se iniciam na parte central e inferior da valva, ou seja, a região mais próxima das vísceras dos animais. Isso torna esta região opaca, perdendo assim a transparência característica do Estádio 0. Devido ao início do consumo das reservas lipídicas e glicogênicas há diminuição na espessura dos folículos.

A gônada apresenta esboços foliculares com pouca ou nenhuma coloração, perdendo a maleabilidade característica do estágio anterior, ocasionado pelo intumescimento do tecido conjuntivo em virtude do início do preenchimento dos espaços lúminicos pelos gametas. Isto aumenta a opacidade desse órgão.

**GÔNADA**



**FOLÍCULO**



**Figura 2:** Gônada e folículo de *Perna perna* em estágio I. Note-se que não é possível fazer a sexagem nesse estágio, entretanto, é possível observar a opacidade da gônada bem como o início do preenchimento dos folículos a partir das vias gaméticas. Aumento de 10x.

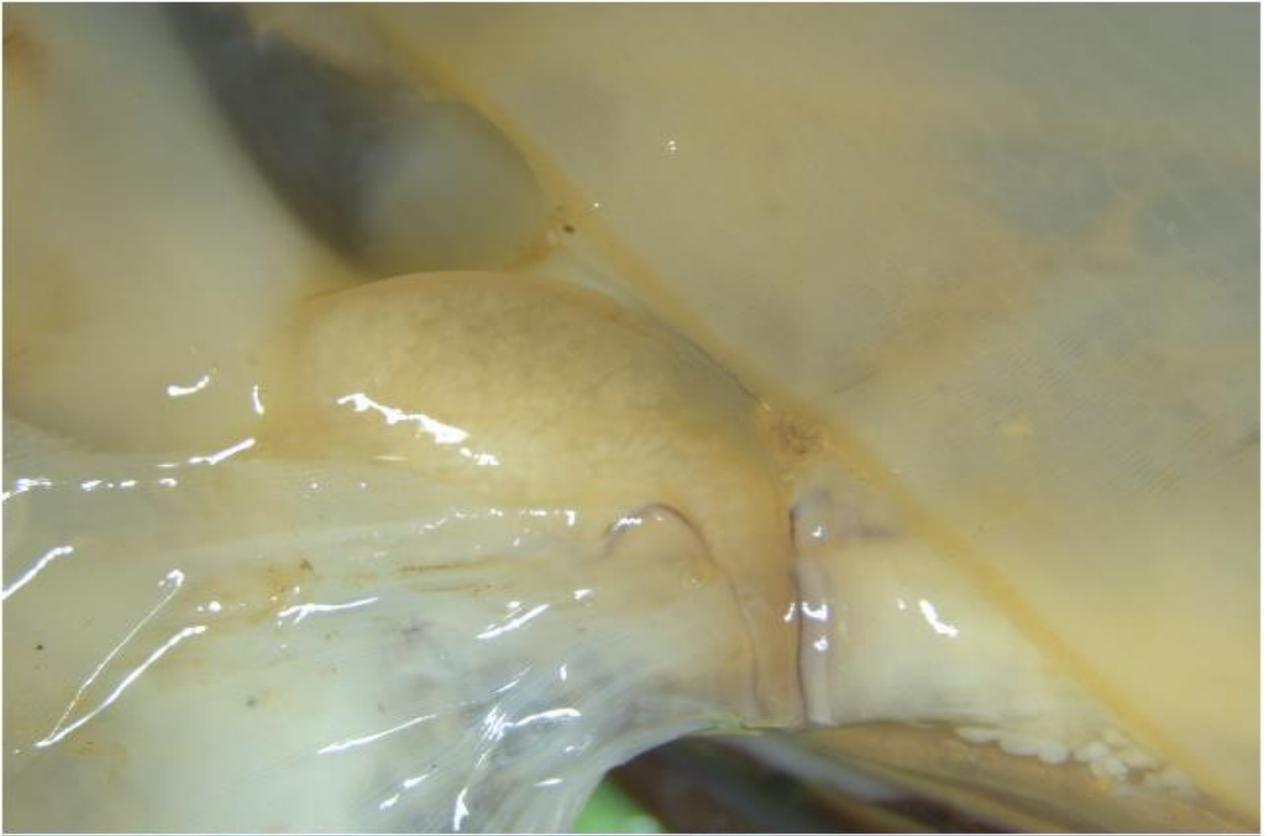
### 3.3 ESTÁDIO II

Como o aumento da quantidade de gametas nos folículos e nas gônadas, este estágio caracteriza-se pela nitidez dos esboços foliculares devido ao curso ativo da gametogênese (LUNETTA, 1969). Assim, como observado por esse autor, são facilmente visíveis neste estágio a diferenciação entre machos e fêmeas (Figura 3 e 4). Chipperfield (1953, pág. 451) ainda completa afirmando que estes tecidos estão “cheios de óvulos e espermatozoides verdes”, ou seja, em fase de amadurecimento gametogênico para a posterior liberação dos gametas.

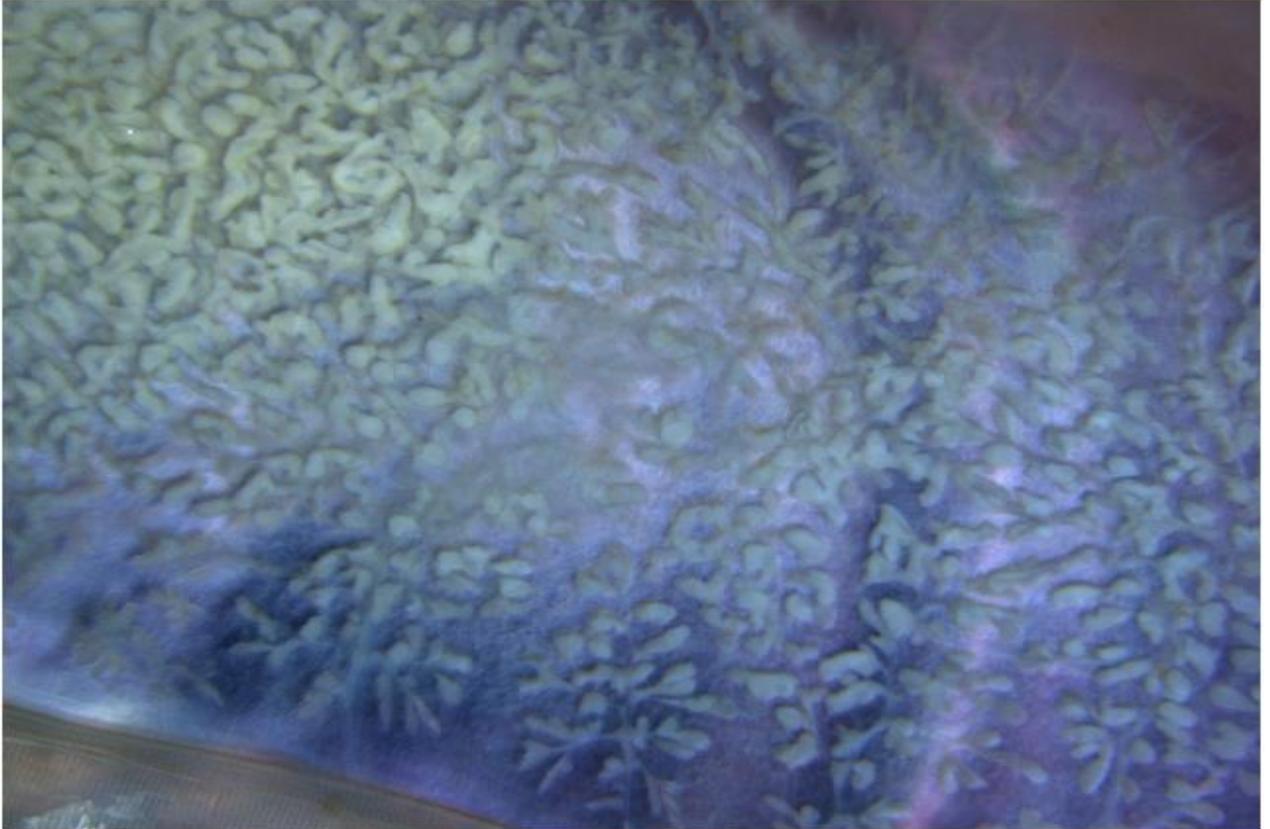
Os folículos estão semi-repletos de gametas e com cerca de dois terços de sua área preenchidos. Uma observação importante e clara entre os sexos é que as fêmeas apresentam folículos com deposição de gametas circulares e nos machos, a deposição dos gametas se dá em forma ramificada.

As gônadas apresentam alto grau de intumescência, sem flacidez, mas suas bordas ainda apresentam indistinção da coloração característica, principalmente em virtude do andamento da produção de gametas, que não chegou ao ápice e por isso a gônada não alcançou o seu tamanho total (*i.e.*, com a gametogênese alcançando a capacidade máxima).

**GÔNADA**



**FOLÍCULO**

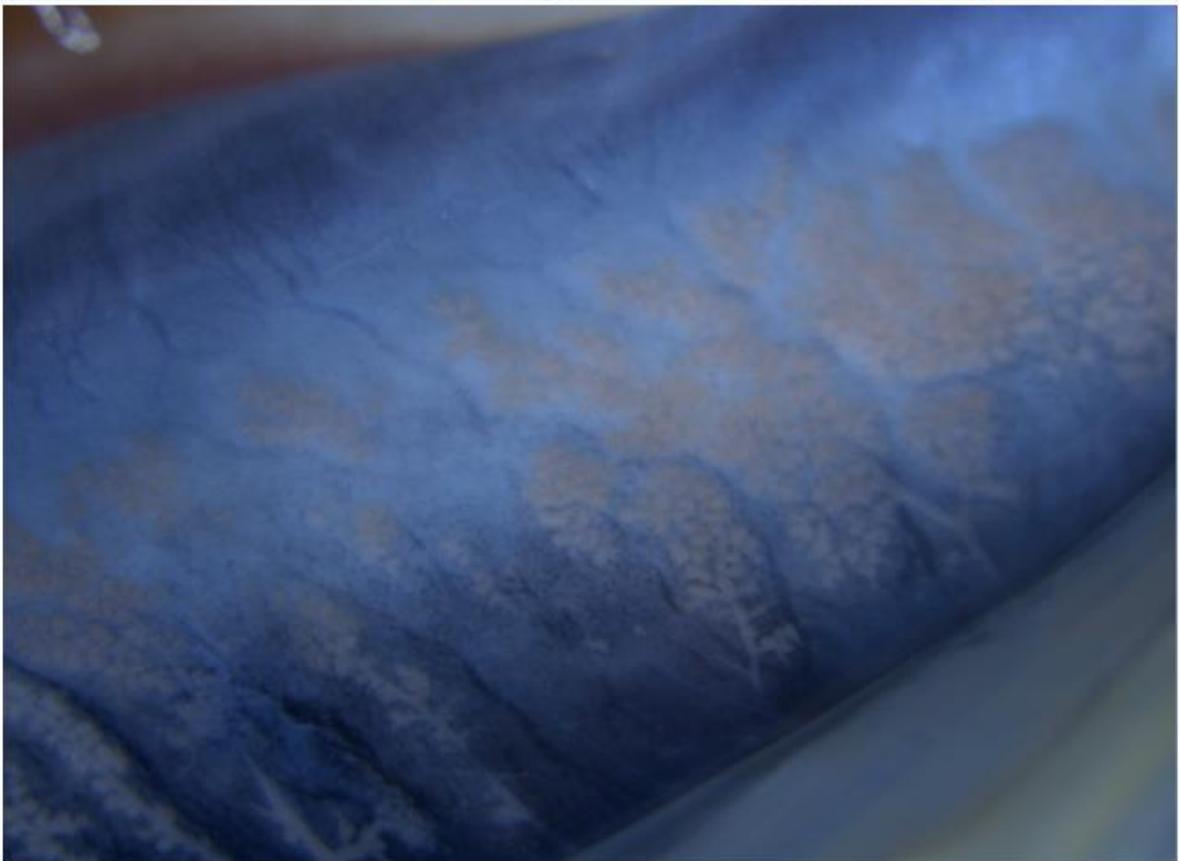


**Figura 3:** Gônada e folículo de *Perna perna* macho em estágio II. Nota-se o aspecto arborescente e ramificado dos folículos dos machos. Aumento de 10x.

## GÔNADA



## FOLÍCULO



**Figura 4:** Gônada e folículo de *Perna perna* fêmea em estágio II. Nota-se o aspecto arredondado dos folículos das fêmeas e borda opaca nas gônadas. Aumento de 10x.

### 3.4 ESTÁDIO III

Diferente do que foi proposto originalmente por Chipperfield (1953), com apenas o estágio III para o desenvolvimento gamético, Lunetta (1969) subdividiu este estágio em três, pois segundo suas observações, ocorrem em cada um “fenômenos típicos que determinam aspectos distintos nos folículos” (LUNETTA, 1969, pág. 56) e gônadas.

#### 3.4.1 Estádio III-A

Segundo a interpretação por equivalência do que descreve Chipperfield (1953) para o estágio III, este subestádio é semelhante ao estágio II com a exceção de que a massa da gônada é maior e o tecido conjuntivo interfolicular é ainda mais ocluído. Segundo Lunetta (1969), este estágio é caracterizado pela repleção total dos tecidos reprodutivos por gametas masculinos e femininos (Figura 5 e 6).

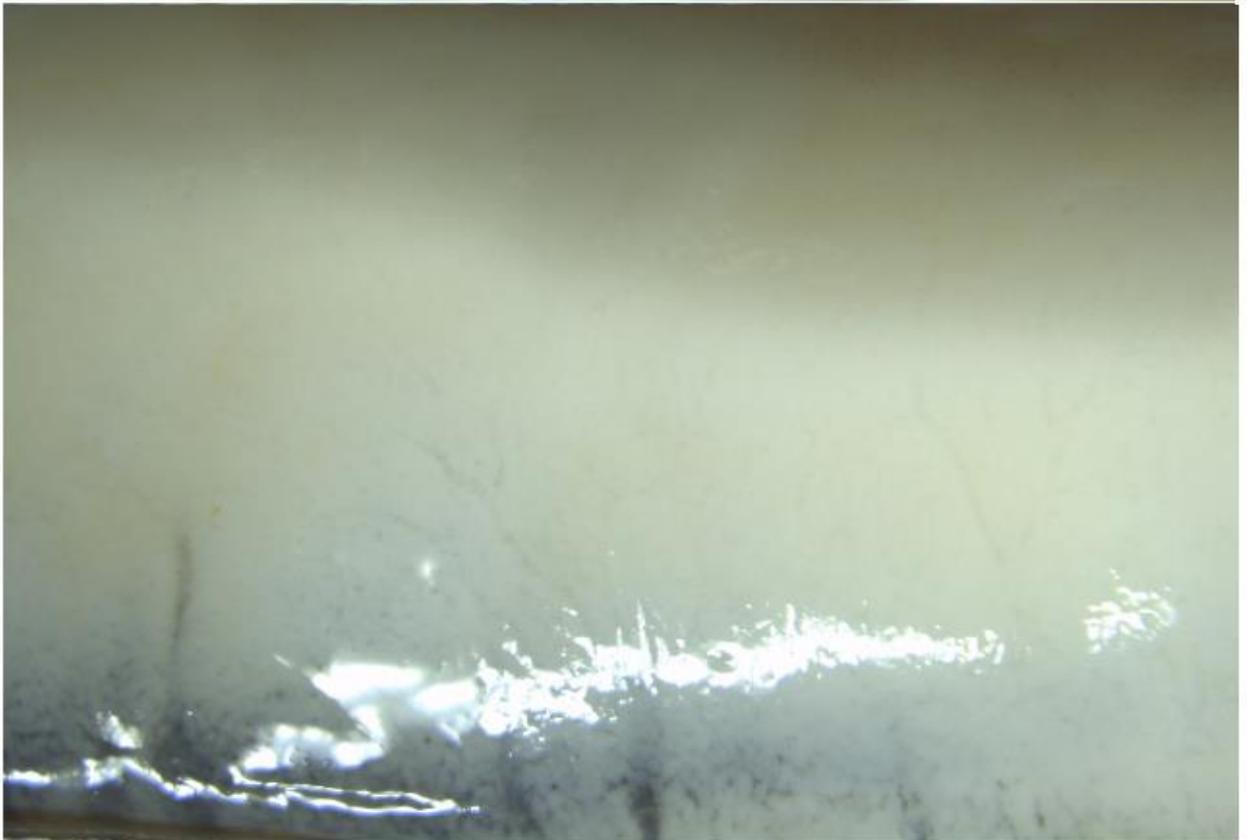
O folículo está repleto de gametas, sendo impossível visualizar a camada nacrada da concha. Além disso, a espessura do folículo chega quase ao dobro do tamanho observado para o estágio 0, apresentando um abaulamento devido à quantidade de gametas presentes neste tecido.

Assim como no folículo, a gônada também está repleta de gametas, apresentando intumescência completa e com ausência de flacidez ou regiões semitransparentes. Nos machos, as gônadas são mais curtas no comprimento, porém mais altas na região anterior (*i.e.*, porção mais alta na gônada). Nas fêmeas ocorre o oposto: as gônadas são mais alongadas no comprimento e a porção inicial apresenta-se mais curta.

**GÔNADA**



**FOLÍCULO**



**Figura 5:** Gônada e folículo de *Perna perna* macho em estágio III-A. Na região anterior dos machos podemos observar altura maior se comparado ao seu comprimento. Aumento de 10x.

**GÔNADA**



**FOLÍCULO**



**Figura 6:** Gônada e folículo de *Perna perna* fêmea em estágio III-A. Nas fêmeas a porção anterior tem menor altura, conferindo aspecto longelíneo a mesma. Aumento de 10x.

### 3.4.2 Estádio III-B

Neste estágio há o esvaziamento parcial dos tecidos gonadais (LUNETTA, 1969), mas ainda há diferenciação entre machos e fêmeas (Figura 7 e 8).

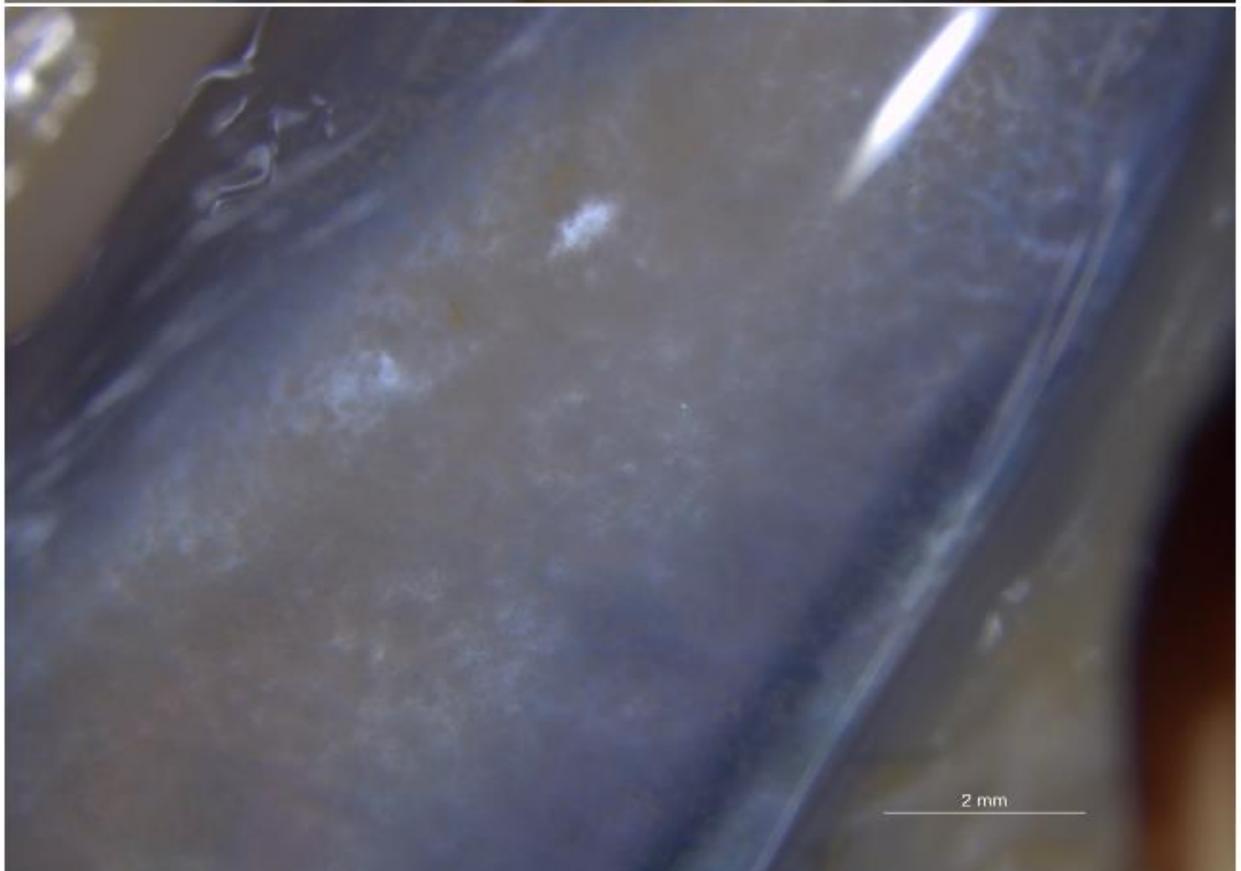
Os folículos diminuem de espessura e, por consequência, há a diminuição e exclusão do abaulamento originado no estágio III-A devido à liberação gamética. Assim, é possível visualizar novamente a coloração da camada nacarada da valva em algumas regiões com baixa opacidade folicular.

As gônadas tornam-se mais flácidas, sendo que suas bordas apresentam a semitransparência característica dos estágios iniciais do ciclo gamético. Todavia, ainda apresenta em seu interior gametas visíveis na gônada e no folículo. É distinguível do estágio II com bastante clareza pela distribuição dos gametas nas gônadas e pela flacidez da mesma. Sendo assim, essa é a melhor técnica para diferenciar esses estágios.

## GÔNADA



## FOLÍCULO



**Figura 7:** Gônada e folículo de *Perna perna* macho em estágio III-B. Em ambos os sexos é possível observar gametas remanescentes, indicando esvaziamento parcial dos mesmos. Aumento de 10x.

## GÔNADA



## FOLÍCULO



**Figura 8:** Gônada e folículo de *Perna perna* fêmea em estágio III-B. Em ambos os sexos é possível observar gametas remanescentes, indicando esvaziamento parcial dos mesmos. Aumento de 10x.

### 3.4.3 Estádio III-C

Este estágio, de acordo com o estudo conduzido por Lunetta (1969) é compreendido pela reestruturação gonadal. Este autor completa dizendo que há maior nitidez dos folículos, diferenciando-se do estágio I por apresentar a cor característica para machos e fêmeas (Figura 9 e 10). Todavia, ele ressalta que como a coloração é mais atenuada, o ideal seria realizar um esfregão dos folículos a fim de verificar se pigmentos nestas regiões são provenientes dos gametas ou do epitélio.

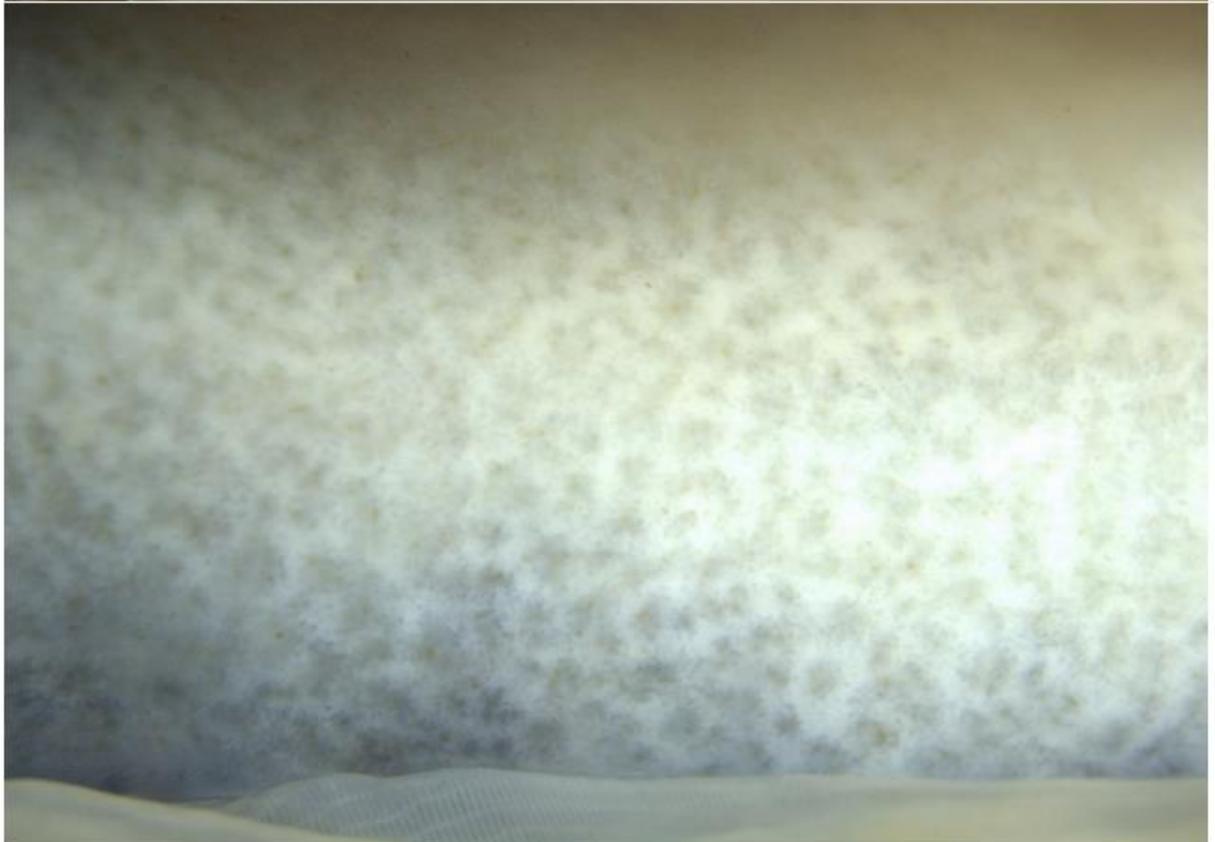
Com relação aos folículos, como bem descreve Lunetta (1969) ainda há a coloração característica de cada sexo e é possível ver a cor e parcialmente as estruturas da camada nacrada da valva.

As gônadas reduziram de tamanho, possuem resquícios da coloração dos gametas, são altamente flácidas (*i.e.*, consegue-se manuseá-la para qualquer direção) e estão se tornando semitransparentes.

**GÔNADA**



**FOLÍCULO**



**Figura 9:** Gônada e folículo de *Perna perna* macho no estágio III-C. Neste estágio não há gametas nos folículos, sendo possível visualizar a camada nacarada. Todavia, as gônadas apresentam gametas remanescentes que tornam possível a distinção entre os sexos. Aumento de 10x.

**GÔNADA**



**FOLÍCULO**



**Figura 10:** Gônada e folículo de *Perna perna* fêmeas no estágio III-C. Neste estágio não há gametas nos folículos, sendo possível visualizar a camada nacarada. Todavia, as gônadas apresentam gametas remanescentes que tornam possível a distinção entre os sexos. Aumento de 10x.

## 4. CONCLUSÃO

Compreender o ciclo de vida desta espécie é fundamental para a manutenção do seu equilíbrio populacional e, conseqüentemente, de vários outros invertebrados marinhos à eles associados. Após as análises macroscópicas observa-se distinções claras entre os estádios, principalmente quando associadas as informações contidas no folículo e na gônada. Os estádios 0, I e II apresentam detalhes que requisitam mais atenção, pois equívocos de avaliação podem culminar em erro de avaliação que comprometerão a definição dos estádios e o resultado final da pesquisa.

Por se tratar de uma fonte alimentar, principalmente originários de estoques dos bancos naturais, conhecer e entender o ciclo reprodutivo pode fomentar e definir melhor os períodos de mariscagem e defeso para cada Estado Federativo e/ou país, dado que cada região apresenta particularidades em seu ciclo reprodutivo e a retirada desenfreada pode culminar na eliminação local dos indivíduos pela discrepância entre a taxa de reprodução com a taxa de retirada dos organismos do ambiente marinho. Atualmente para *P. perna*, segundo a Portaria Interministerial do IBAMA nº 105, de 20 de julho de 2006, estabeleceu-se o defeso da espécie em bancos naturais da região sul e sudeste do Brasil no período de 1º de setembro à 31 de outubro. Assim, a associação destas informações compiladas neste guia pode proporcionar o direcionamento para a coleta e manejo, possibilitando unir os períodos mais adequados de coleta com a proteção legal desta espécie.

Este guia aplicado ao cultivo da espécie, amplamente utilizado na região sul e sudeste do Brasil, elucidará o período mais adequado de despesca, além do melhor período para a obtenção dos gametas e de deposição das sementes para cultivo.

Como o ciclo reprodutivo destes organismos também é utilizado amplamente em programas de biomonitoramento onde a espécie ocorre, este guia atuará como ferramenta primária em pesquisas a fim de monitorar e biomarcar o ciclo como uma resposta a alguma alteração ambiental. Ademais, cada fase do ciclo pode indicar uma resposta diferente ao fator a ser analisado, assim, ao identificar os ciclos e os períodos de maneira precisa podemos aumentar a acurácia e confiabilidade do material a ser analisado.

Conclui-se que a criação e a descrição deste guia é uma ferramenta vital, clara, rápida e de baixo custo para o conhecimento da espécie por cientistas, pesquisadores e pescadores que fazem uso da mesma para o consumo, o cultivo ou o estudo.

## REFERÊNCIAS

- AVEIRO, M.V.; MAGALHÃES, A.R.M.; TRAMONTE, V.L.C.G.; SCHAEFER, A.L.C. Variação sazonal na composição centesimal e reprodução do bivalve de areia *Anomalocardia brasiliana* da reserva extrativista marinha do Pirajubá, Florianópolis/SC. *Atlântica*, v. 33, n. 1, p. 5-14, 2011.
- AVENDAÑO, M.; LE PENNEC, M. Interspecific variation in gametogenesis in two populations of the *Cilean molluscan* bivalve, *Argopecten purpuratus* (Lamarck). *Aquaculture Research*, v. 28, p. 175-182. 1997.
- BRAHIM, D.; BELDI, H. Reproduction cycle of *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) in the gulf of Annaba (Northeast Algeria). 2016. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/305776177\\_Reproduction\\_cycle\\_of\\_Donax\\_trunculus\\_Mollusca\\_Bivalvia\\_in\\_the\\_gulf\\_of\\_Annaba\\_Northeast\\_Algeria](https://www.researchgate.net/publication/305776177_Reproduction_cycle_of_Donax_trunculus_Mollusca_Bivalvia_in_the_gulf_of_Annaba_Northeast_Algeria). Acesso em: 14 de dezembro de 2019.
- CAMACHO, A.P. Cultivo del mejillon en la batea. *A Coruña, Alva*, v.12, p. 48, 1991.
- CHIPPERFIELD, P.N.J. Observation on the Breeding and Settlement of *Mytilus edulis* (L.) in British Waters. *J. Mar. biol. Ass. U. K.* 32:449-476, 1953.
- FERREIRA, A.B.H. Cultivo de Moluscos – Mexilhões. In: Seminário Internacional de Qualidade e Inovação Tecnológica em Alimentos, Florianópolis, 1997. Anais. Florianópolis, p. 9, 1997.
- GALVÃO, M.S.N.; HENRIQUES, M.B.; PEREIRA, O.M.; MARQUES, H.L.A. Ciclo reprodutivo e infestação parasitária de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Pesca* v. 32, p. 59-71, 2006.
- GADELHA, E.; SILVA, E.; SILVA, R.; RAFAEL, S. Reproductive cycle and gonadal development of *Donax striatus* (Bivalvia: Donacidae) on an Amazon sandy beach in northern Brazil. 2019. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/332023692\\_Reproductive\\_cycle\\_and\\_gonadal\\_development\\_of\\_Donax\\_striatus\\_Bivalvia\\_Donacidae\\_on\\_an\\_Amazon\\_sandy\\_beach\\_in\\_northern\\_Brazil](https://www.researchgate.net/publication/332023692_Reproductive_cycle_and_gonadal_development_of_Donax_striatus_Bivalvia_Donacidae_on_an_Amazon_sandy_beach_in_northern_Brazil). Acesso em: 18 de dezembro de 2019.
- GARCIA, P.; MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F. Ocorrência de hermafroditismo no mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (Bivalvia, Mytilidae). In: Encontro Brasileiro de Malacologia. Resumos. Encontro Brasileiro de Malacologia (EBRAM), São Paulo, v. 12, p. 66, 1991.
- GARNER, J.T.; HAGGERTY, T.M.; MODLIN, R.F. Reproductive cycle of *Quadrula metanevra* (Bivalvia: Unionidae) in the Pickwick Dam Tailwater of the Tennessee River. *The American Midland Naturalist*, v. 141, p. 277-283, 1999.
- GIL, G.M.; THOMÉ, J.W. Descrição do ciclo reprodutivo de *Donax hanleyanus* (Bivalvia: Donacidae) no sul do Brasil. Porto Alegre: Iheringia. *Série Zoologia*, v. 94, n. 3, p. 271-276, 2004.
- HENRIQUES, M. B. Resistência do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), proveniente de bancos naturais da Baixada Santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo. Doutorado apresentado ao Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, p. 113, 2004.

KLAPPENBACH, M.A. Lista preliminar de los mytilidae brasilenos con claves para su determinación y notas sobre su distribución. An. Acad. Bras. Ciênc., v. 37 (supl.), p. 327-352, 1965.

KRAMPAH, E.A.; YANKSON, K.; BLAY, J. Aspects of reproduction of the brown mussel *Perna perna* at the Iture rocky beach near Cape Coast, Ghana. African Journal of Marine Science, v. 38, n. 4, p. 503-5012, 2016.

LIMA, R.C. Reprodução e cultivo de bivalves límnicos ameaçados de extinção: uma estratégia para a conservação do gênero *Diplodon* (SPIX, 1827) (Mollusca, Hyriidae). 2010. Disponível em: [https://teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59139/tde-13052010-094741/publico/Doutorado\\_Lima.pdf](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59139/tde-13052010-094741/publico/Doutorado_Lima.pdf). Acesso em: 11 de dezembro de 2019.

LUBET, P. Recherches sur le cycle de l'émission des gametes chez les Mytilidés et les Pectinidés. Thèse Paris, p. 162, 1959.

LUNETTA, J.E. Fisiologia da reprodução dos mexilhões (*Mytilus perna* – Mollusca: Lamellibranchia). Boletim de Zoologia e Biologia Marinha., v. 26, p. 33-112, 1969.

LUZ, J.R.; BOEHS, G. Reproductive cycle of *Anomalocardia brasiliiana* (Molluscas: Bivalvia: Veneridae) in the estuary of the Cachoeira River, Ilhéus, Bahia. 2011. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-69842011000400012](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842011000400012). Acesso em: 14 de dezembro de 2019.

MAGALHÃES, A.R.M. Efeito da parasitose por trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição do mexilhão *Perna perna* (L.). Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 185, 1998.

MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F.; CASAS, M.G. Ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Mytilidae) na região do Pântano do Sul – Ilha de Santa Catarina, SC. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, São Paulo, 1987. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Malacologia, p.113-116, 1987.

MESQUITA, E.F.M.; ABREU, M.G.; LIMA, F.C. Ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus) (Mollusca, Bivalvia) da Lagoa de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. Revta. Bras. Zool., n. 18, v. 2, p. 631-636, 2001.

MORSAN, E.M.; KROECK, M.A. Reproductive cycle of purple clam, *Amiantis purpurata* (Bivalvia: Veneridae) in northern Patagonia (Argentina). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, v. 85, p. 367-373, 2005.

NARCHI, W. A importância do conhecimento dos ciclos gametogênicos de bivalves comestíveis. In: Seminários de Biologia Marinha, São Seastião. 1976. Anais. Academia Brasileira de Ciências de São Paulo, v. 47, p. 133-134. 1976.

NASCIMENTO, I.A.; LUNETTA, J.E. Ciclo sexual de ostra de mangue e sua importância para o cultivo. Boletim de Fisiologia Animal, v. 2, p. 63-98. 1978.

PEHARDA, M.; CRNČEVIĆ, M.; BALIC, D.E.; PEĆAREVIĆ, M. Reproductive cycle of *Glycymeris nummaria* (Mollusca: Bivalvia) from Mali Ston Bay, Adriatic Sea, Croatia. 2013. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/239522744\\_Reproductive\\_cycle\\_of\\_Glycymeris\\_nummaria\\_Mollusca\\_Bivalvia\\_from\\_Mali\\_Ston\\_Bay\\_Adriatic\\_Sea\\_Croatia](https://www.researchgate.net/publication/239522744_Reproductive_cycle_of_Glycymeris_nummaria_Mollusca_Bivalvia_from_Mali_Ston_Bay_Adriatic_Sea_Croatia). Acesso em: 20 de dezembro de 2019.

POUVREAU, S.; GANGNERY, A.; TIAPARI, J.; LAGARDE, F.; GARNIER, M.; BODOY, A. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). 1999. Disponível em: <https://archimer.ifremer.fr/doc/2000/publication-1391.pdf>. Acesso em: 30 de novembro de 2019.

RODRIGUES, A.M.L.; BORGES-AZEVEDO, C.M.; HENRY-SILVA, G.G. Aspectos da biologia e ecologia do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Veneridae). 2010. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/1540/983> . Acesso em: 14 de dezembro de 2019.

SCHURINK, C.V.E.; GRIFFITHS, C.L. A comparison of reproductive cycles and reproductive output in four southern African mussel species. *Marine Ecology Progress Series*, v. 76: 123-134. 1991.

VELÉZ, A.; MARTÍNEZ, R. Reproduccion y desarrollo larval experimental del mejillon comestible de Venezuela, *Perna perna* (Linneaus, 1758). *Bol. Inst. Oceanog. Univ. Oriente*, v. 6, n. 2, p. 266-285. 1967.

WOLFF, W.J.; SANTOS, P.T. Growth and reproduction in Bivalves: An energy budget approach. 2007. Disponível em: <https://www.bio.vu.nl/thb/deb/essays/Card2007.pdf>. Acesso em: 02 de janeiro de 2020.

# CAPÍTULO 2

---

**CICLO REPRODUTIVO DE *Perna perna* (LINNAEUS, 1758)  
(BIVALVIA, MYTILIDAE) COMO BIOMARCADOR PARA  
POLUIÇÃO AMBIENTAL EM BANCOS COSTEIROS NATURAIS**

**Ciclo reprodutivo de *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Mytilidae) como biomarcador para poluição em bancos costeiros naturais**

FRANÇA, M.A.<sup>1</sup>; ZAMPROGNO, G.C.<sup>1</sup>; OTEGUI, M.B.P.<sup>1</sup>; DAROS, B.N.<sup>1</sup>; SCHUAB, J.M.F.M.<sup>1</sup>; MILAGRES, M.R.<sup>1</sup>; SILVA, N.F.<sup>2</sup>; COSTA, M.B.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Malacologia/Coleção Malacológica, Depto. Ciências Biológicas/UFES.

<sup>2</sup>Laboratório de Neuromorfologia Celular, Centro de Ciências da Saúde, UFES.

(Artigo a ser submetido)

**RESUMO**

As populações costeiras usufruem dos oceanos para comunicação, transporte, lazer e fonte alimentar. As fontes alimentares, no decorrer dos últimos séculos, sofreram rotineiramente com impactos oriundos de ação antrópica. Dentre os organismos utilizados para o consumo humano destacam-se os mexilhões. No Brasil, o mexilhão mais utilizado é *Perna perna*. Devido a sua importância econômica e social, identificar e compreender possíveis alterações advindas da ação humana tornam-se necessários tanto para a espécie de molusco quanto para os seus consumidores. Desta maneira, objetivou-se neste estudo analisar o uso do ciclo reprodutivo de *P. perna* como biomarcador de contaminação ambiental de bancos naturais da zona costeira. Para tal, foram coletados organismos em área antrópica (P1 – Vitória) e área de referência (P2 – Setiba) ao longo de doze meses. Os animais foram retirados de substratos consolidados, em maré baixa, quando expostos ao ar. Os filamentos do bisso foram desprendidos com auxílio de faca de mergulho e os espécimes foram imediatamente acondicionados em potes plásticos contendo água do mar. Em laboratório, os espécimes foram analisados macroscopicamente e encaminhados para análises microscópicas a partir de processos histotécnicos padrões. As análises de 712 organismos indicaram que os animais do ponto amostral Vitória são afetados diretamente pela ação antrópica presente na região, uma vez que apresentam maior incidência de atresia celular (média de 3.825 em Vitória para 1.58 em Setiba). Essa atresia, associada a disponibilidade de fontes alimentares neste ambiente antrópico indicam menor viabilidade dos gametas e consequentemente influencia no sucesso reprodutivo da espécie neste local. Em decorrência desses fatores, é provável que para compensar o baixo recrutamento esses organismos estejam produzindo e liberando gametas continuamente durante o decorrer do ano, vide que Vitória apresenta significância estatística para o estágio III-A. Além disso, em Vitória, a razão sexual é desviada para machos ( $X^2$  1.20), uma vez que as fêmeas são os maiores alvos de estressores e contaminantes ambientais. Portanto, com os resultados obtidos, conclui-se que o ciclo reprodutivo de *P. perna* é um excelente biomarcador para a contaminação ambiental.

**Palavra chave:** Antropogênico. Biomonitoramento. Costão Rochoso. Histologia. Reprodução.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da evolução humana utiliza-se os oceanos como fonte indispensável para a vida e sobrevivência e, em decorrência de sua utilização, as áreas costeiras estão entre as mais ameaçadas por poluição no planeta, principalmente devido à pressão sofrida sobre sua integridade, equilíbrio ambiental, conflitos de uso (ABREU, 2015) e do falso pensamento de que a capacidade do mesmo de receber dejetos e resíduos é ilimitado (ASLAN *et al.*, 2017).

Os oceanos recebem diariamente compostos antropogênicos, na forma de milhões de toneladas de produtos químicos sintéticos, nutrientes e outras substâncias que se dirigem para o ambiente marinho, resultando em uma série de efeitos adversos sobre organismos não alvos (DAVIES & MCKIE, 1987; BAYNI & MARQUES, 2003). Os impactos causados por essas substâncias que entram nos oceanos não são facilmente estimados, mas sabe-se que a toxicidade é aumentada se o composto é persistente e móvel no ambiente (ROMANO, 2007).

Os aportes tóxicos mais comuns em áreas costeiras são os de origem orgânica, oriundos de despejos de esgoto doméstico, agrícola e industrial (BARRETO *et al.*, 2013; ASLAN *et al.*, 2017), além de fármacos e nanofármacos (GAW *et al.*, 2014; PRICHARD & GRANEK, 2016). Também estão expostos a hidrocarbonetos (MIRONOV, 1968; CRAPEZ, 2001), resíduos orgânicos e inorgânicos como os metais pesados (NAKATO & AVILA-CAMPOS, 2012) e os agrotóxicos (FERREIRA *et al.*, 2006; BORSOI *et al.*, 2014), compostos orgânicos de estanho, em particular o tributilestanho (TBT) (SMITH, 1981; ALZIEU *et al.*, 1986; GODOI *et al.*, 2003), por fim, microplásticos (GREGORY, 2009; ANDRADY, 2011).

Para o monitoramento desses diferentes tipos de poluentes, técnicas químicas, físicas e biológicas podem ser empregadas. As técnicas físico-químicas podem ser mais precisas para mensurar os poluentes ou os parâmetros abióticos. Entretanto, esses métodos são caros e países em desenvolvimento não possuem as condições econômicas e tecnológicas para que essas análises aconteçam rotineiramente. Assim, as técnicas que avaliam a qualidade do meio ambiente por meio das condições dos organismos são métodos mais acessíveis, bem como confiáveis. Tais métodos envolvem dois fatores principais, são os organismos bioindicadores de poluição, onde sua presença, abundância e condição são indicativos de certa condição ambiental (MARQUES *et al.*, 2016) e além deles, organismos com funções biomarcadoras, na qual características moleculares,

celulares, fisiológicas ou comportamentais que são expressadas quando o organismo é exposto aos efeitos subletais de contaminantes ou condições ambientais adversas (MARQUES *et al.*, 2016).

Os bivalves, são amplamente utilizados em biomonitoramentos e biomarcação ao redor do mundo (FERREIRA *et al.*, 2013), principalmente por serem organismos filtradores. Ao realizar tal prática filtram grandes volumes de água que banha as brânquias onde retêm as partículas orgânicas e inorgânicas em suspensão (RIISGÅRD, 2001). Dentre as partículas orgânicas estão associados agentes patogênicos (*e.g.* bactérias, vírus e parasitas) e químicos (metais pesados, agrotóxicos, TBT, entre outros) (MORAES, 2000). Desta maneira, por meio da bioacumulação e biomarcação esses organismos refletem as características ambientais do corpo d'água onde vivem (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2013).

A característica descrita acima, somado ao fato de serem organismos sésseis, tornam os bivalves excelentes instrumentos em biomonitoramentos. Nesta classe destaca-se a espécie *Perna perna* ou mexilhão marrom, maior mitilídeo nativo brasileiro (KLAPPENBACH, 1965; FERREIRA *et al.*, 2013; PIERRI *et al.*, 2016), podendo atingir até 182 mm (MAGALHÃES, 1998). Ocorrem na Venezuela, costa brasileira de Pernambuco até o Uruguai, especialmente do Rio de Janeiro a Santa Catarina (RIOS, 2009), na África a espécie se encontra na África do Sul, Marrocos, Angola, Namíbia, nas ilhas de Cabo Verde, na costa índica de Moçambique e na costa oeste de Madagascar (WOOD *et al.*, 2007; PIERRI *et al.*, 2016). *P. perna*, não apresenta dimorfismo sexual externo, mas no período reprodutivo, os machos apresentam coloração gonadal branco/leitoso e as fêmeas, gônadas alaranjadas/vermelho tijolo (HENRIQUES, 2004). O hermafroditismo já foi descrito (LUNETTA, 1969; GALVÃO *et al.*, 2006; MARCHIORI, 2013). A fecundação ocorre na água, os gametas são liberados por estímulos físico-químicos, especialmente a concentração de nutrientes e variação repentina da temperatura ou salinidade (LUNETTA, 1969). A larva da espécie é planctônica e sua fixação ocorre em substratos como talos da alga *Ulva fasciata* (fixação primária), costão rochoso ou outra superfície dura (fixação definitiva), onde formam densas populações (*i.e.*, bancos naturais) que podem se localizar em áreas expostas a ação das ondas ou áreas abrigadas (FREITAS, 1997). A reprodução pode ser prejudicada pela presença de patógenos, especialmente trematódeos Bucephalidae que são parasitas do sistema reprodutor, além de poliquetas e caranguejos que perfuram a concha e danificam o manto (MARQUES & LIMA-

PEREIRA, 1998; HENRIQUES, 2004).

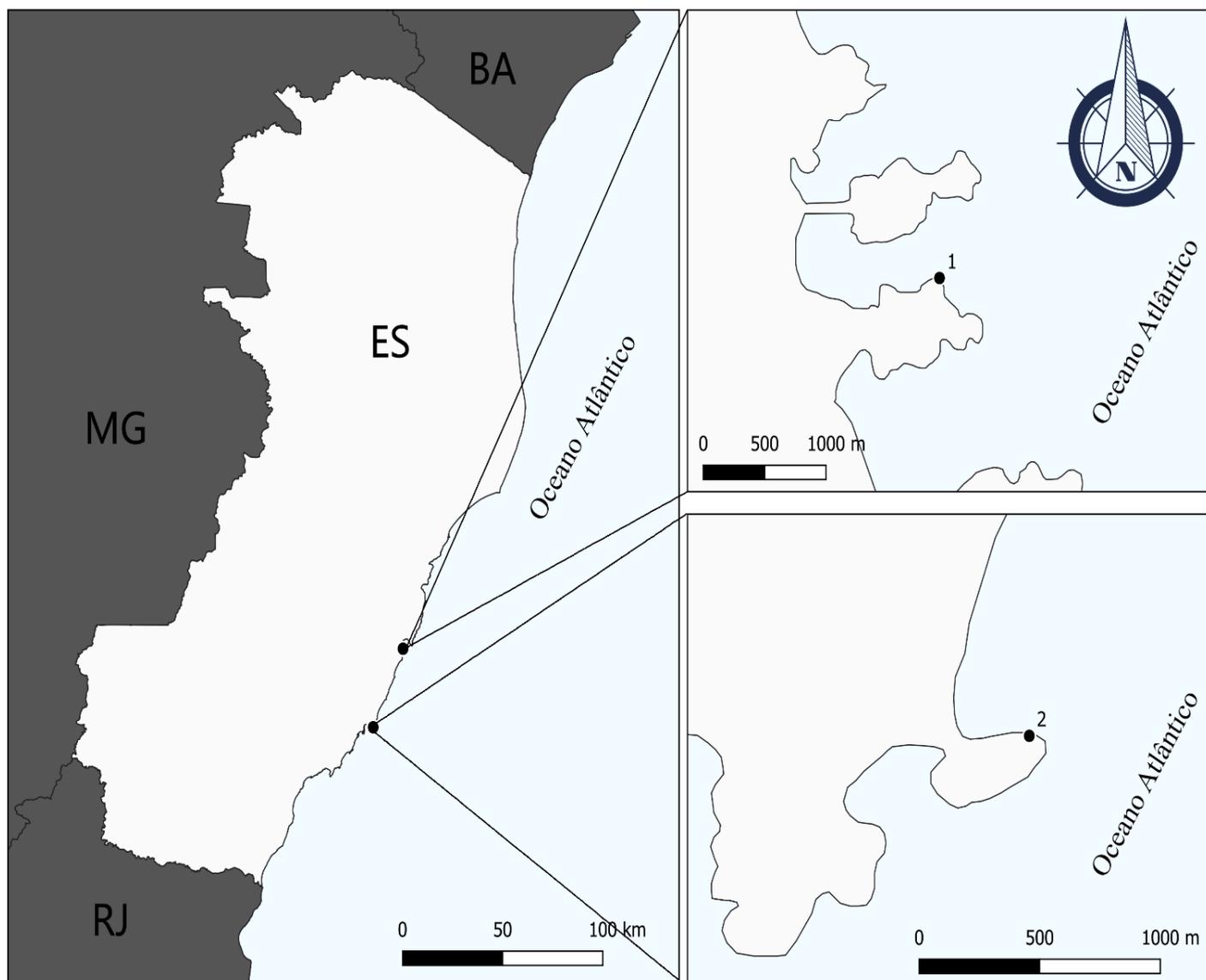
Devido à sua ampla distribuição na costa brasileira é a espécie mais utilizada como indicadora do nível de poluição marinha (FERREIRA *et al.*, 2013). Para tal, diferentes tipos de metodologias vêm sendo utilizadas a fim de detectar a bioacumulação de contaminantes nestes animais (MALAGRINO, 2003; MAIA *et al.*, 2006; GALVÃO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2013; CAMARGO, 2018). Entretanto, poucos estudos utilizaram técnicas histomorfológicas com esse propósito (LIMA *et al.*, 2001; HENRIQUES, 2004, GARCIA & MAGALHÃES, 2008) apesar dessas análises permitirem avaliar alterações causadas por poluentes nos tecidos a nível celular.

Tendo ciência de que o ecossistema aquático é considerado o mais susceptível à contaminação (BERTOLETTI, 1990) por diferentes compostos antropogênicos, que *P. perna* é um excelente biomarcador da qualidade ambiental e a detecção dos efeitos tóxicos dos poluentes pode se dar ao nível tecidual, objetivou-se avaliar as alterações gametogênicas do ciclo reprodutivo de *P. perna* coletados por um ano, em bancos naturais em área antropogênica e uma área de referência, por meio de duas diferentes abordagens, análises macroscópicas e microscópicas. Vale ressaltar que a espécie foco possui alto valor nutricional e econômico, sendo consumida e comercializada por toda costa brasileira.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. ÁREA DE ESTUDO

Os exemplares de *P. perna* foram coletados em dois pontos amostrais (Figura 1) no litoral do estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil, durante um ano (maio de 2017 à abril de 2018). O ponto um (P1), localizado em Vitória (20°18'27.9"S 40°16'44.5"W) está situado em área altamente antropogênica e comprovadamente contaminada por compostos organoestânicos, metais pesados, esgoto, resíduos sólidos (JESUS *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2008; ORTIZ, 2010; COSTA *et al.*, 2013; PODRATZ *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2017). A área é abrigada da ação das ondas por diversos afloramentos rochosos e a praia é classificada como reflectiva (PAVANI, 2006; OTEGUI *et al.*, 2019). O ponto dois (P2), localizado em Setiba (20°38'07.6"S 40°25'23.6"W), é considerado área controle (ORTIZ, 2010; COSTA *et al.*, 2017) por não possuir aporte fluvial e urbanização próxima. Em virtude da ação das ondas e pela exposição à ação do mar, essa praia é classificada como exposta e dissipativa (PAVANI, 2006; OTEGUI *et al.*, 2019).



**Figura 1:** Localização dos pontos onde foram amostrados os exemplares de *Perna perna*. Vitória (P1) localizado na região central e Setiba (P2) localizado na região sul do Estado do Espírito Santo.

## 2.2. COLETA DOS INDIVÍDUOS

Em cada ponto foram coletados mensalmente 30 indivíduos com comprimento de concha variando entre 04 a 07 cm, visando garantir a obtenção de indivíduos em período reprodutivo, que para esta espécie inicia a partir de 03 cm (GALVÃO *et al.*, 2006). Todas as amostragens ocorreram durante a maré baixa, quando o costão rochoso estava completamente exposto ao ar. Após a secção dos filamentos bissais os organismos coletados foram acondicionados em potes plásticos contendo água do mar e transportados vivos para análise.

### 2.3. TEMPERATURA ATMOSFÉRICA E MÉDIA DE PRECIPITAÇÃO

Os níveis de precipitação e temperatura atmosférica foram obtidos a partir dos dados fornecidos pelo Instituto Capixaba de Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) a partir de boletins trimestrais fornecidos sobre o estado no qual os pontos amostrais estão inseridos.

### 2.4. ANÁLISES MACROSCÓPICAS

Em laboratório, os organismos epibiontes foram removidos para melhor manuseio dos exemplares e acurar as análises, as conchas foram abertas, o sexo foi identificado a partir da coloração gonadal (*i.e.*, laranja para fêmeas e creme para machos) e os estádios de desenvolvimento gonadal macroscópico foram classificados (LUNETTA, 1969).

### 2.5. ANÁLISES MICROSCÓPICAS

As gônadas dos seis primeiros machos e das seis primeiras fêmeas em cada ponto/mês foram selecionadas e acondicionadas em cassetes, fixados em formalina em tampão fosfato por 48 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas em água corrente por 10 minutos e preservadas em álcool 70%. As gônadas passaram pelo processo de desidratação em série crescente de etanol, diafanização em xilol e impregnação em parafina (54-56°C). Após a impregnação, as gônadas foram incluídas em parafina (56-58°C) para realização de cortes seriados de 05 µm em micrótomo com navalha de aço, onde os cortes do tecido respeitaram a posição anatômica dos animais. Os cortes foram montados em lâminas histológicas, corados em solução de Hematoxilina e Eosina (HE) e cobertas por lamínulas. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, sendo quatro campos de cada tecido fotografados em câmera acoplada e analisadas no software de processamento de imagens digitais (ImageJ). Os estádios de desenvolvimento das gônadas foram identificados de acordo com Barreira & Araujo (2005) e Morsan & Kroeck (2005). Os oócitos foram identificados, contados e tiveram sua área medida conforme técnica usada por Corte (2014).

### 2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica 10. Foram considerados significativos valores em  $p < 0,05$ . A normalidade foi testada com o teste de

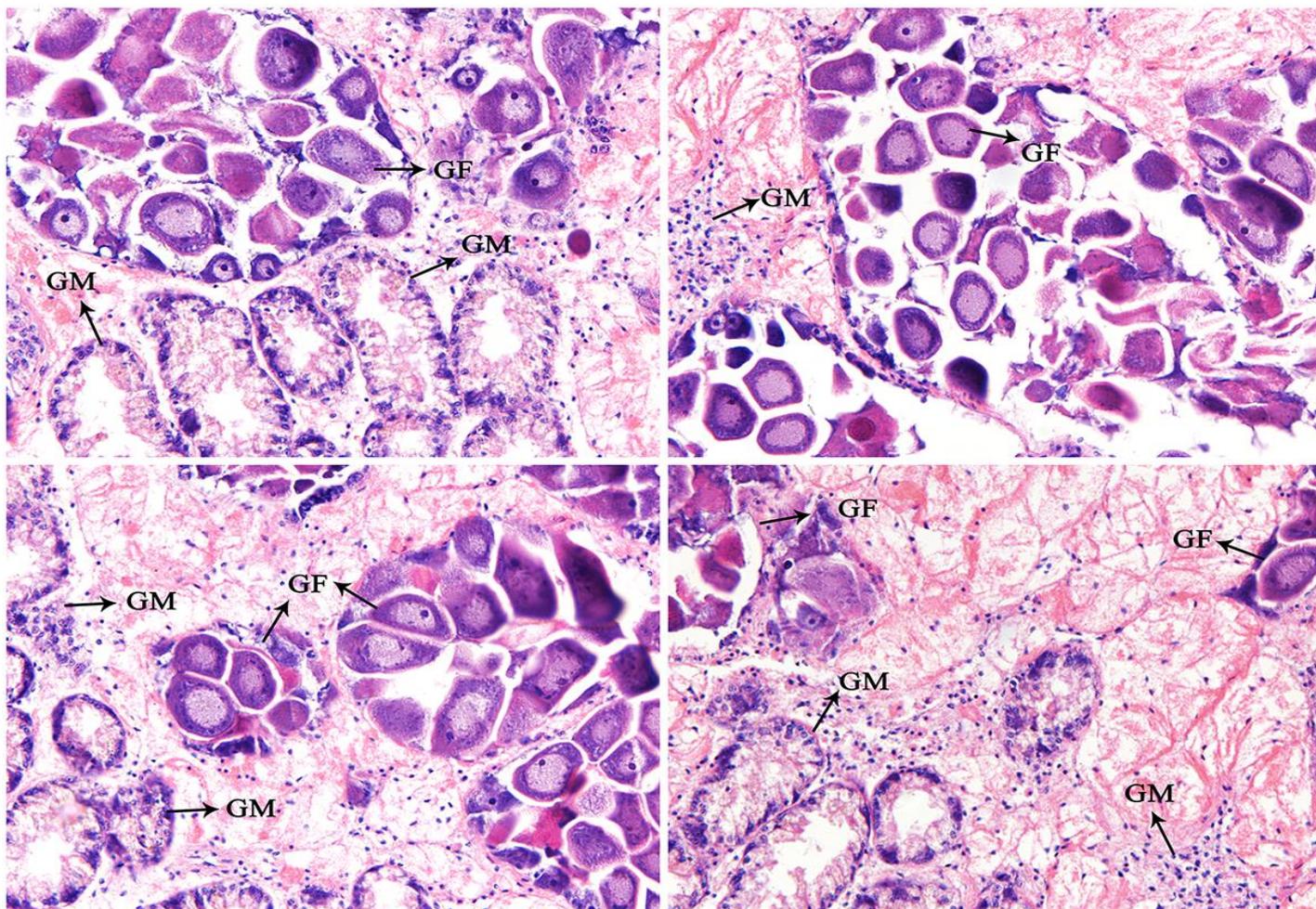
Shapiro-Wilk e a homocedasticidade com o teste de Levene, em anormalidade, realizou-se a transformação logarítmica de base dez. A razão sexual foi estimada a partir do número total de machos e fêmeas e possíveis diferenças na razão sexual foram verificadas com o teste qui-quadrado. Valores inferiores a 1 indicam um desvio na população para fêmeas e valores acima de 1 indicam um desvio para macho (BIRCHENOUGH *et al.*, 2002).

O teste de Kruskal-Wallis foi usado para detectar as diferenças entre os estádios de maturação gametogênica macro e microscópico, os estádios de maturação gametogênica e a quantidade de oócitos e em todos os casos foram comparados entre os pontos e meses amostrais. *A posteriori* para o teste foi realizado o teste de comparações múltiplas para detectar diferenças entre as informações geradas. A prevalência entre os acertos será calculada a partir da porcentagem de resultados compatíveis obtidos comparando as análises macroscópicas dos estádios sexuais e as microscópicas.

Para comparar possíveis diferenças nos resultados obtidos na descrição macroscópica e microscópica dos estádios gametogênicos foi realizado um *test t*. O diâmetro médio dos óvulos maduros e o comprimento dos mesmos foram comparados entre as duas áreas e entre os meses a partir do teste ANOVA *one-way* com *a posteriori* do teste de Tukey.

### **3. RESULTADOS**

Ao longo do período amostral foram coletados cerca de 1000 indivíduos nos dois pontos amostrais, sendo 712 exemplares analisados macroscopicamente e 288 analisados microscopicamente. A classificação macroscópica dos estádios sexuais foi confirmada posteriormente por meio das análises histológicas. Obteve-se 349 machos (189 no P1 e 160 no P2) e 326 fêmeas (163 tanto no P1 quanto no P2). Além disso, em 36 indivíduos analisados macroscopicamente oriundos do P2 não foi possível a identificação do sexo devido ao repouso sexual (*i.e.*, estágio zero).



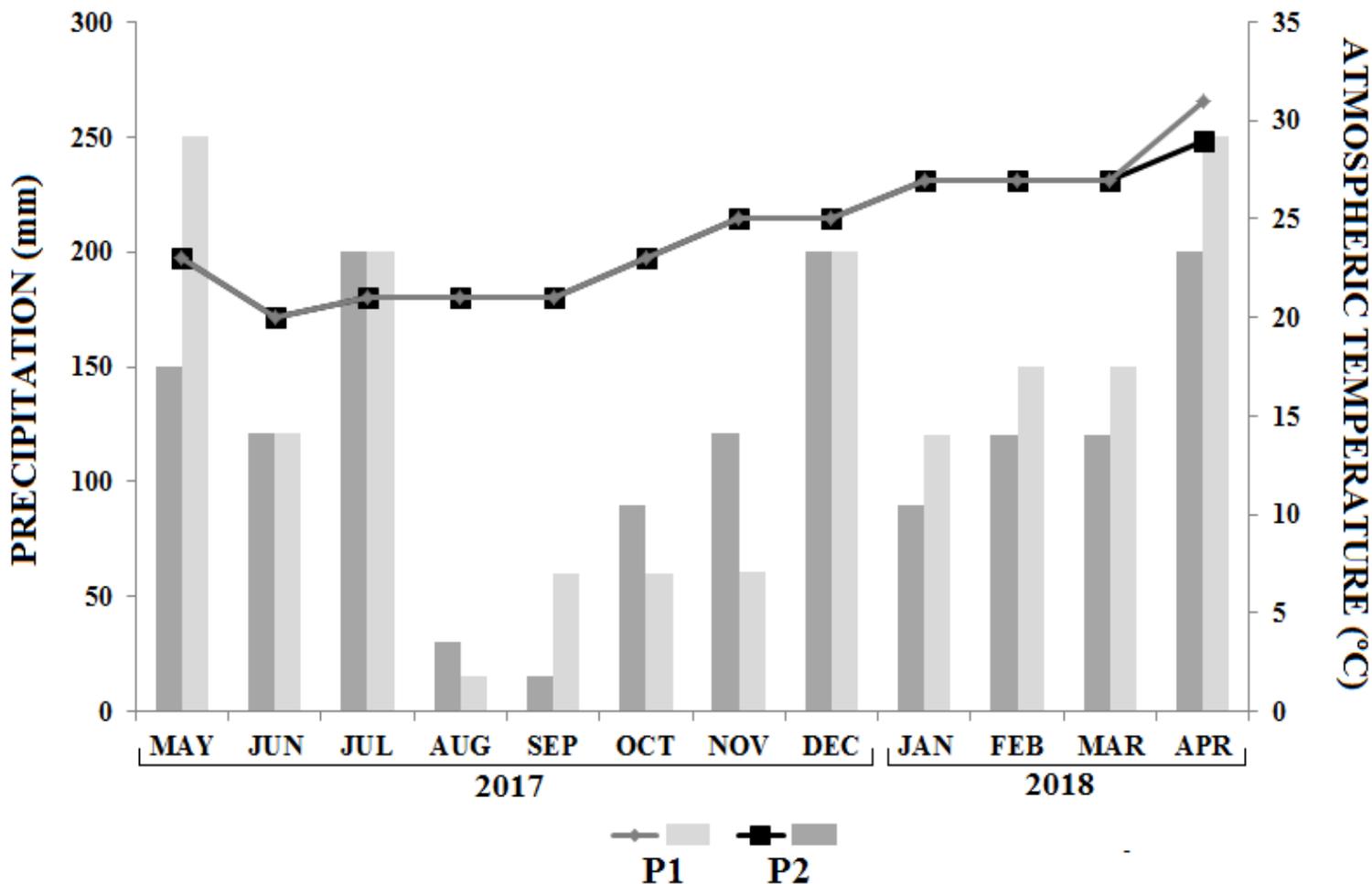
**Figura 2:** Indivíduo de *Perna perna* hermafrodita encontrado em Vitória no mês de março de 2018. GF, gametas femininos; GM, gametas masculinos.

### 3.1. RAZÃO SEXUAL

Analisando a razão sexual total de cada ponto amostral observou-se proporção entre os sexos de 1.02 para Setiba e 1.20 para Vitória. Em relação aos meses amostrados, a razão sexual não apresentou diferença significativa em Setiba e em Vitória ( $X^2$  9.2358 e  $X^2$  6.9503, respectivamente).

### 3.2. TEMPERATURA ATMOSFÉRICA E PRECIPITAÇÃO MÉDIA

Os pontos amostrais estão localizados em uma região climatologicamente homogênea, de acordo com o INCAPER (2020). Ao longo do período amostral a precipitação variou entre os pontos (Figura 2), sendo que em P1 houve incidência maior no nível de precipitação se comparado a P2. Com relação à temperatura atmosférica, não houve diferença entre os dois pontos amostrais, exceto para o mês de abril.



**Figura 3:** Valores médios mensais da precipitação e temperatura do ar entre os pontos amostrais P1 e P2 ao longo dos meses de estudo. Fonte: INCAPER (2020).

### 3.3. ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO GONADAL

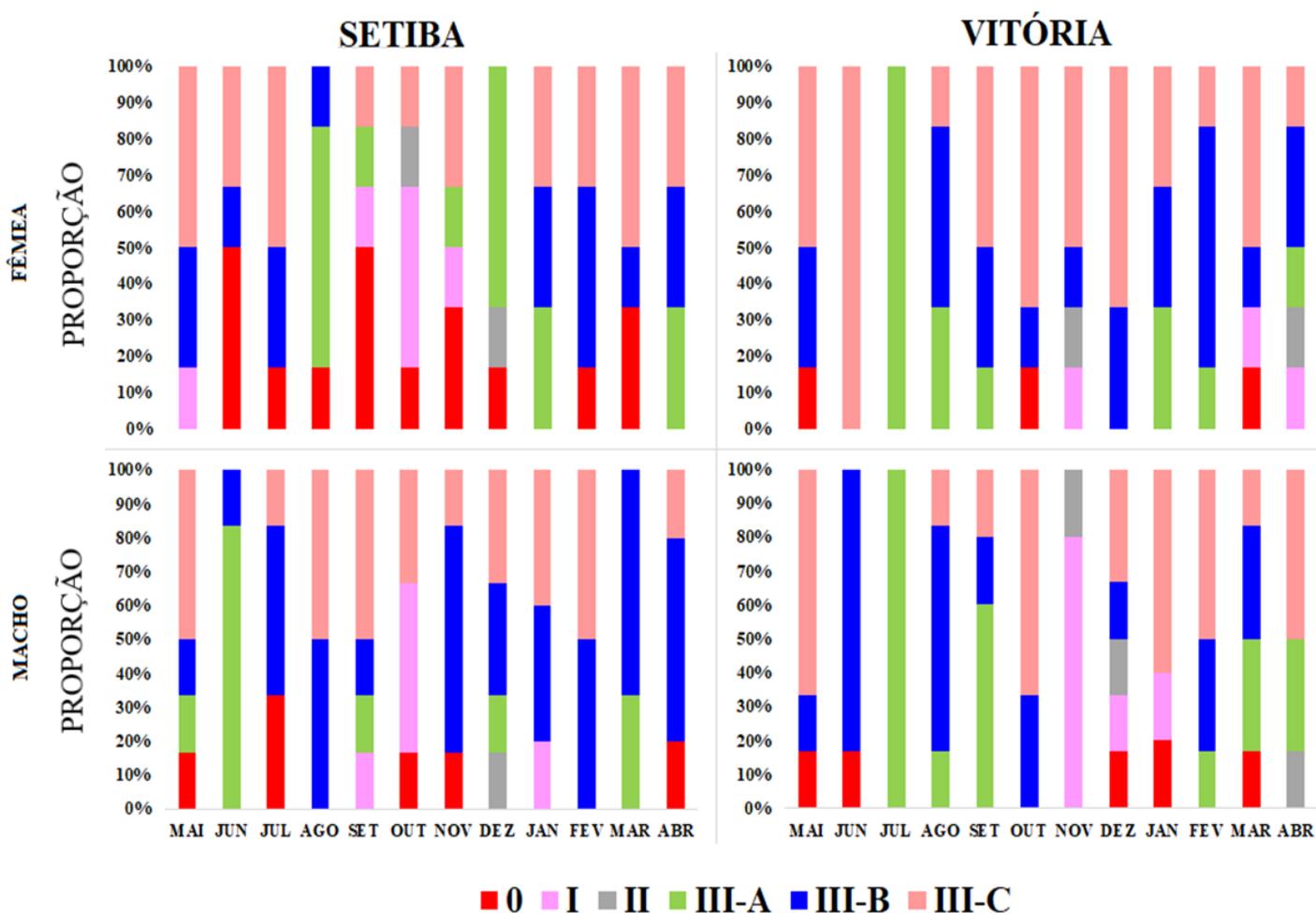
#### 3.2.1. Avaliação microscópica dos estádios de maturação gonadal

O período de recuperação gamética são aqueles em que se observa mais de 50% dos indivíduos em estádios gonadais III-C ou 0, pois a gônada está finalizando seu ciclo reprodutivo e entrando em pausa para o início de novo ciclo. São considerados como períodos de liberação de gametas quando mais de 50% dos indivíduos apresentam estádios gonadais III-A e III-B, ou seja, encontram-se maduros e estão eliminando os gametas.

À nível microscópico no P2 é principalmente para a fase de recuperação gamética, exceto para os meses de fevereiro, março e abril, onde predomina a liberação gamética. Já para P1, houve liberação gamética nos meses de junho a setembro e de novembro a abril, nos meses de maio e outubro predomina a recuperação gamética. Comparando mês a mês,

P2 apresentou liberação gamética sincrônica entre os sexos na maior parte dos meses (maio, outubro, janeiro, fevereiro e abril), as fêmeas liberam gametas antes meses de julho, setembro e março e os machos liberam antes nos meses de junho, agosto, novembro e dezembro. Para o P2 Vitória, a liberação de gametas é sincrônica nos meses de maio a agosto, outubro, dezembro e janeiro, sendo assincrônica, com liberação anterior das fêmeas em junho, setembro e março e para machos em novembro, fevereiro e abril.

Sobre a maturação gametogênica (Figura 4), os resultados do teste de Kruskal-Wallis indicaram que há diferença significativa no estágio 0 (H: 5,60, p=0.024) e IIIC (H:1,99, p=0.045) para P2 e para P1 há diferença para o estágio IIIA (H: 2,30, p=0.009). O teste indicou ausência de significância para os estádios I, II e IIIB entre os dois pontos. O teste não demonstrou diferença significativa para os estádios gonadais entre os sexos e entre os meses amostrais (Figura 4).

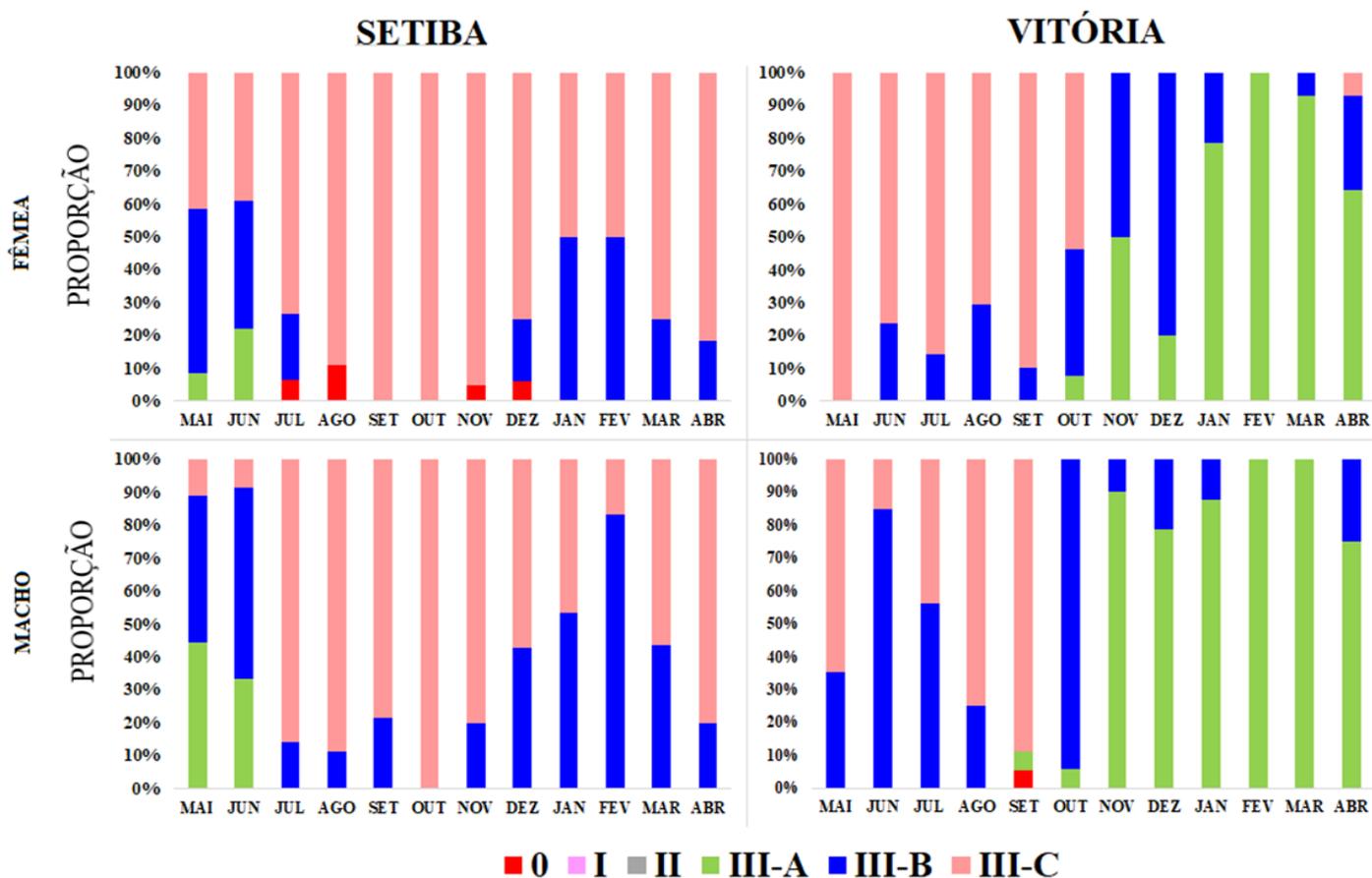


**Figura 4:** Distribuição temporal (%) dos estádios gametogênicos microscópicos de *Perna perna*, machos e fêmeas, coletados em P1 e P2, ao longo de um ciclo anual.

### 3.2.2. Avaliação macroscópica dos estádios de maturação gonadal

Sobre o estado gonadal macroscópico, houve em P2 maior incidência de recuperação gonadal, todavia, esse fenômeno não foi observado em janeiro, fevereiro, maio e junho, onde houve predomínio de liberação de gametas. Para P1, a recuperação gonadal ocorreu de maio a setembro e a liberação dos gametas ocorreu de outubro a abril, com o ápice de liberação no mês de fevereiro. Além disso, observa-se que P2 apresentou sincronia na liberação de gametas entre os sexos durante todos os meses amostrais. Entretanto, em P2 observou-se sincronia na liberação de gametas em maio, agosto, setembro, novembro e de janeiro a abril. Nos demais meses, fêmeas liberaram os gametas antes dos machos.

O teste de Kruskal-Wallis indicou diferença significativa entre os pontos à nível macroscópico (Figura 5) para P2 no estágio 0 (H: 2,04, p=0.014) e III-C (H: 0,046, p=0.045). Em contrapartida, P1 apresentou significância para o estágio III-A (H: 2,30, p=0.009). O teste indicou que não há diferença significativa entre os pontos para o estágio I, II, IIIB, além da ausência para os sexos e meses amostrais.



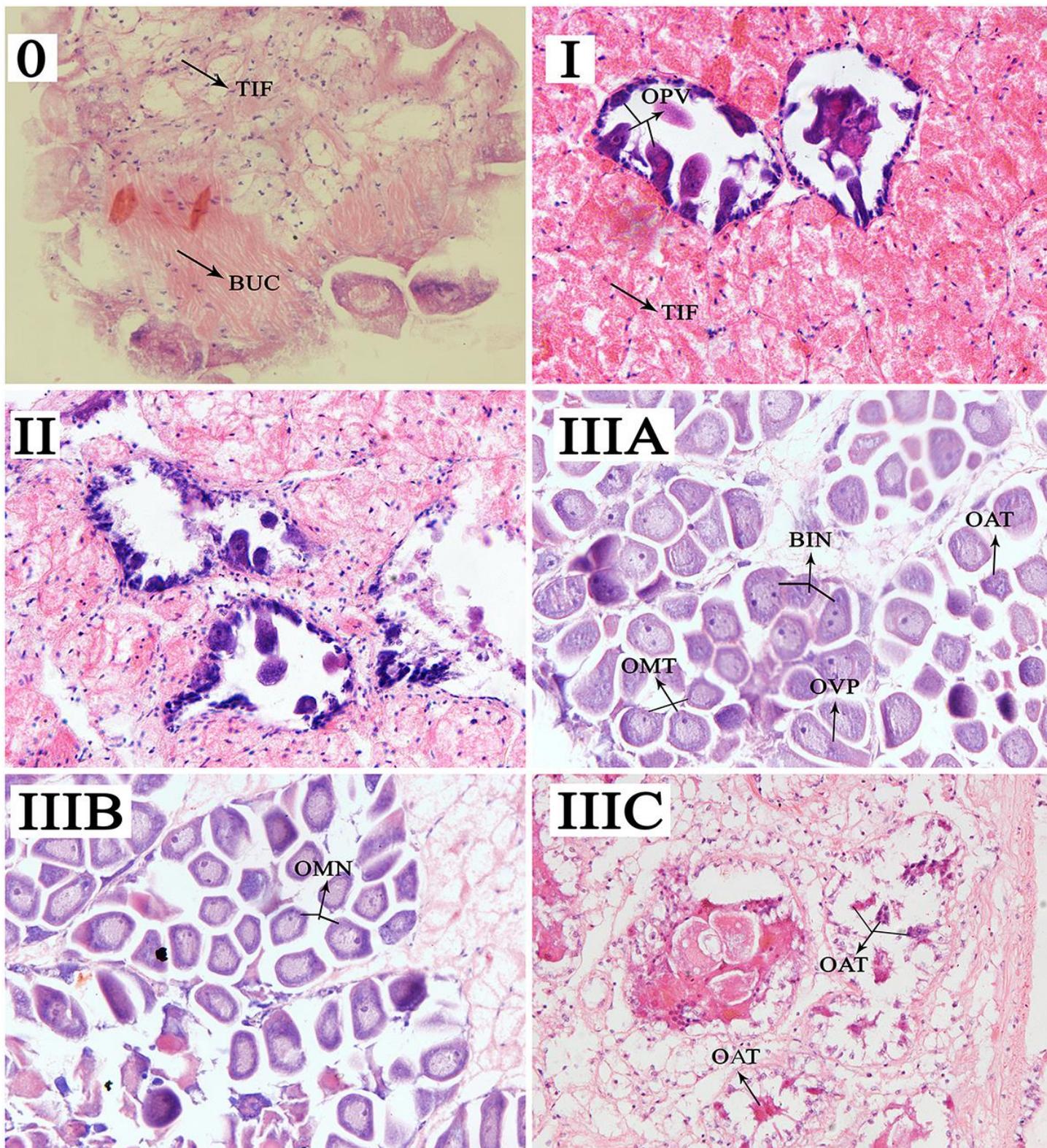
**Figura 5:** Distribuição temporal (%) dos estádios gametogênicos macroscópicos de *Perna perna*, machos e fêmeas, coletados em P1 e P2, ao longo de um ciclo anual.

### 3.2.3. Prevalência de acerto entre metodologias

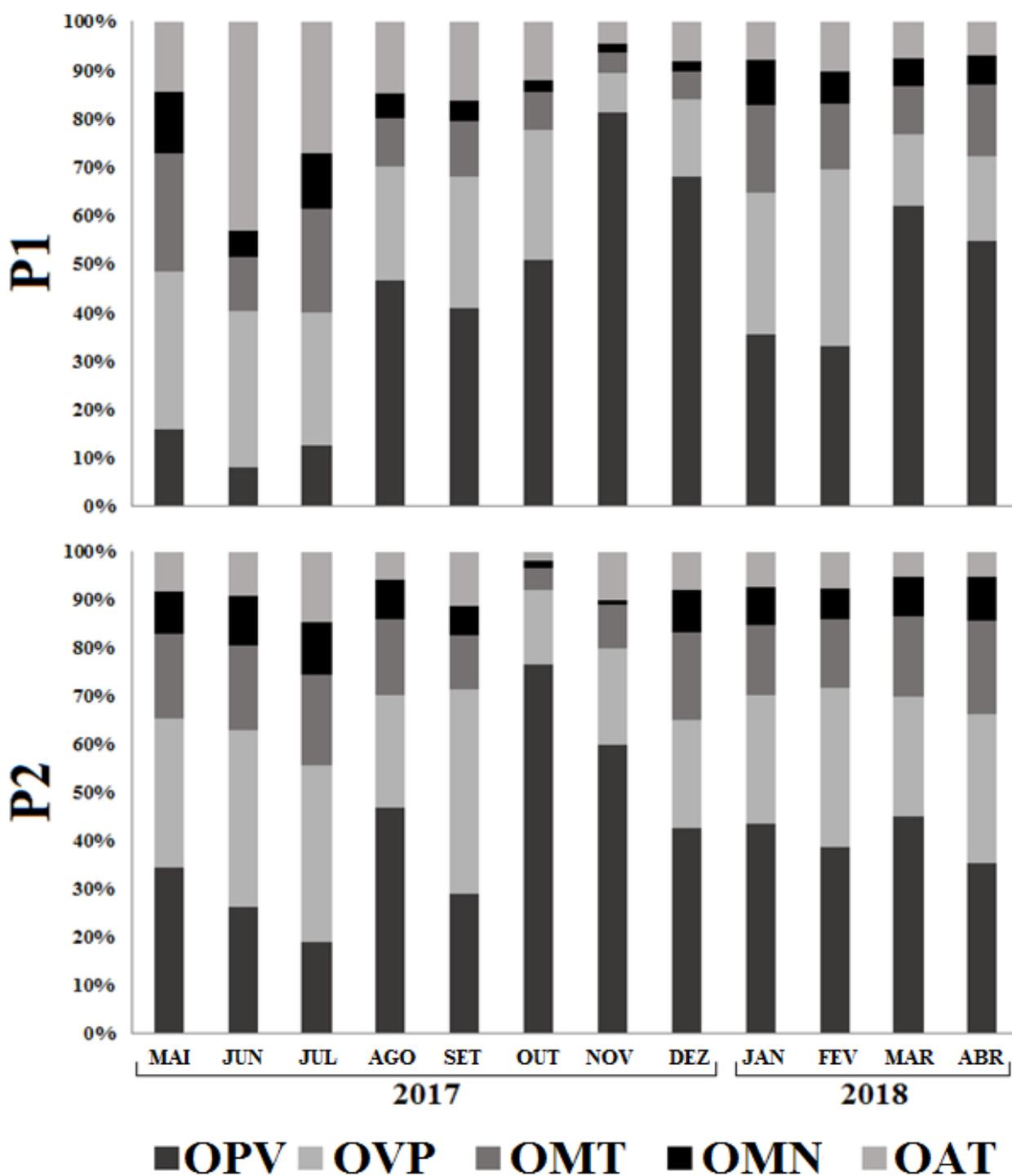
Quando comparadas as duas metodologias, macroscópica e microscópica, para avaliar os estádios de desenvolvimento gonadal, observou-se que a prevalência de acertos (*i.e.*, comparando nos mesmos animais análises macroscópicas com os resultados microscópicos) para P2 foi de 84%, enquanto em P1 a prevalência foi de 88%.

## 3.4. VIABILIDADE GAMÉTICA FEMININA

Nas imagens microscópicas observa-se diferentes estádios gonadais e gaméticos de fêmeas em cada estágio sexual (Figura 6). O teste de Kruskal-Wallis indicou ausência de significância na viabilidade gamética entre os pontos amostrais para ovócitos pré-vitelogênicos (OPV), ovócitos vitelogênicos pedunculados (OVP), óvulos maduros totais (OMT) e óvulos maduros nucleados (OMN) (Figura 7), mas há diferença significativa para os óvulos atrésicos (OAT) para P1 ( $r: 3,29; p=0,001$ ). Com relação a atresia, entre os pontos, P2 apresentou média de 1.58 de OAT, enquanto P1 apresentou 3,825 de incidência de OAT, o que reitera a significância encontrada para este ponto amostral.



**Figura 6:** Exemplificação das fases de maturação gamética de *Perna perna* em cada estágio sexual baseado na classificação macroscópica, sendo: TIF – tecido interfollicular; BUC – filamentos do parasito bucefalídeo; OPV – ovócito pré-vitelogênico; BIN – óvulos binucleados; OAT – óvulo atrésico; OVP – ovócito vitelogênico pedunculado; OMT – óvulo maduro total; OMN – óvulo maduro nucleado.



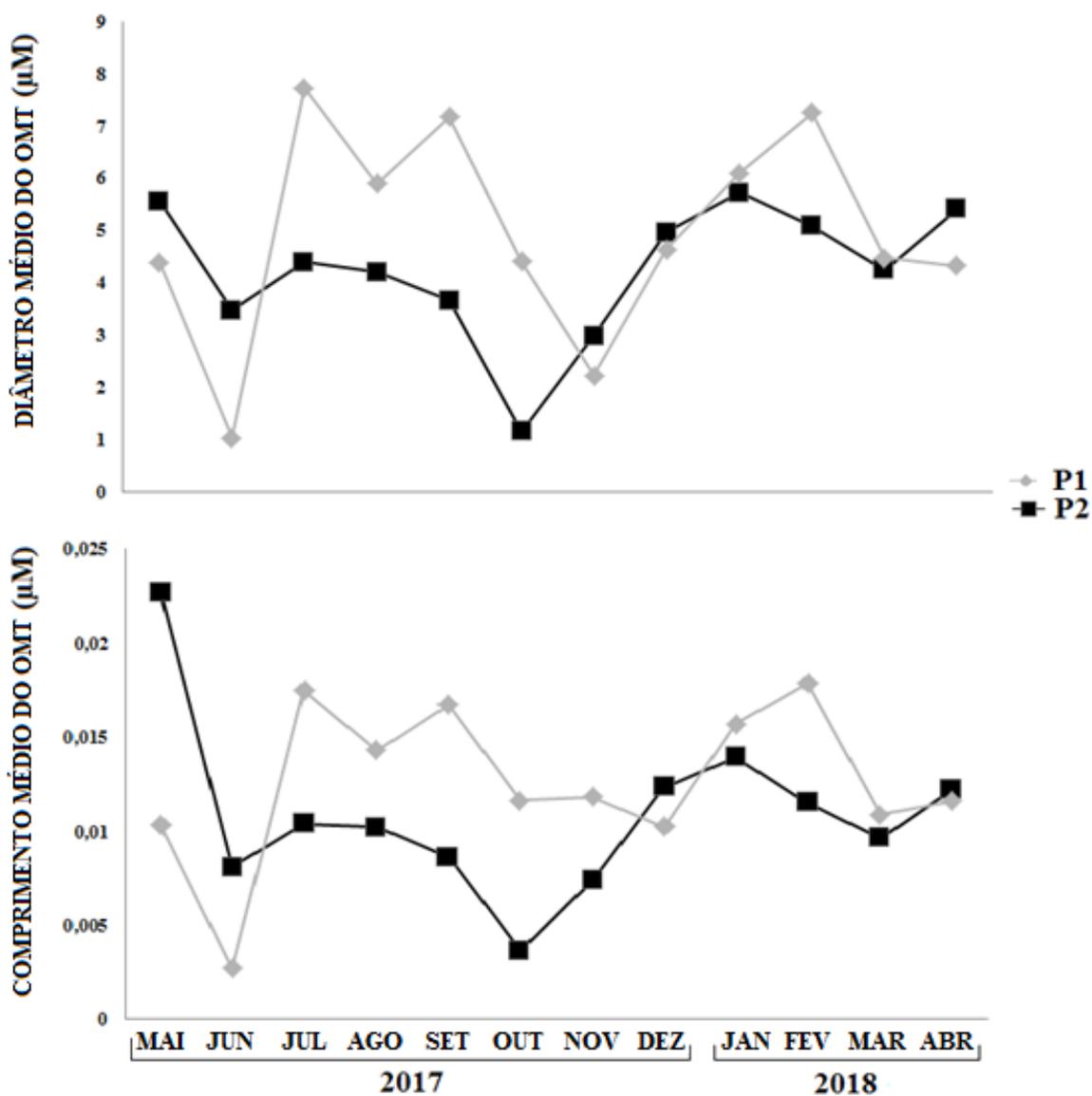
**Figura 7:** Frequência relativa (%) dos estádios de maturação gamética nos pontos de P1 e P2 entre os meses amostrais. PO, ovócitos pré-vitelogênicos; PVO, ovócitos vitelogênicos pedunculados; TMO, óvulos maduros totais; OMN, óvulos maduros nucleados; AO, óvulos atrésicos.

### 3.5. MEDIDAS HISTOLÓGICAS DOS ÓVULOS MADUROS TOTAIS

Nossos resultados indicaram que o diâmetro médio dos OMT (Figura 8) dos organismos coletados em Vitória é 14% superior aos valores encontrados em Setiba,

demonstrado que os óvulos maduros deste ponto apresentam maior área celular do que Setiba. Entretanto, o teste ANOVA demonstrou que não há diferença significativa entre os diâmetros dos OMT em relação aos pontos amostrais ( $F= 1,2403$ ;  $p=0,2774$ ) e meses amostrais ( $F=1,9180$ ;  $p=0,13919$ ). Vale ressaltar que nos meses de maio, junho, novembro, dezembro e abril os maiores valores ocorreram para o ponto amostral de Setiba.

Na Figura 8 também demonstra-se o comprimento dos óvulos, o ponto amostral de Vitória apresentou valor 13,66% maior que os óvulos oriundos da praia de Setiba. Apesar disso não houve diferença significativa entre os pontos ( $F=1,3396$ ;  $p= 0,25951$ ). O teste ANOVA indicou que não há diferença estatística ( $F=1,1163$ ;  $p=0,42424$ ) entre os valores de comprimento dos óvulos nos pontos/meses amostrais.



**Figura 8:** Valores médios do diâmetro e comprimento dos óvulos maduros totais (OMT) (µM) de *Perna perna* coletados em P1 e P2 ao longo do ano amostral.

## 4. DISCUSSÃO

Este artigo que buscou avaliar ciclo reprodutivo de *P. perna* como biomarcador de contaminação ambiental reflete um estudo pioneiro na região amostral. Nossos resultados evidenciam que regiões antrópicas sofrem com a diminuição da viabilidade dos gametas. Possivelmente por razões de disponibilidade alimentar e como reação a defasagem das células reprodutivas em áreas impactadas, o P1 apresentou liberação de gametas durante todo o ano, sem interrupção e com poucos espécimes em repouso sexual. Além disso, os resultados mostram que o ciclo reprodutivo de *P. perna* é sensível, influenciado por contaminantes ambientais, logo, um bom biomarcador. Contudo, a ação-resposta de cada composto sobre a reprodução desta espécie ainda precisam ser avaliados e analisados.

Estudos que exploram as razões sexuais das espécies são fundamentais para demonstrar a organização de uma população. Fatores genéticos, tais como genes de razão sexual ou genes determinantes do sexo, influenciam a variação da proporção sexual dos mitilídeos (SAAVEDRA *et al.*, 1997; KENCHINGTON *et al.*, 2002; YUSA *et al.*, 2013). Com base nesses fatores e em estudos de distribuição sexual, a proporção esperada para *P. perna* é 1:1, ou seja, em populações naturais para cada macho há uma fêmea (COE, 1943). Uma proporção sexual equilibrada é um bom indicativo de equilíbrio natural das populações (SILVESTRI *et al.*, 2018) e este equilíbrio igualitário foi observado, ao longo do estudo em P2, fato observado por Souza *et al.* (2019) em localidades regiões próximas a P2. Para P1, obteve-se uma razão sexual desviada para machos. Populações que tendem a machos foram encontradas em estudos com *P. perna* para outras localidades brasileiras (MAGALHÃES, 1998; MESQUITA *et al.*, 2001; GALVÃO *et al.*, 2006) e em um deles, conduzido por Galvão *et al.* (2006), em áreas com diferentes hidrodinamismos, observou-se que áreas expostas apresentam mais indivíduos machos do que as áreas abrigadas a fim de aumentar as chances de fecundação. O P1 é uma área exposta, demonstrando o hidrodinamismo pode ter afetado a distribuição dos sexos. Ademais, P1 se localiza em área antropizada por diferentes tipos de contaminantes, incluindo os COEs, como o TBT (COSTA *et al.*, 2017), composto reconhecido como desregulador endócrino e que pode afetar a reprodução de diversas espécies, incluindo a razão sexual, assim como observou Evans *et al.* (1991).

Alguns autores descreveram a ocorrência de indivíduos hermafroditas em *Perna perna* (COE, 1943; LUNETTA, 1969; GALVÃO *et al.*, 2006), porém outros autores (KRAMPAH *et al.*, 2016; SILVESTRI *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019) indicam que este

fenômeno se faz raro na natureza. Segundo Lee (1988) possivelmente a ocorrência ocasionalmente relatada de hemafroditas pode ser fruto de erro de identificação, dado que a espécie é gonocórica. Apesar dessa observação contrária ao hermafroditismo, em nossas análises histológicas dos 288 indivíduos, um deles ocorreu este fenômeno, confirmando que embora raro, pode acontecer.

Com os resultados observados de temperatura e pluviosidade, percebe-se que as áreas amostrais não apresentam variações na temperatura, mas que existe variação pluviométrica. Essas oscilações de chuva estão entrelaçadas com os períodos de liberação de gametas observados neste estudo, uma vez que assim como observado por Lenz (2008) para a espécie *Crassostrea rhizophorae*, a pluviosidade pode diminuir a salinidade e consequentemente estimular a liberação de gametas.

Observamos também que existe liberação contínua de gametas durante todo o ano, evento suportado por outros estudos (LUNETTA, 1969; MORALES, 1983; MAGALHÃES *et al.*, 1987; ARAÚJO, 1994; GALVÃO *et al.*, 2006). Observou-se que há diferença na recuperação (estádios III-C e 0) e liberação (estádios III-A) de gametas entre os pontos.

Em P2, apesar de ocorrer significância para recuperação gamética, em todos os meses ocorre também a liberação gamética, sendo o ápice em fevereiro e junho. Tais resultados seguem o que foi observado por Lunetta (1969) com pequenas variações, este autor cita que o repouso atinge apenas uma parcela das populações, principalmente de outubro a dezembro. Em nosso estudo a liberação de gametas ocorreu de julho a setembro e abril, mas apenas uma pequena parcela da população e períodos de reprodução acentuada de abril a junho e janeiro e fevereiro – (diferente do Lunetta (1969), que encontrou outro pico em Setembro). Para P1 a liberação de gametas se estende de outubro a abril, já o repouso sexual ocorre apenas em setembro, sendo esses resultados similares aos encontrados por Silvestri *et al.*, (2018) para Angra dos Reis, área potencialmente impactada por ações antrópicas. Os padrões observados em P1 podem ser explicados devido ao baixo recrutamento do local, altamente impactado por compostos antropogênicos e que podem estar alterando o sucesso da fecundação entre os animais. Portanto, é possível que haja maior liberação de gametas para potencializar as chances de fecundação e o sucesso reprodutivo da espécie. Outro fator preponderante para a liberação de gametas é a disponibilidade de nutrientes e de fontes alimentares para o desenvolvimento gônado-somático (CHONCHENCHOB, 1980; COCHÔA &

MAGALHÃES, 2008). Regiões tropicais não antropizadas são menos influenciados por oscilações na disponibilidade de fontes alimentares, e em contrapartida, regiões como P1 que são caracterizadas pela eutrofização do ambiente, que resulta em maior aparecimento de fitoplâncton e zooplâncton (fontes alimentares de *P. perna*). Dessa forma, com disponibilidade alimentar em concentrações maiores do que as necessárias para o desenvolvimento corporal, os organismos podem alocar mais energia para a reprodução, propiciando a reestruturação da população a partir de constantes ciclos reprodutivos.

Os estádios de maturação gonadal diferem entre os pontos, com exceção do estágio II que não foi encontrado na análise macroscópica em nenhum deles (principalmente pela ausência de um guia macroscópico sexual gonadal). Comparando a avaliação dos estádios macroscópicos com os microscópicos, a taxa de incidência de acerto foi elevada, demonstrando que na ausência da microscopia, o exame macroscópico é uma ferramenta eficaz para verificar os estádios sexuais. Para P2, nas análises microscópicas e macroscópicas, houve tendência para os estádios 0 e III-C, isso sugere que seu ciclo gonadal segue os padrões que foram observados por Lunetta (1969), indicando que essa região apresenta um sistema ecológico natural e equilibrado para *P. perna*. Em P1, a partir das análises observou-se a tendência para o estágio III-A, que como discutido, pode estar relacionado à alta taxa de inviabilidade gamética observados a partir da quantidade de células atrésicas. Essa atresia gamética poderia implicar em uma produção contínua de gametas quando associados a alta disponibilidade de recursos nutritivos, pois como salientou Magalhães (1998), os indivíduos necessitam de material de reserva para a reprodução. Assim, locais antropizados onde a disponibilidade de matéria orgânica é elevada, pode-se esperar que os indivíduos não necessitam de repouso sexual, já que a fonte energética é constante ou com pouca oscilação. Associando isso ao fato da espécie sofrer severos danos por atresia gonadal, é possível que esses indivíduos potencializam sua reprodução. Portanto, ao que parece, os indivíduos de P1 apresentem baixas taxas de repouso sexual e produção constante de gametas para reequilibrar a população.

Reitera-se que alterações ambientais podem prejudicar toda a cadeia trófica, uma vez que o mexilhão, em bancos naturais, são bioatratores de diversidade, sendo seus estoques quase 300 outras espécies, 20% delas exclusivas do microambiente fornecido pelo *P. Perna* (MAGALHÃES, 1998). Portanto, qualquer adversidade ocorrida nas populações de *P. perna* que diminuam a sua quantidade e abundância nos costões rochosos, podem afetar diretamente aos organismos que ali estão associados e que utilizam-se desses

mexilhões para uma interação biológica fundamental para o equilíbrio ecossistêmico.

Os dados obtidos demonstram que os animais de P1 são afetados diretamente pela ação antrópica, dado o elevado índice de atresia celular diminui a viabilidade dos gametas e por consequência, influenciam no sucesso reprodutivo da espécie, assim, para manter a capacidade reprodutiva, eles produzem e liberam gametas durante todo o ano, em altas quantidade e concentrações. Esses fatos somados podem justificar a razão sexual tendendo para os machos, pois segundo Costa *et al.* (2017) as fêmeas são as que mais sofrem com a presença de estressores e contaminantes. Isto leva a conclusão que o ciclo reprodutivo de *P. perna* é um excelente biomarcador para a contaminação ambiental, uma vez que, ao comparar as duas áreas amostrais e como os resultados indicaram, P1 foi reconhecida como área afetada por múltiplos impactos. Ressalta-se que a ação específica de cada fator que contribuiu para os resultados obtidos neste estudo precisam ser melhor investigados para adequar especificamente o ciclo de *P. perna* para cada estressor ou contaminante, assim, poderão ser delimitados especificamente para cada componente o tempo de resposta necessário para a biomarcação. Mas, já podemos concluir que o ciclo reprodutivo é viável como ferramenta de biomonitoramento.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C.T. Brazilian Coastal and marine protected areas importance, current status and recommendations. New York: United Nations - Nippon Foundation of Japan Fellowship Programme, p. 1-126, 2015.
- ALZIEU, C.; SANJUAN, J.; DELTRIEL, J.P.; BOREL, M. Tin contamination in Arcachon bay: Effects on oyster shell anomalies, *Marine Pollution Bulletin*. v, 17, 494–498, 1986.
- ANDRADY, A.L. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* v. 62, p. 1596-1605, 2011.
- ARAÚJO, A.A.B. Obtenção de sementes de mexilhão *Perna perna* (Bivalvia – Mytilidae) em estruturas manufaturadas, na Ponta do Papagaio, Palhoça – Santa Catarina. Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, p. 107, 1994.
- ASLAN, J.F.; PINTO, A.E.M.; OLIVEIRA, M.M. Poluição do meio ambiente marinho: um breve panorama dos princípios, instrumentos jurídicos e legislação brasileira. Macapá: Revista Internacional de Direito Ambiental e Políticas públicas, n. 9, p. 175-186, 2017.
- BAINY, A.C.; MARQUES, M.R.F. Global analysis of biomarker responses in aquatic organisms exposed to contaminants. *Comments on Toxicology*. v. 9 (5-6), 271-278, 2003).
- BARREIRA, C.A.R.; ARAÚJO, M.L.R. Ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca* 31, v.1, p. 9-20, 2005.
- BARRETO, L.V.; BARROS, F.M.; BONOMO, P.; ROCHA, F.A.; AMORIM, J.S. Eutrofização em rios brasileiros. *Enciclopédia biosfera*, v. 9, Centro Científico Conhecer –Goiânia, p. 2165-2179, 2013.
- BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. *Revista Ciência e Cultura*, v. 43, n. 3/4, p. 271-277, 1990.
- BIRCHENOUGH, A.C.; BARNES, N.; EVANS, S.M.; HINZ, H.; KRONKE, I.; MOSS, C. A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods. *Mar. Pol. Bull.* 44, 534-543, 2002.
- BORSOI, A.; SANTOS, P.R.R.; TAFFAREL, L.E.; JÚNIOR, A.C.G. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. *Acta Iguazus*. v. 3, n. 1, p. 86-100, 2014.
- CAMARGO, J.B.D.A. Efeitos biológicos da contaminação sobre bivalves filtradores de regiões do litoral de São Paulo, com ênfase na Baixada Santistas. Dissertação apresentada ao Departamento de Oceanografia Biológica da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 145, 2018.
- CHONCHEUNCHOB, P. Handing culture of the green mussel (*Mytilus smaragdinus* (Chemnitz) in Thailand. Manila: ICLARM, p. 102, 1980.
- COCHÔA, A.R.; MAGALHÃES, A.R.M. Perdas de sementes de mexilhões *Perna perna* (L., 1758), cultivados na baía norte – Ilha de Santa Catarina/SC. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2008.
- COE, W.R. Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. *Quart. Jour. Rev. BioI.*, n. 18, v. 2, p. 154-164, 1943.
- CORTE, G.N. An attempt to extend the habitat harshness hypothesis to tidal flats: A case study of *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) reproductive biology. *Estuarine, Coastal and Shelf*

Science, v. 150, p. 136-141, 2014.

COSTA, M.B.; FERNANDEZ, M.A.S.; BARBIERO, D.C.; MELO, F.T.V.; OTEGUI, M.B.P.; FERREIRA, B.S. First record imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 56, p. 145-148, 2008.

COSTA, M.B.; ZAMPROGNO, G.C.; OTEGUI, M.B.P.; DE MORAIS, L.; PEDRUZZI, F.C.; DALBEM, G.B.; SILVA, D.A.; RESENDE, A.C.B. A temporal and spatial monitoring of organotins pollution in harborside region of Brazil by imposex and ecological quality ratio using *Leucozonia nassa*. *Environ. Monit. Assess.*, v. 189, n. 650, p. 1-16, 2017.

COSTA, M.B.; ZAMPROGNO, G.C.; PEDRUZZI, F.C.; DALBEM, G.B.; TOGNELLA, M.M.P. Assessing the Continuous Impact of Tributyltin from Antifouling Paints in a Brazilian Mangrove Area Using Intersex in *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) as Biomarker. *Internacional Journal of Oceanography*, v. 2013, p. 1-8, 2013.

CRAPEZ, M. A. C. Efeitos de Hidrocarbonetos de Petróleo Na Biota Marinha. *In: Efeitos dos Poluentes em Organismos Marinhos*. (Moraes, R.; Crapez, M. A. C.; Pfeiffer, W.; Farina, M.; Bainy, A.; e Teixeira, V. Editores). Editora Arte e Ciência – Vilipress, São Paulo, p. 255-270, 2001.

DAVIES, I.M.; MCKIE, J.C. Accumulation of total tin and tributyltin in muscle tissue of farmed Atlantic salmon. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 18, n. 7, p. 405-407, 1987.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.S.F. Moluscos bivalves: Organismos Bioindicadores da Qualidade Microbiológica das Águas: Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 2, n. 2, p. 18 – 31, 2008.

EVANS, S.M.; HUTTON, A.; KENDALL, M.A.; SAMOSIR, A.M. Recovery in populations of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) suffering from imposex. *Marine Pollution Bulletin*, v.22, p. 331–333, 1991.

FERREIRA, A.P.; CUNHA, C.L.N.; WERMELINGER, E.D.; SOUZA, M.B.; LENZI, M.F.; MESQUITA, C.M.; JORGE, L.C. Impactos de pesticidas na atividade microbiana do solo e sobre a saúde dos agricultores. *Revista Baiana de Saúde Pública*, Salvador, v. 32, n. 2, p. 309-321. 2006.

FERREIRA, G.A.C.; FERREIRA, G.L. Dinâmica urbano regional do Espírito Santo: uma trajetória marcada pela intensificação das relações capitalistas globalizadas. 2017. Disponível em: <https://online.unisc.br/acadnet/anais/index.php/sidr/article/download/16816/4379>. Acesso em: 14 de outubro de 2019.

FERREIRA, M.S.; MÁRSICO, E.T.; C.A.C.J.; JÚNIOR, A.MN.M.; MANO, S.B.; CLEMENTE, S.C.S. Contaminação por metais traço em mexilhões *Perna perna* da costa brasileira. *Cienc. Rura.*, v. 43, n. 6, p. 1012-1020, 2013.

FREITAS, M. Incrustações biológicas no mexilhão *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia), cultivado na Ilha de Ratoles, SC: efeito da exposição ao ar. Dissertação apresentado ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade de Santa Catarina. Santa Catarina, p. 231, 1997.

GALVÃO, M.S.N.; HENRIQUES, M.B.; PEREIRA, O.M.; MARQUES, H.L.A. Ciclo reprodutivo e infestação parasitária de mexilhões *Perna perna* (LINNAEUS, 1758). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 59-71, 2006.

GALVÃO, P.M.A.; REBELO, M.F.; GUIMARÃES, J.R.D.; TORRES, J.P.M.MALM, O. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração dos ambientes marinhos. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*, v. 13, n. 2, p. 59-66, 2009.

GARCIA, R.; MAGALHÃES, A.R.M. Protocolo de identificação e quantificação de bucefalose (enfermidade laranja) em mexilhões *Perna perna*. B. Inst. Pesca, v. 34, n. 1, p. 11-19, 2008.

GAW, S.; THOMAS, K.V.; HUTCHINSON, T.H. Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., v. 9, 2014.

GODOI, A.F.L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestênicos. Química Nova, v. 26 (5), 708-716, 2003.

GREGORY, M.R. Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. Philos. Trans. Royal. Soc. B. Biol. Sci., v. 364, n. 1526, p.2013–3025, 2009.

HENRIQUES, M.B. Resistência do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) proveniente de bancos naturais da baixada santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2004.

INCAPER. Boletim climatológico. 2020. Disponível em: <https://meteorologia.incaper.es.gov.br/boletim-climatologico>. Acesso em: 20 de março de 2020.

JESUS, H.C.; COSTA, E. A.; MENDONÇA, A.S.F.; ZANDONADE, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. Química Nova, v. 27, n. 3, p. 378-386, 2004.

KENCHINGTON, E.; MACDONALD, B.; CAO, L.; TSAGKARAKIS, D.; ZOUROS, E. Genetics of mother-dependent sex ratio in blue mussels (*Mytilus* spp.) and implications for doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. Genetics, v. 161, n. 4, p. 1579–1588, 2002.

KLAPPENBACH, M.A. Lista preliminar de los mytilidae brasilenos con claves para su determinación y notas sobre su distribución. An. Acad. Bras. Ciênc., v. 37 (supl.), p. 327-352, 1965.

KRAMPAH, E. A.; YANKSON, K.; BLAY, J. Aspects of reproduction of the brown mussel *Perna perna* at the Iture rocky beach near Cape Coast, Ghana. African Journal of Marine Science, v. 38, n. 4, p. 503-5012, 2016.

LEE, S.Y. The reproductive cycle and sexuality of the green mussel *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilacea) in Victoria Harbour, Hong Kong. Journal of Molluscan Studies v. 54, p. 317–323, 1988.

LENZ, T.M. Biologia reprodutiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828)(Bivalvia: Ostreidae) como subsídio à implantação de ostreicultura na Baía de Camamu (BA). Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Aquáticos Tropicais – Ecologia, da Universidade Estadual de Santa Cruz. Bahia, 2008.

LIMA, F.C.; ABREU, M.G.; MESQUITA, E.F.M. Monitoramento histopatológico de mexilhão *Perna perna* da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 53, n. 2, p. 1-5, 2001.

LUNETTA, J.E. Fisiologia da reprodução de mexilhões (*Mytilus perna*) (Mollusca: Lamellibranchia). Bol. Fac. Ciên. Letr. Universidade de São Paulo, 324. Zool. Biol. Mar., n. 26, p. 33-111, 1969.

MAGALHÃES, A.R.M. Efeito da parasitose por Trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição de mexilhões *Perna perna* (L.). Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Geral do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F.; CASAS, M.G. Ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Mytilidae) na região do Pântano do Sul – Ilha de Santa Catarina, SC. In:

ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, São Paulo, 1987. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Malacologia, p.113-116, 1987.

MAIA, C.B.; ALMEIDA, A.C.M.; MOREIRA, F.R. Avaliação do teor de chumbo em mexilhões da espécie *Perna perna* na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 1, n. 2, p. 195-198, 2006.

MALAGRINO, W. Bioacumulação e eliminação de mercúrio ( $^{203}\text{Hg}$ ) no mexilhão (*Perna perna*, Linné, 1758). Modelo cinético para avaliar o risco de ingestão no homem. Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 98, 2003.

MARCHIORI, N.C. Oviposição, eclosão e desenvolvimento de *Aphnoblasteria mastigatus* (Suriano, 1986) (Platyhelminthes, Monogenea), parasito de *Rhambdia quelen*, e sua relação com a temperatura e salinidade da água. Tese apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 94, 2013.

MARQUES, H.L.A.; LIMA-PEREIRA, R.T. Mexilhões: Biologia e Criação. Bol. Téc. Inst. Pesca, São Paulo, v. 12, p. 1-31, 1998.

MARQUES, L.A.; SILBERBERG, C.; ABRANTES, D.P.; MACHADO, L.F.; MARANGONI, L.F.B. Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, p. 360, 2016.

MESQUITA, E.F.M.; ABREU, M.G.; LIMA, F.C. Ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus) (Mollusca, Bivalvia) da Lagoa de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. Revta. Bras. Zool., n. 18, v. 2, p. 631-636, 2001.

MIRONOV, O.G. Hydrocarbon pollution of the sea and its influence on marine organisms. Helgoländer wiss. Meeresunters, v. 17, p. 335-339, 1968.

MORAES, D.S.L. Avaliação dos potenciais tóxico, citotóxico e genotóxico de águas ambientais do município de Corumbá, MS, em raízes de *Allium cepa* [Dissertação de mestrado]. Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina; 2000.

MORALES, J.C. Acuicultura Marina Animal. Madri: Mundi-Prensa, p. 423, 1983.

MORSAN, E.M.; KROECK, M.A. Reproductive cycle of purple clam, *Amiantis purpurata* (Bivalvia: Veneridae) in northern Patagonia (Argentina). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, v. 85, p. 367-373, 2005.

NAKATO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J. Resistance to heavy metals of intestinal species from human and animals origins. In: 11th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas, 2012, San Francisco, California. Anaerobe, v. 99, n. 3, 2012.

ORTIZ, L.C. Resíduos sólidos em praias do Espírito santo sob diferentes regimes de uso. Monografia apresentada ao Departamento de Oceanografia da Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, p. 69, 2010.

OTEGUI, M.B.P.; ZAMPROGNO, G.C.; FRANÇA, M.A.; DAROS, B.N.; ALBINO, J.; COSTA, M.B. Imposex response in shell sizes of intertidal snails in multiple environments. Journal of Sea Research, v. 147, p. 10-18, 2019.

PAVANI, F. Determinação da direção e da taxa de transporte longitudinal no arco praiado compreendido entre a praia da Ponta da Fruta, Vila Velha e Setiba, Guarapari – ES. Monografia apresentada ao Departamento de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, p. 83, 2006.

PIERRI, B.S.; FOSSARI, T.D.; MAGALHÃES, A.R.M. O mexilhão *Perna perna* no Brasil: nativo ou exótico? Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v. 68, n. 2, p. 404-414, 2016.

PODRATZ, P.L.; MERLO, O.; SENA, G.C.; BONOMO, M.M.; COSTA, M.B.; ZAMPROGNO, G.C.; BRANDÃO, P.A.; CARNEIRO, M.T.; MIQUEL, E.C. MIRANDA-ALVES, L.; SILVA, I.V.; GRACELI, J.B. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. Reprod. Toxicol. n. 57, p. 29-42, 2015.

PRICHARD, E.; GRANEK, E.F. Effects of pharmaceuticals and personal care products on marine organisms: from single-species studies to an ecosystem-based approach. Environ Sci Pollut Res Int. v. 23, n. 22, p. 22365-22384, 2016.

RIISGÅRD, H.U. On measurement of filtration rates in bivalves – The stony road to reliable data: review and interpretation. Marine Ecology Progress Series, v. 211, p. 275-291, 2001.

RIOS, E.C. Compendium of brazilian sea shells. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande. p. 668, 2009.

ROMANO, J.A. Acute toxicity and sun-lethal effects of non-point source pollutants on invertebrates. Thesis of Doctor. University Program in Integrated Toxicology in the Graduate School of Duke University, 2007.

SAAVEDRA, C.; REYERO, M.I.; ZOUROS, E. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Genetics, v. 145, p. 1073–1082, 1997.

SILVESTRI, M.F.; CORDEIRO, G.B.; COSTA, P.M.S. Parâmetros reprodutivos do mexilhão *Perna perna* (L. 1758) em fazendas marinhas na Ilha Grande (RJ). ActaFish., v. 6, n. 1, p. 43-49, 2018.

SMITH, B. S. Tributyltin compounds induced male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Llyanassa obsoleta*. Journal of Applied Toxicology, v. 1, n. 3, p. 141-144, 1981.

SOUZA, T.B.; SILVA, B.R.; PEREIRA, R.M.; ARIDE, P.H.R.; OLIVEIRA, A.T.; SOUZA, A.B.; LAVANDER, H.D.; POLESE, M.F.; KROHLING, W. Artificial selection and size at first sexual maturity of *Perna perna* mussels (Linnaeus, 1758) in southeastern Brazil. Journal of Shellfish Research, v. 38, n. 1, p. 63-69, 2019.

WOOD, A.R.; APTE, S.; MACAVOY, E.S.; GARDNER, J.P. A molecular phylogeny of the marine mussel genus *Perna* (Bivalvia: Mytilidae) based on nuclear (ITS1&2) and mitochondrial (COI) DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 44, p. 685-698, 2007.

YUSA, Y.; BRENTON, S.; HOEH, W.R. Population genetics of sex determination in *Mytilus* mussels: reanalyses and a model. Journal of Heredity, v. 104, n. 3, p. 380-385, 2013.

# CAPÍTULO 3

---

**BUCEFALOSE EM *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) (BIVALVIA,  
MYTILIDAE): HÁ MAIOR PREVALÊNCIA EM ÁREAS  
ANTROPIZADAS?**

## **Bucefalose em *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Mytilidae: há maior prevalência para áreas antrópicas?)**

FRANÇA, M.A.<sup>1</sup>; DAROS, B.N.<sup>1</sup>; ZAMPROGNO, G.C.<sup>1</sup>; OTEGUI, M.B.P.<sup>1</sup>; ARAÚJO, N.S.<sup>2</sup>; PULLIDO-MURILLO, E.A.<sup>2</sup>; MOREIRA, N.I.B.<sup>3</sup>; SILVA, N.F.<sup>4</sup>; COSTA, M.B.<sup>1</sup>; PINTO, H.A.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Malacologia/Coleção Malacológica, Depto Ciências Biológicas/UFES

<sup>2</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

<sup>3</sup>Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFES

<sup>4</sup>Laboratório de Neuromorfologia Celular, Centro de Ciências da Saúde, UFES

### **RESUMO**

Os organismos marinhos estão sujeitos a diferentes tipos de interações ecológicas, as que causam benefícios e malefícios. Dentre as malélicas, há o parasitismo. A bucefalose, ou enfermidade laranja, vem sendo descrita ao longo das últimas décadas como causadora de diferentes prejuízos para os bivalves marinhos. *Perna perna* se destaca como um desses mexilhões alvo dos bucefalídeos, assim objetivou nesse artigo verificar a incidência de bucefalose ao longo de um ciclo anual, comparando-se a incidência entre os sexos, meses e pontos amostrais a partir de análises dos tecidos reprodutivos de *P. perna*. Os animais foram coletados em duas áreas: antropizada no município de Vitória e de referência em Guarapari, ambos municípios localizados no litoral do Espírito Santo. Mensalmente durante um ano, 30 organismos foram coletados em maré baixa, quando expostos ao ar, foram armazenados em potes plásticos contendo água do mar e transportados para laboratório. No laboratório os epibiontes foram removidos, as partes moles expostas e a presença de parasitos foi identificada a partir de análise microscópicas a partir de histotécnica padrão e macroscópicas com auxílio de estereomicroscópio. Para as análises histotécnicas, 12 animais em cada ponto/mês foram analisados. Concomitantemente, indivíduos parasitados foram fixados e identificados a partir de análises taxonômicas e moleculares (gene 28S ~1300pb). Os resultados demonstraram que há preferência do parasitismo pela área antropizada e pelas fêmeas em ambos os pontos, mas que não há diferença significativa entre os meses amostrais. Para Vitória, o parasitismo ocorre em virtude de a área ser abrigada, com multi-impactos que podem prejudicar a resposta-imune dos animais. Como esses parasitas se alimentam das reservas nutritivas do hospedeiro e sua concentração é maior em fêmeas, é esperado que a infecção ocorra em maior quantidade neste sexo. Os estudos moleculares e taxonômicos indicaram que a espécie que infectou os mitilídeos deste estudo foram *Proisorhynchoides paralichthydis* ou *P. waeschenbachae*. Entretanto, estudos serão necessários para inferir com precisão qual a espécie encontrada em *P. perna* e o quanto estão prejudicando a sobrevivência e reprodução da espécie.

**Palavras-chave:** Bucefalídeos. Parasitismo. Mexilhão marrom. Ciclo reprodutivo.

## 1. INTRODUÇÃO

Bivalves (Mollusca) marinhos possuem ampla gama de parasitos e microrganismos que podem provocar alta taxa de mortalidade na classe (BOWER *et al.*, 1994) em virtude de sua natureza filtradora, que aumenta a suscetibilidade desses organismos a interações ecológicas com outros organismos presentes nas águas circundantes (ANDRADE, 2017). Para *Perna perna* (Linnaeus, 1758) são encontrados diferentes parasitos, de acordo com (BOEHS *et al.*, 2012), sendo eles pertencentes aos filos e subfilos: Apicomplexa (LIMA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2012), Platyhelminthes (UMIJI *et al.*, 1976; MAGALHÃES, 1998; LIMA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002; HENRIQUES, 2004; GALVÃO *et al.*, 2006; COSTA, 2007; LEITE, 2007; MARCHIORI, 2013; SCHAEFER, 2015), Annelida (MAGALHÃES & FERREIRA, 2006; COSTA, 2007; SILVA *et al.*, 2012; SUÁREZ-MORALES *et al.*, 2010), Crustacea (SUÁREZ-MORALES *et al.*, 2010; SCHAEFER, 2015) e Urochordata (SUÁREZ-MORALES *et al.*, 2010). Dentre esses organismos citados estão os trematódeos digeneicos pertencentes a família Bucephalidae, considerados como um dos principais grupos de patógenos prejudiciais para os bivalves marinhos (KINNE, 1983; BOWER *et al.*, 1994), uma vez que são conhecidos por provocarem a bucefalose ou enfermidade laranja (COLE *et al.*, 1935; UMIJI *et al.*, 1976).

A bucefalose se caracteriza macroscopicamente pelo aparecimento de estruturas filamentosas de cor alaranjada no manto e gônada dos machos e manchas esbranquiçadas nos folículos e gônadas das fêmeas advindos da pigmentação dos esporocistos dos parasitos (GARCIA & MAGALHÃES, 2008). O ciclo de vida dos bucefalídeos é complexo, envolvendo além dos bivalves, peixes teleósteos como segundos hospedeiros intermediários e definitivos. Após a liberação de ovos dos parasitos pelo hospedeiro definitivo, ocorre a eclosão de miracídeos planctônicos que penetram os primeiros hospedeiros intermediários de forma ativa ou a partir do processo de filtração, iniciando a fase de reprodução assexuada. O processo de metamorfose começa efetivamente a partir das brânquias dos moluscos, onde posteriormente migram para o canal alimentar e conseqüentemente para o sistema circulatório, onde no manto, na gônada e na glândula digestiva a metamorfose se completa com a origem dos esporocistos ramificados jovens (UMIJI *et al.*, 1976). Esses esporocistos jovens se desenvolvem em esporocistos com cercárias nos tecidos reprodutivos e digestivos e logo após em cercárias livre-natantes (UMIJI *et al.*, 1976). Estas, após emergirem, penetram ativamente o segundo hospedeiro

intermediário a fim de se transformar em metacercárias e para isso, as cercárias se encistam e eclodem em metacercárias que se transformam em metacercárias adultas após 70 ou 80 dias (UMIJI *et al.*, 1976; CHENG, 1978; AMATO, 1982; ELSTON, 1990; ROBALDO, 1995; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 1996; MAGALHÃES, 1998; GARCIA & MAGALHÃES, 2008). A infecção dos hospedeiros definitivos ocorre quando estes se alimentam dos segundos hospedeiros intermediários infectados (UMIJI *et al.*, 1976; CHENG, 1978; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 1996) e nos organismos deste hospedeiro final, entre 30 a 40 dias após a infecção, origina-se um trematódeo sexualmente maduro (UMIJI *et al.*, 1976).

Especificamente nos mexilhões esses patógenos provocam, nos tecidos reprodutivos, a castração dos animais (MAGALHÃES, 1998; SILVA *et al.*, 2002) em decorrência do grande potencial reprodutivo das larvas do *Bucephalus* sp., que se proliferam dentro dos tecidos do hospedeiro e ramificando intensamente o esporocisto (COCHÔA & MAGALHÃES, 2008). A disponibilidade de material de reserva e estoques energéticos presente nos tecidos reprodutivos é uma possível explicação para a deposição desses bucefalídeos nesses tecidos, que passam a comprometer, desta maneira, a reprodução dos hospedeiros (COCHÔA & MAGALHÃES, 2008). Desse modo, o parasitismo aumentaria o consumo de nutrientes tais como o glicogênio (na fase inicial da infecção) e lipídeos (fase de infecção elevada), diminuindo as reservas energéticas do hospedeiro que acarretariam na inviabilidade da gametogênese e o emagrecimento corporal do mexilhão, o que torna o tecido do hospedeiro frágil e por isso pode, potencialmente, ser destruído com a saída das cercárias, podendo levar à morte dos mexilhões (LAUCKNER, 1983; MAGALHÃES, 1998; GARCIA & MAGALHÃES, 2008).

Diversos fatores podem estar relacionados com o aparecimento e proliferação da infecção parasitária, sendo eles a exposição à ação das ondas, a proximidade com fontes pontuais (FPP) e não pontuais de poluição (FNPP) ou o tamanho dos organismos analisados (MAGALHÃES, 1998; LOUREIRO, 2001; HENRIQUES, 2004; GALVÃO *et al.*, 2006; COSTA, 2007; COCHÔA & MAGALHÃES, 2008; GARCIA E MAGALHÃES, 2008; ADDUM & OLIVEIRA, 2010).

No Brasil, poucos estudos se dispuseram a correlacionar a interação biológica sobre as enfermidades provocadas por parasitas em moluscos marinhos (BOEHS *et al.*, 2012) em sua maioria, estes estudos são pontuais e direcionados aos organismos obtidos em cultivo (UMIJI *et al.*, 1976; MAGALHÃES, 1998; SILVA, 2002; COSTA, 2007; LEITE, 2007;

COCHÔA & MAGALHÃES, 2008; GARCIA & MAGALHÃES, 2008; MARCHIORI, 2008; ZEIDAN *et al.*, 2012; MARCHIORI, 2013; MEDEIROS, 2013; ANDRADE, 2017) e pouquíssimos para animais de bancos naturais (HENRIQUES, 2004; GALVÃO *et al.*, 2006; ADDUM & OLIVEIRA, 2010). Em decorrência da falta de estudos nessas áreas naturais, pouco se sabe sobre a associação entre os aspectos taxonômicos, ecológicos e patológicos dessa interação ecológica. Assim, devido aos malefícios já relatados para a população de bivalves marinhos e possivelmente para quem dele se alimenta, objetivou-se neste artigo verificar a incidência de bucefalose ao longo de um ciclo anual, comparando-se a prevalência entre os sexos, meses e pontos amostrais a partir de análises dos tecidos reprodutivos de *P. perna* coletados em costões rochosos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Durante doze meses, entre maio de 2017 e abril de 2018, foram realizadas 24 coletas para obtenção dos exemplares de *P. perna*. Os indivíduos foram coletados em dois pontos amostrais localizados no Espírito Santo, região Sudeste do Brasil (Figura 1): Vitória e Guarapari, capital e região sul do referido estado, respectivamente. A Ilha do Boi, situada no município de Vitória, possui diversas fontes pontuais e não pontuais de poluição (JESUS *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2008; COSTA, 2012; COSTA *et al.*, 2013; PODRATZ *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2017), principalmente em virtude da inserção neste município do principal polo econômico e habitacional do estado. Em contrapartida, Setiba, localizada no município de Guarapari, apresenta baixa carga antropogênica (ORTIZ, 2010; COSTA *et al.*, 2017), não sendo possível observar em seu entorno nenhuma fonte pontual de poluição.

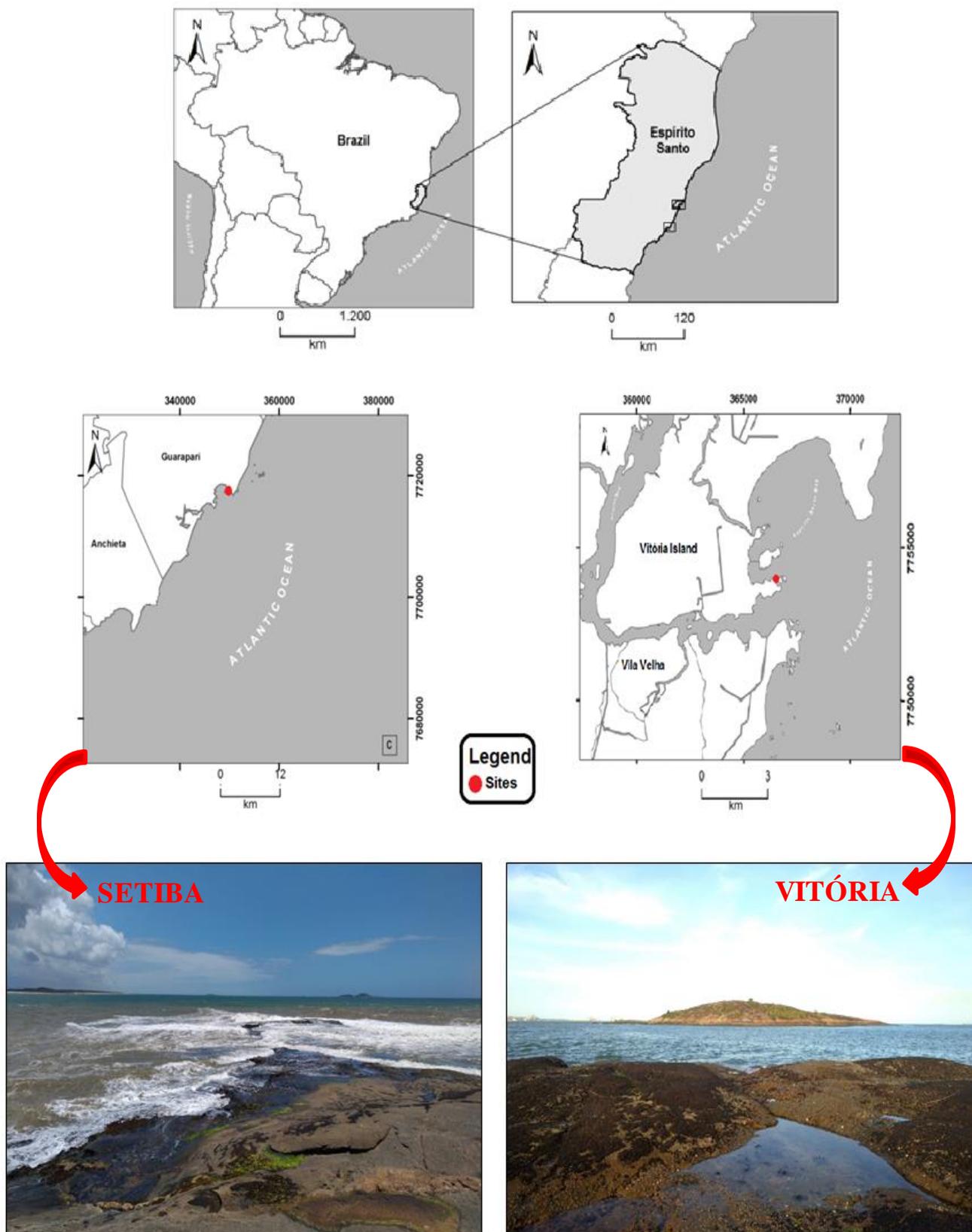
Em cada ponto amostral foram coletados 30 exemplares (exceto em abril em Setiba, onde coletou-se 22 indivíduos em abril) com tamanho médio de 50mm a fim de homogeneizar o tamanho das amostras. Imediatamente após as coletas os animais foram acondicionados em potes plásticos contendo água do mar e transportados para o Laboratório de Malacologia/UFES.

Neste laboratório os organismos epibiontes foram removidos, os animais foram abertos para exposição das partes moles e as gônadas e folículos (*tcc.*, manto) foram fotografados com auxílio de Estereomicroscópio Leica Mod S8APO. Em cada ponto, em cada mês, foram selecionados seis machos e seis fêmeas de maneira aleatória. Esses doze indivíduos foram processados a partir de histotécnicas convencionais (*i.e.*, hematoxilina e

eosina) (LUNETTA, 1969). Com as lâminas confeccionadas, analisou-se a presença de parasitos com auxílio de microscopia óptica (Leica®Microsystems).

Visando a identificação taxonômica dos parasitos, exemplares infectados foram encaminhados para o Laboratório de Biologia de Trematoda da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob responsabilidade do professor Dr. Hudson Alves Pinto, para estudo morfológico e molecular dos estágios evolutivos. Amostras das formas larvais foram devidamente fixadas para estudo morfológico e molecular. Cercárias do tipo *Gasterostoma* foram caracterizadas morfológicamente e comparadas com outras descritas na América do Sul. Sequência parcial do gene 28S (~1300pb) foi obtida, alinhada com 37 espécies pertencentes às 5 subfamílias da família Bucephalidae e submetidas a análises filogenéticas (Análise de Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana).

As análises dos dados estatísticos foram realizadas no programa *Statistica* 13.5, com  $p < 0,05$ . A normalidade e a homocedasticidade foram testadas com Shapiro-Wilk e teste de Levene. Com os resultados não-paramétricos obtidos para as análises macroscópicas, utilizou-se o teste de Mann-White foi utilizada para verificar possíveis diferenças entre a quantidade de parasitas nos meses amostrais. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar as possíveis diferenças entre os meses com *a posteriori* do teste de comparações múltiplas. Utilizou-se o teste *t* para verificar diferenças na presença de parasitas entre os sexos.

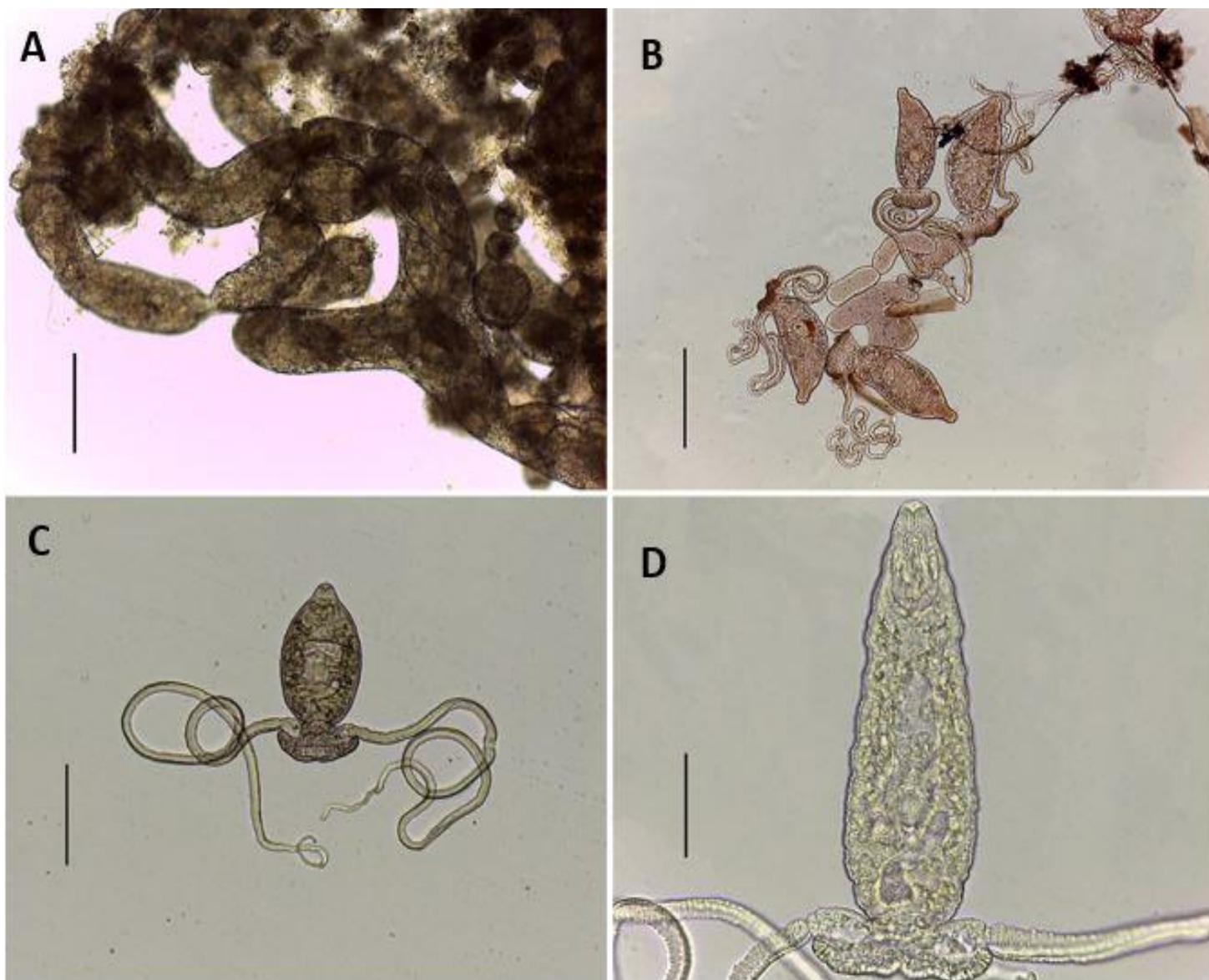


**Figura 1:** Localização dos pontos amostrais. Setiba ( $20^{\circ}38'07.6''\text{S}$   $40^{\circ}25'23.6''\text{W}$ ) à esquerda e Vitória ( $20^{\circ}18'27.9''\text{S}$   $40^{\circ}16'44.5''\text{W}$ ) à direita.

### 3. RESULTADOS

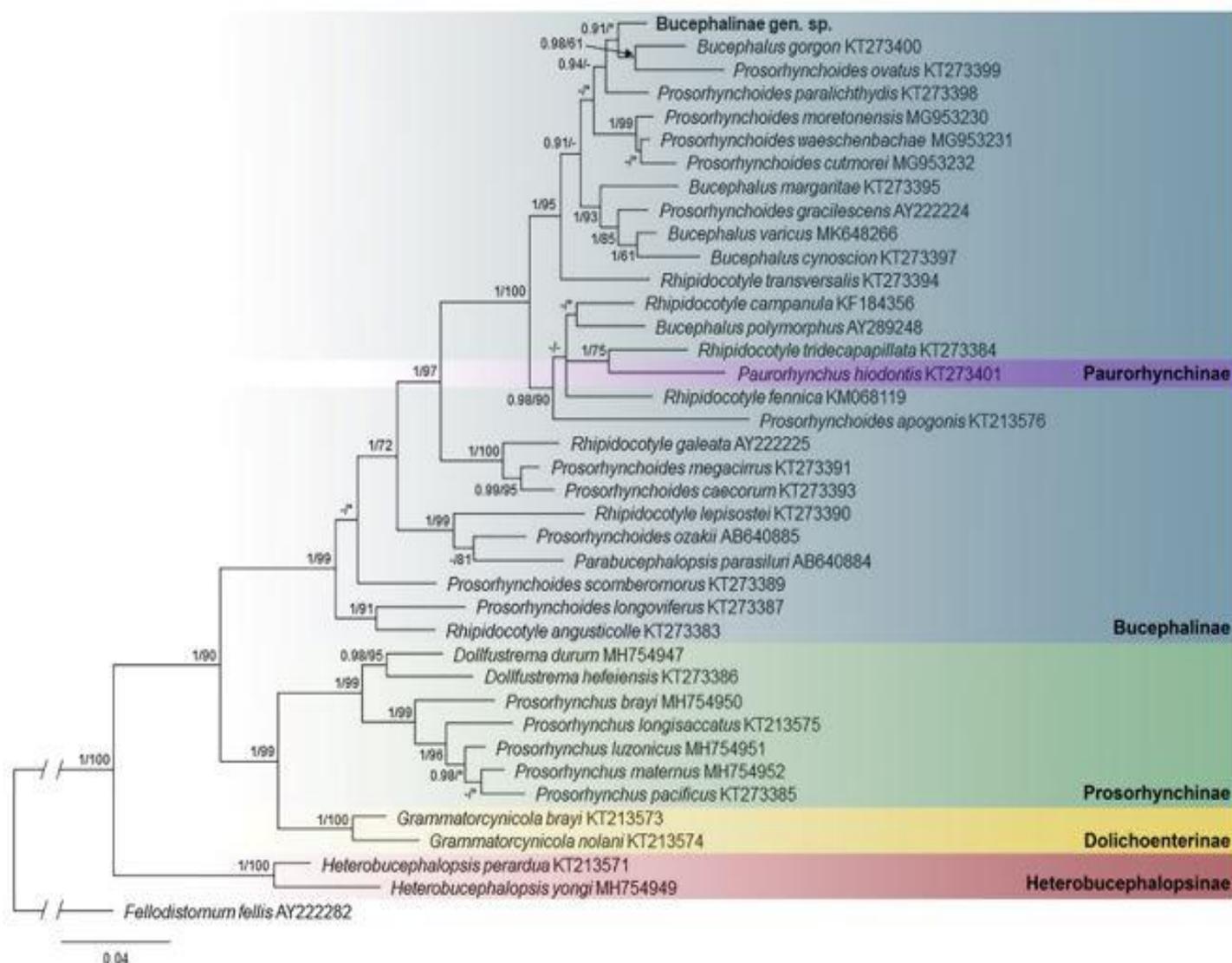
#### 3.1. ANÁLISE TAXONÔMICA E MOLECULAR

Em Vitória, do total de indivíduos analisados, 44,16% apresentaram alterações macroscópicas e microscópicas indicativas da infecção por estágios larvais de Bucephalidae. No contraponto, Setiba apresentou 18,46% de infestação parasitária. A análise morfológica dos estágios evolutivos encontrados nos animais apresentando alterações macroscópicas revelaram a presença de esporocistos e cercárias do tipo *Gasterostoma* (Figura 2).



**Figura 2:** Cercárias (A) e esporocistos (B, C e D) de trematódeos da subfamília Bucephalinae encontrados na gônada e manto de *P. perna*. Aumento 100x.

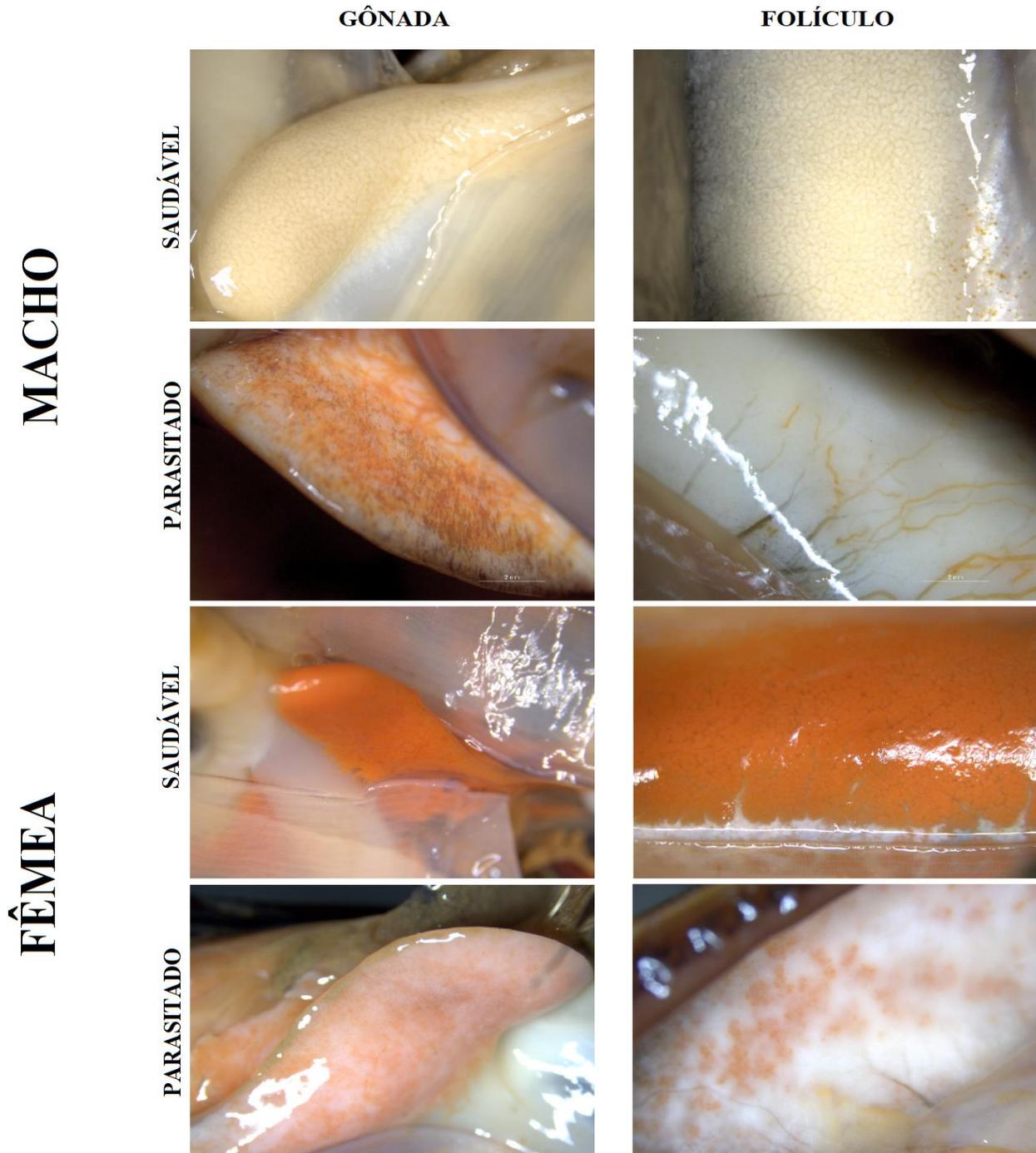
A análise de sequências moleculares obtidas para a região 28S revelou que a cercária aqui reportada em *P. perna*, está inserida em um clado bem suportado com representantes da subfamília Bucephalinae, contendo espécies dos gêneros *Bucephalus*, *Prosorhynchoides* e *Rhipidocotyle*. No geral, os dados filogenéticos revelam um complexo cenário taxonômico deste grupo, o qual, associado a ausência da sequência da respectiva forma adulta para comparação, impossibilitam a identificação específica das larvas que aqui, provisoriamente, são consideradas como Bucephalinae gen. sp. (Figura 3) caracterizados como pertencentes a subfamília Bucephalinae.



**Figura 3:** Análise filogenética entre a larva de trematódeo encontrado em *P. perna* (em negrito) no presente estudo e representantes da família Bucephalidae com sequências disponíveis no GenBank. A árvore foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana utilizando-se sequências parciais do gene 28S rRNA. Probabilidades posteriores (>0.9) e valores de bootstrap (>50) são apresentados nos nós.

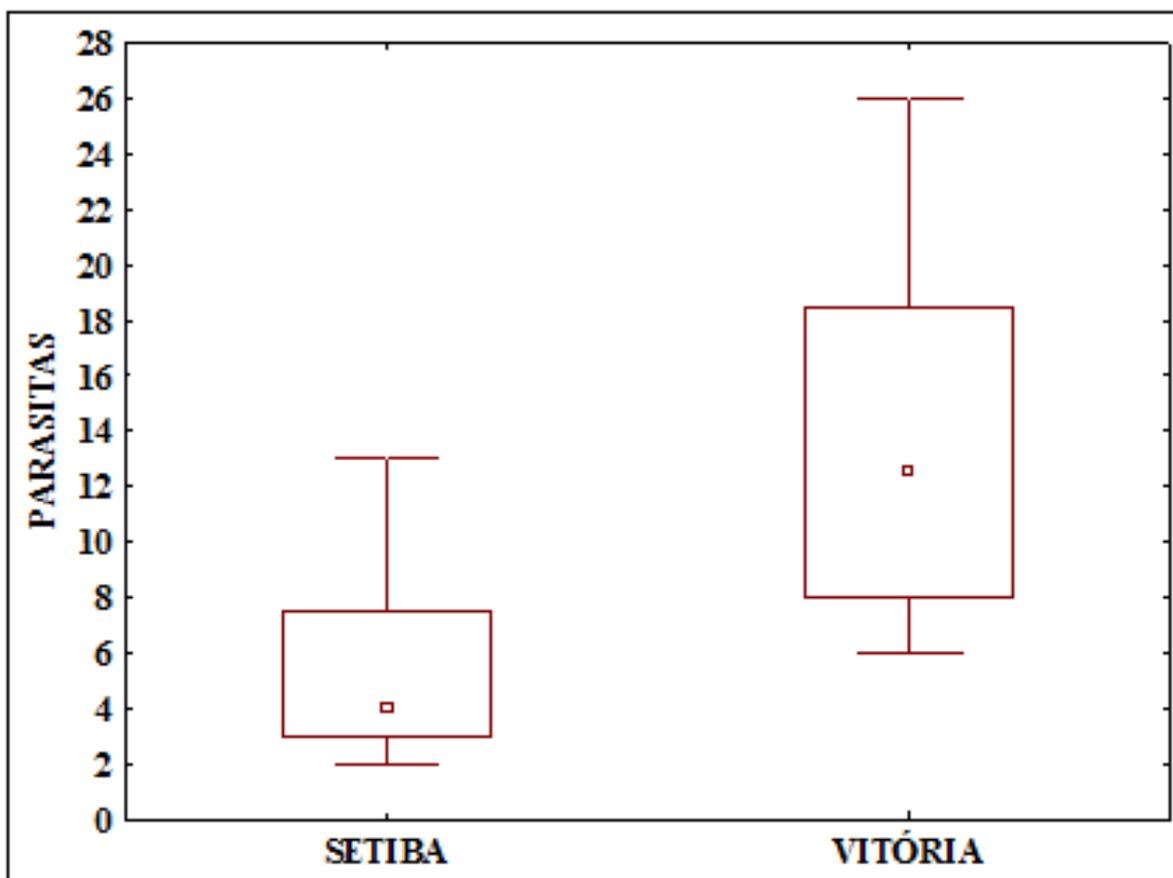
### 3.2. ANÁLISE MACROSCÓPICA

Um total de 360 indivíduos foram analisados macroscopicamente no ponto amostral de Vitória e 352 em Setiba. As análises macroscópicas indicaram a presença visível de patógenos (Figura 4).



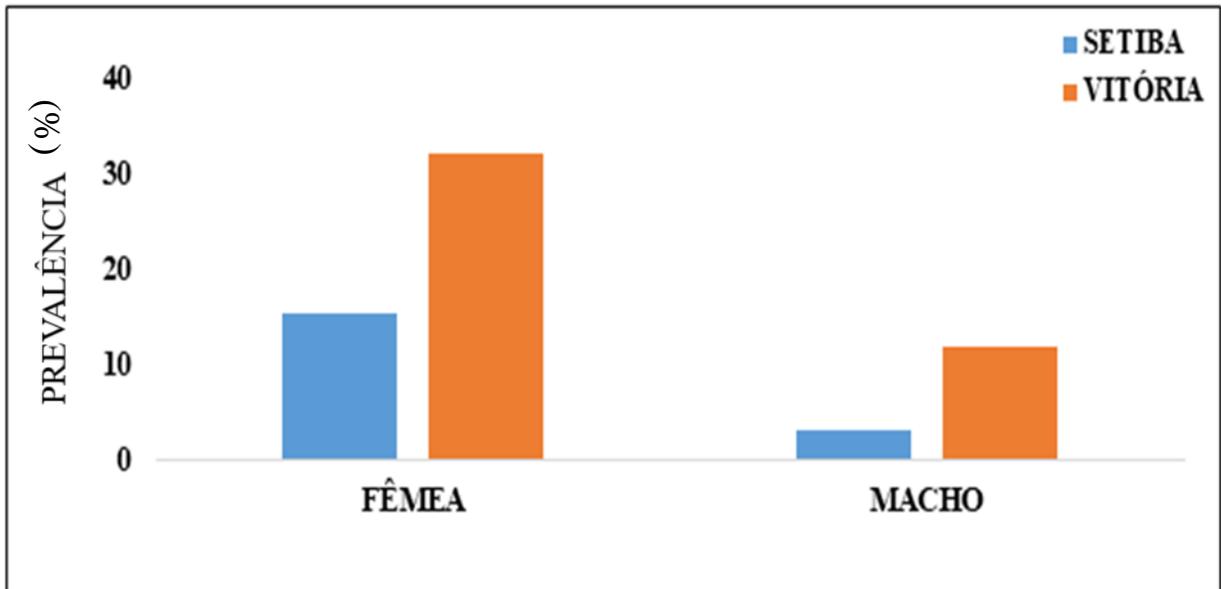
**Figura 4:** Alterações macroscópicas verificadas em gônada e folículo de *P. perna*, machos e fêmeas, infectados por Bucephalidae. Imagens de animais não infectados são apresentadas para comparação.

Com relação a distribuição dos parasitas entre os pontos amostrais, percebe-se que os valores médios de prevalência parasitária para Vitória são quase o dobro da prevalência para Setiba. Isto segue os resultados obtidos a partir das análises estatísticas onde ao serem realizados o teste de Mann-White (Figura 5), indicou-se diferença significativa para Vitória quando comparado à Setiba ( $Z=3,74$ ;  $p=0,0014$ ).



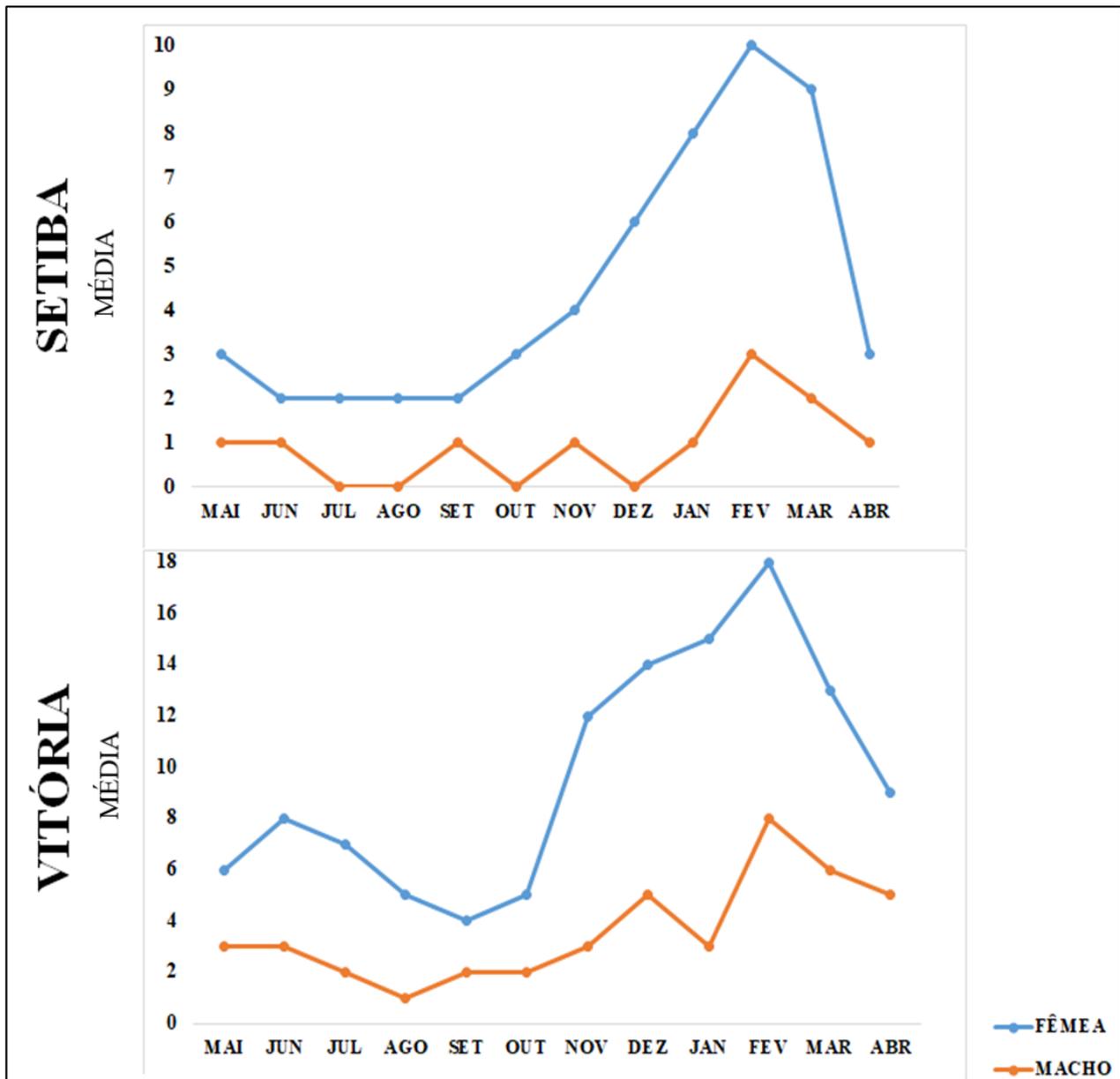
**Figura 5:** Valores médios e desvio padrão da prevalência de infecção por Bucephalidae observados macroscopicamente nos dois pontos amostrais.

Em relação ao sexo dos exemplares de *P. perna* (Figura 6), foram observadas maiores taxas de prevalência nas fêmeas, em ambos os pontos: Vitória (fêmeas 32,22% e machos 11,94%) e Setiba (fêmeas 15,34% e machos 3,21%).



**Figura 6:** Prevalência de infecção (%) de parasitos a partir de análise macroscópica em mexilhões *P. perna* nos dois pontos amostrais e em relação ao sexo.

Quanto aos meses amostrados (Figura 7), não houve diferença significativa, entre os pontos amostrais. No entanto observa-se que entre os meses de outubro e fevereiro há uma tendência de crescimento para a prevalência parasitário e nos meses de março e abril os valores são menores, todavia, ainda representativos para ambos os pontos amostrais.



**Figura 7:** Frequência relativa mensal da prevalência de parasitos analisados macroscopicamente em fêmeas e machos de *P. perna* para os dois pontos amostrais.

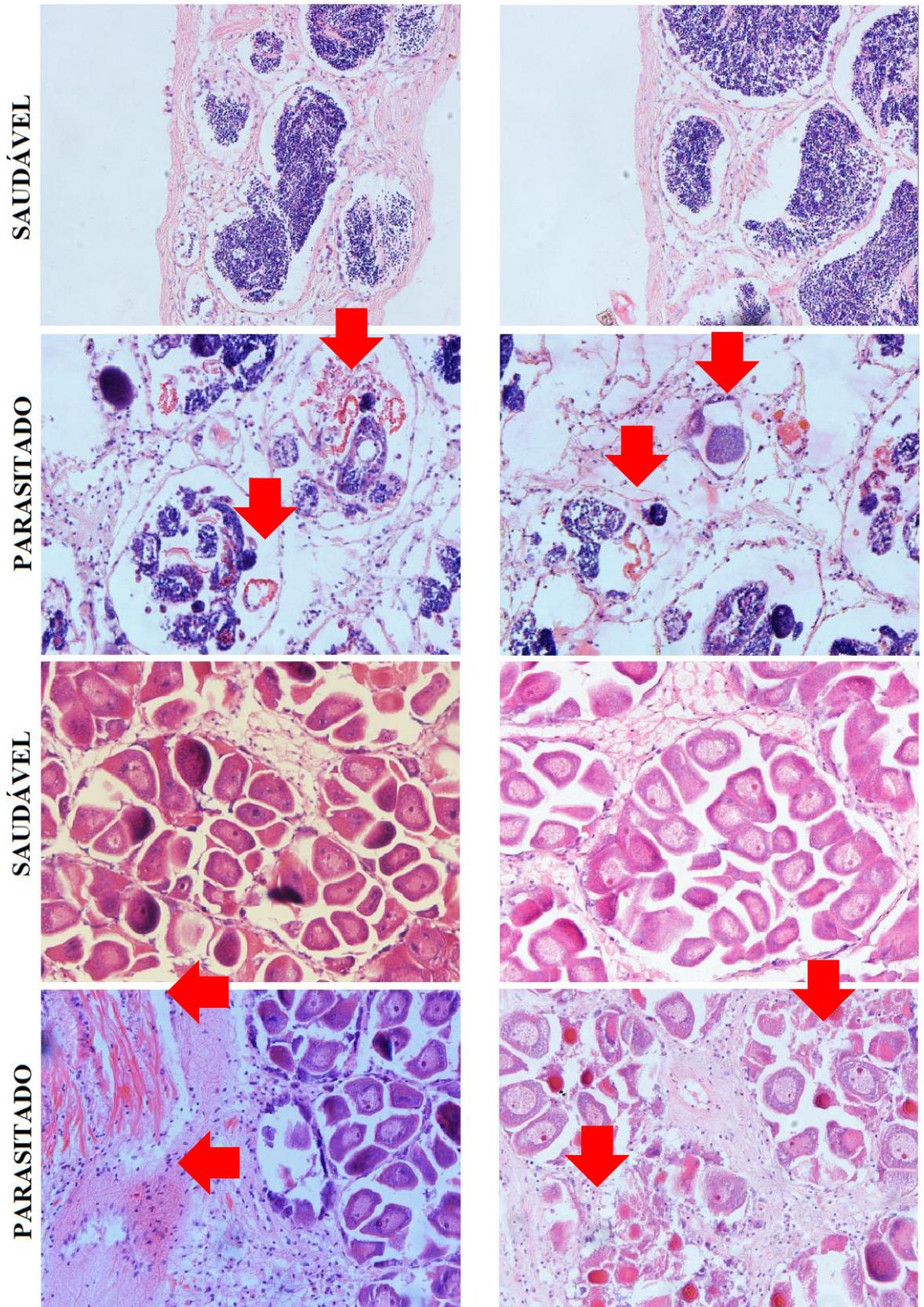
### 3.3. ANÁLISE MICROSCÓPICA

A partir das análises macroscópicas foram selecionados aleatoriamente seis machos e seis fêmeas de cada ponto e mês amostral, assim, microscopicamente analisou-se 144 indivíduos em Vitória e 144 em Setiba. A presença dos parasitos foi confirmada pelas análises histopatológicas (Figura 8).

# MACHO

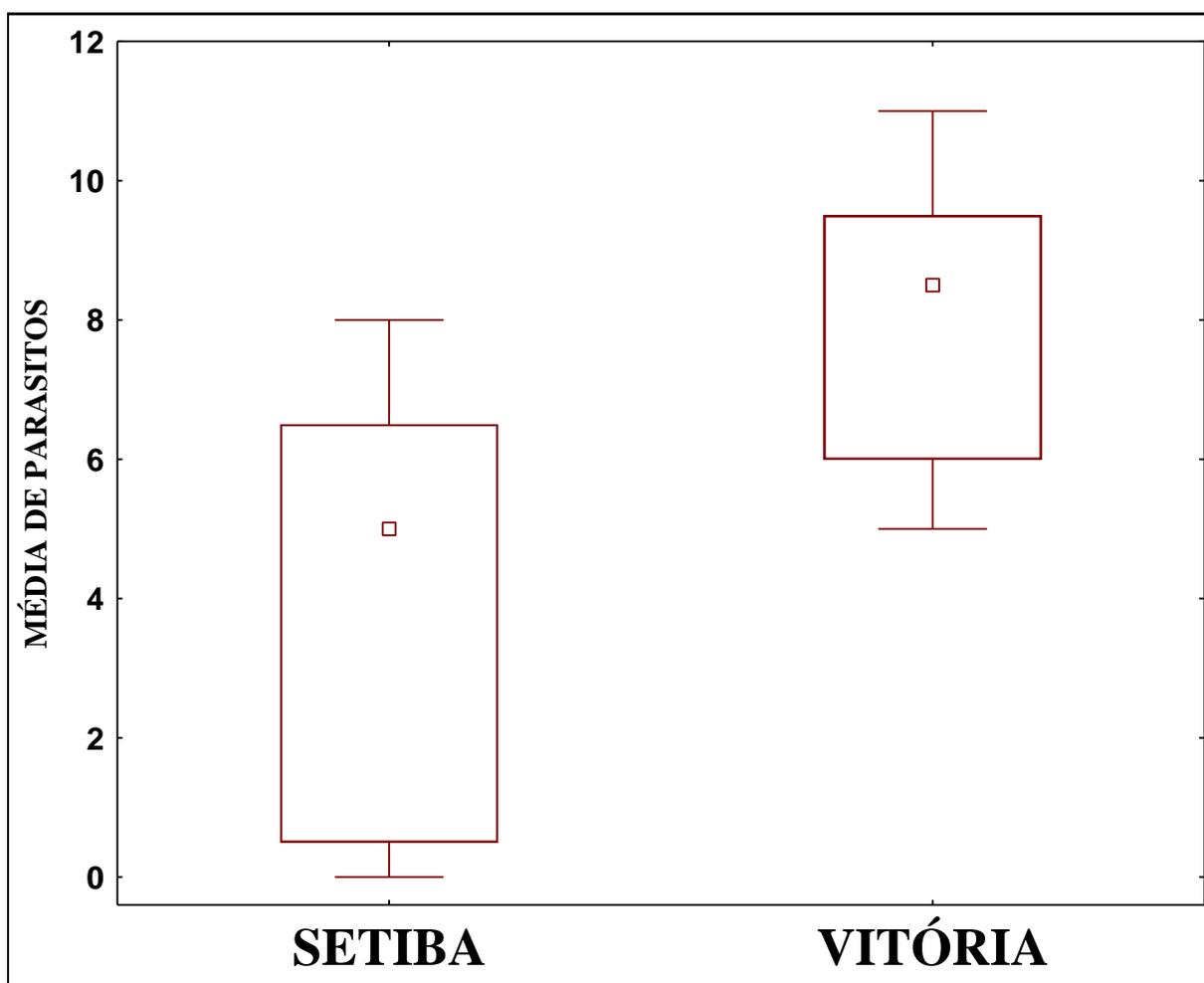
# FÊMEA

## GÔNADA



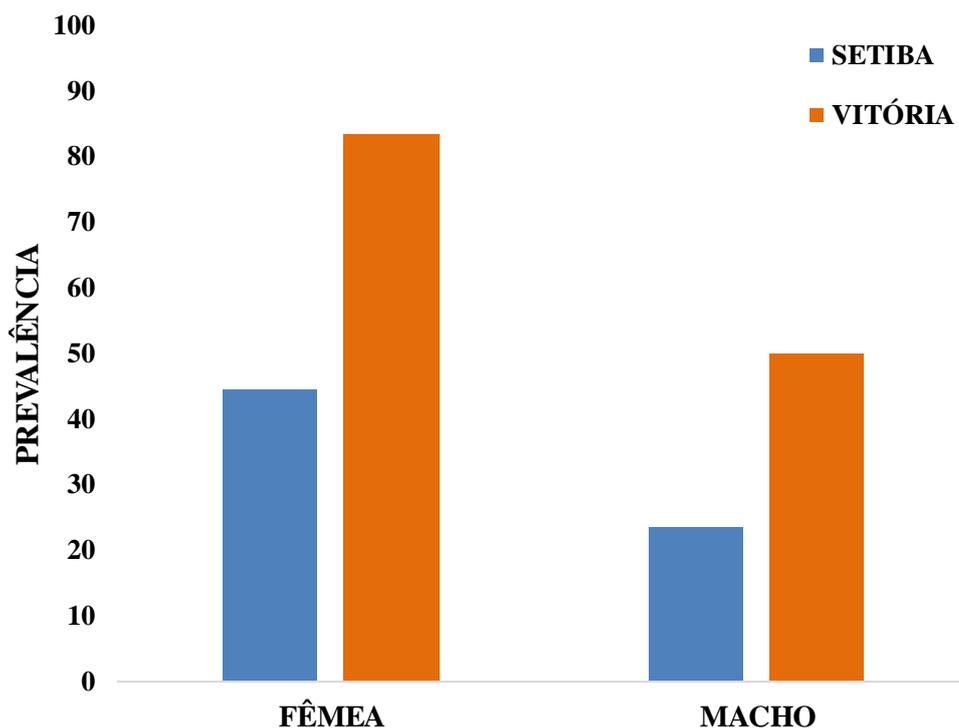
**Figura 8:** Alterações histopatológicas observadas em tecido gonadal de *P. perna*, machos e fêmeas, infectados por Bucephalidae. Imagens de animais não infectados são apresentadas para comparação.

A análise de incidência (Figura 9) demonstrou que o ponto amostral de Vitória apresenta a maior porcentagem total de indivíduos parasitados, com 39,34%, enquanto Setiba apresentou 20,08%. O teste de Mann-White indicou maior valor significativo para o ponto amostral de Vitória ( $Z=-2,80$ ;  $p=0,0051$ ) se comparado com a incidência de parasitos observados para a área amostral de Setiba.



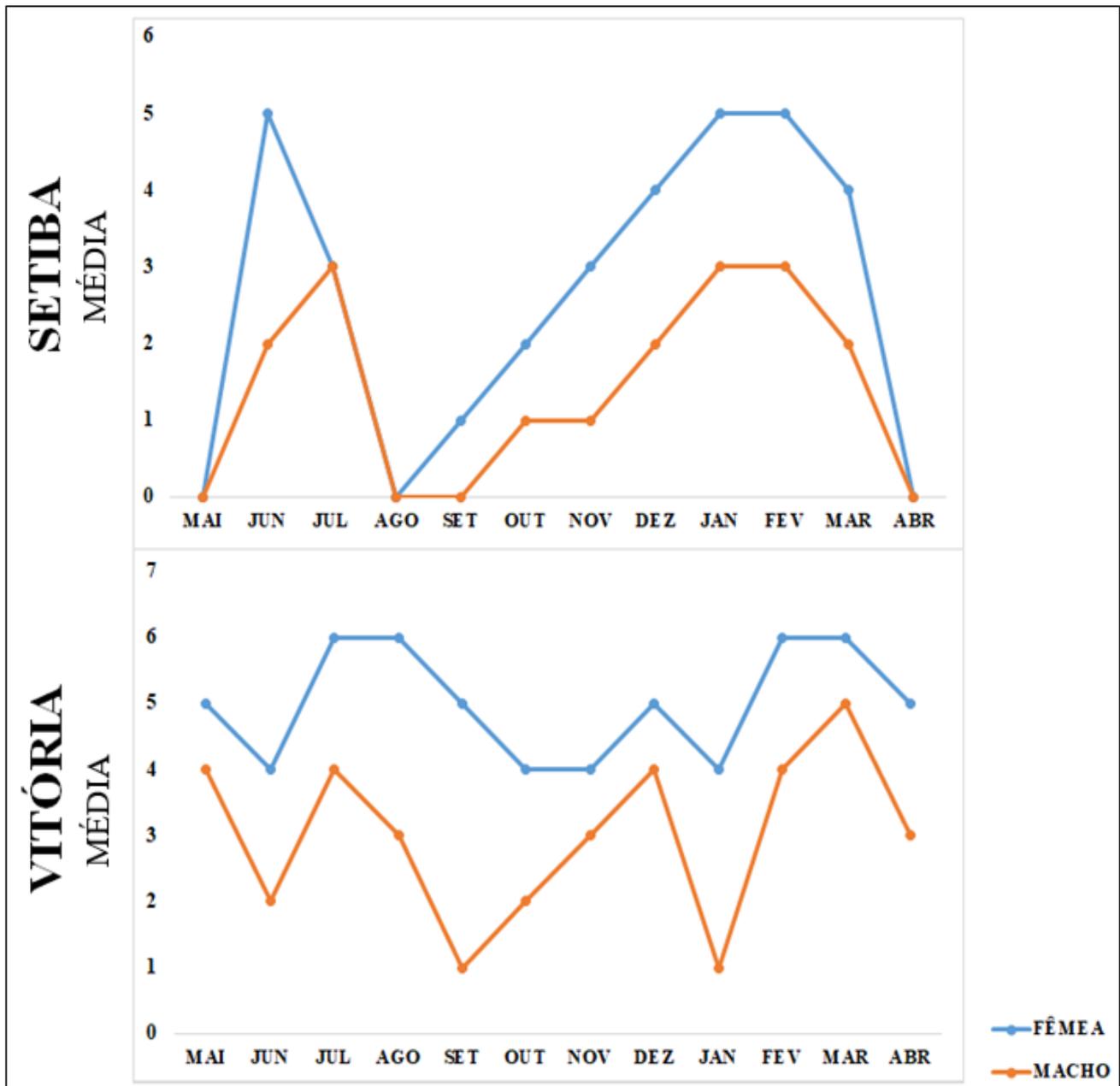
**Figura 9:** Comparação da prevalência de parasitas a partir de análises microscópicas entre os pontos amostrais.

Ao comparar a distribuição dos parasitas entre os sexos por ponto amostral (Figura 10) observa-se maior incidência em fêmeas para Vitória (fêmeas 83,33% e machos 50%) e Setiba (fêmeas 44,44% e machos 23,61%), isso indica que as fêmeas são as mais afetadas pela infecção parasitária.



**Figura 10:** Prevalência (%) de parasitos a partir de análises microscópicas de mexilhões *P. perna* machos e fêmeas, nos dois pontos amostrais.

Com relação aos meses amostrados (Figura 11) não houve diferença significativa, podendo-se observar um comportamento semelhante entre os sexos e pontos. Entretanto ausência de parasitos foram observados em abril, maio, agosto e setembro, para Setiba. Em Vitória foram encontrados parasitos em todos os meses amostrados.



**Figura 11:** Frequência relativa da prevalência média de parasitos analisados microscopicamente em fêmeas e machos no que tange os pontos e meses amostrais.

#### 4. DISCUSSÃO

Com as informações geradas por este estudo, observa-se que macroscopicamente e microscopicamente (análise histopatológica) é possível verificar a presença de parasitos nas gônadas e folículos de *P. perna*, todavia diferentes estudos indicam que o parasitismo por bucefalídeos em estágios iniciais não são perceptíveis a olho nu ou apenas com ajuda de estereomicroscópio. Marchiori (2013) salienta que dependendo da intensidade da

infecção a determinação do sexo é inviável. Ambas as técnicas indicaram maior prevalência de bucefalídeos no ponto de Vitória e além disso, demonstraram que indivíduos em fase inicial de enfermidade só são encontrados a partir da técnica microscópica. Desta maneira, alguns autores (MAGALHÃES, 1998; HENRIQUES, 2004; GARCIA E MAGALHÃES, 2008; MARCHIORI, 2013) indicam correlacionar estudos macroscópicos com os estudos microscópicos para verificação de parasitismo nos mexilhões e Costa (2007) ainda reitera que exames macroscópicos são insubstituíveis.

Para além disso, a técnica microscópica se faz necessária quando os indivíduos coletados são inferiores a 40 mm, dado que indivíduos menores de que 30 mm são imaturos e não produzem gametas, de 40 mm a 70 mm há o aparecimento da bucefalose em decorrência da maior disponibilidade de glicogênio e lipídeos, indivíduos a partir de 70 mm apresentam um decréscimo de parasitismo, pois há neles maior resistência ao patógeno (LASIAK 1989; LASIAK, 1992; MAGALHÃES, 1998; COCHÔA & MAGALHÃES, 2008; GARCIA E MAGALHÃES, 2008). Indivíduos menores que 30 mm alocam as reservas energéticas para o seu crescimento, em contrapartida, animais maiores alocam a reserva nutricional para a reprodução (SEED & SUCHANEK, 1992) e isso pode implicar nos parasitos maior facilidade e biodisponibilidade dessas reservas para o seu benefício.

Os resultados obtidos por ambas as técnicas demonstram que a área amostral de Vitória é que apresenta maior risco para a saúde dos animais. Como salientou Addum & Oliveira (2010), Vitória é uma região extremamente consumidora desses mexilhões e a enfermidade pode trazer graves consequências para quem oingere, bem como corre-se o risco de haver declínio populacional em virtude da baixa produtividade de gametas (FRANÇA *et al.*, 2020, *em fase final de elaboração*) e da morte dos hospedeiros intermediários com a liberação das cercárias.

O estudo conduzido por Addum & Oliveira (2010) compararam a infecção por bucefalídeos em dois pontos amostrais (Vitória e Anchieta) e observaram maior prevalência no município de Vitória, que sofre mais com ações antrópicas do que o município de Anchieta. A prevalência observada neste estudo no que tange áreas antropizadas e áreas controle segue o que foi encontrado neste artigo. Segundo aqueles autores a flutuação da prevalência está diretamente relacionada com a poluição, o relevo e o clima da região amostral de Vitória. De acordo com eles, Vitória é uma cidade portuária, com maior concentração populacional, esgotamento despejado no estuário e resíduos antrópicos lançados na bacia dos rios que desembocam nesta região e indicam que esta

área é mais poluída do que Anchieta, influenciando na prevalência parasitária. Essa poluição possivelmente está diretamente relacionada a biodisponibilidade de alimento para os mexilhões que aumentam os tamanhos dos mexilhões e o seu peso, podendo então assimilar mais reserva energética do que os indivíduos de Setiba. Outro possível fator é que a eutrofização aumente a disponibilidade de fontes alimentares, que deixam de ser um fator limitante para a reprodução, permitindo que esses indivíduos tenham constante produção gamética e sem repouso sexual (FRANÇA *et al.*, 2020, *em fase final de elaboração*), isso infere nesses mexilhões uma maior reserva nutricional nos tecidos reprodutivos que são a principal fonte alimentar desses parasitos e isso implicaria na maior prevalência dos patógenos nos mexilhões marrons.

Além disso, Vitória é uma área mais abrigada e segundo Henriques (2004), Costa (2007) e Magalhães (1998) são mais sujeitas a contaminação bacteriológica do que Setiba, que é uma área mais exposta às ondas e as ações hidrodinâmicas. As pesquisas conduzidas na Baía de Guanabara por Loureiro & Morais (2001) também observaram elevação parasitária ligada ao aumento da poluição das águas e a consequente degradação dos ecossistemas.

A presença dos parasitos está diretamente relacionada a fase do ciclo sexual em que os organismos se encontram: quanto maior a disposição para os estádios de produção gamética, maior a disponibilidade de alimento e maior taxa de infecção. Todavia, todos os autores já citados reforçam que a fase gametogênica é o fator mais preponderante para a parasitose, uma vez que os bucefalídeos se alimentam das reversas nutritivas dos hospedeiros. No presente estudo o maior período de produção de gametas ocorreu nos meses do verão e início do outono, assim é justificável a presença massiva do patógeno neste período em contrapartida do observado por outros autores.

A prevalência de parasitos especialmente no verão contrapõe o observado por diferentes autores (COCHÔA & MAGALHÃES, 2008; GALVÃO *et al.*, 2006; MAGALHÃES, 1998; GARCIA E MAGALHÃES, 2008; SILVA *et al.*, 2002), que justificam a intensidade parasitária no inverno em virtude da amenidade da temperatura, da menor pluviosidade e da migração de peixes hospedeiros definitivos dos bucefalídeos advindos do sul da América Latina, que liberam os ovos do parasito na água e ocorre a infecção de *P. perna*. Como grande parte dos estudos sobre bucefalose acontecem a partir das análises de mexilhões de cultivo e o verão é a época de início do cultivo, onde os organismos não estão com o tamanho mínimo para ocorrência da bucefalose em virtude de

ainda não estarem maduros sexualmente, este evento pode mascarar os resultados possivelmente obtidos a partir da coleta de espécimes de costão rochoso. Esta hipótese é sustentada pelo estudo realizado por Medeiros (2013), que relatou maior prevalência de bucefalose em mexilhões de costão rochoso nos meses de fevereiro e março, indicando assim que em condições *in natura* o verão pode potencialmente ser a época do ano com maior ocorrência de bucefalídeos. Isso decorre da maior parte dos organismos marinhos encontrarem-se em período reprodutivo, aumentando a disponibilidade de alimento, tamanho dos mexilhões dentro da faixa de maior infecção, migração de peixes e maior proximidade de diferentes animais oceânicos possivelmente portadores de bucefalídeos nos costões rochosos (SOUZA, 1990; COSTA, 2007; ANDRADE, 2017). É importante ressaltar que indivíduos com tamanho inferior a 30mm podem potencialmente serem infectados pelos bucefalídeos, uma vez que apesar de não terem tecidos reprodutivos viáveis, possuem glândula digestiva que também são fonte nutritivas, todavia, estudos posteriores precisam ser realizados a fim de que essa hipótese seja corroborada.

Além da infecção ser maior no verão e em costões rochosos, autores como Addum & Oliveira (2010), Galvão *et al.* (2006) descrevem maior percentagem de infecção em machos do que em fêmeas, porém, em nossas análises a prevalência de infecção foi significativamente superior em fêmeas. Medeiros (2013) e Thangavelu & Sanjeevaraj (1987) também observaram maior prevalência de bucefalídeos em fêmeas. Lunetta (1969) descreveu que fêmeas apresentam maior disponibilidade e produção de lipídeos e glicogênios, assim, pela maior biodisponibilidade é possível que os bucefalídeos infectem e incidam mais em fêmeas. Isso pode corroborar a maior incidência de eliminação de gametas em Vitória para compensar o menor recrutamento ocorrido neste ponto, uma vez que os patógenos utilizam a reserva glicídica e lipídica dos hospedeiros, impedindo que estes se reproduzam. As oscilações durante os meses nas análises microscópicas estão relacionadas à menor taxa de parasitismo neste ponto e aos altos índices de repouso sexual ocorrido nesses pontos (FRANÇA *et al.*, 2020b em fase final de elaboração).

Os bucefalídeos apresentam um agrupamento parafilético e as análises feitas até o momento ainda não foram conclusivas com relação à espécie, assim, saber qual espécie parasita o mexilhão da costa do Espírito Santo é fundamental para que possíveis medidas de controle desses patógenos possam ser tomadas. Os estudos moleculares indicaram que possível mente são as espécies: *Prosorhynchoides paralichthydis* e *Prosorhynchoides waeschenbachae*.

É notório que a bucefalose é um grave problema à saúde, reprodução e desenvolvimento de *P. perna*. Ao observarmos no presente estudo quase 50% dos indivíduos analisados infectados é alarmante e preocupa-nos a saúde da biota dessa região. A prevalência dos bucefalídeos varia de 2% a 66% na costa brasileira (SILVA *et al.*, 1996; MAGALHÃES; 1998; LIMA *et al.*, 2001; FERREIRA & MAGALHÃES; 2004; COSTA, 2007; COCHÔA & MAGALHÃES, 2008; GARCIA & MAGALHÃES, 2008; ADDUM & OLIVEIRA, 2010; MEDEIROS, 2013; ROMÃO *et al.*, 2014; ANDRADE, 2017). Isso demonstra que ao longo dos anos a bucefalose oscilou e aumentou a infecção e os consequentes malefícios de sua interação ecológica. Mesmo quando a incidência foi baixa, os organismos parasitados apresentaram intensidade de infecção elevada, isto é, há castração parasitária.

Grandes percentuais de prevalência de bucefalose podem reduzir o recrutamento no nível da população (CARBALLAL *et al.*, 2001) em razão da redução das reservas energéticas dos tecidos e da eficácia do sistema circulatório, ocasionando distúrbios na gametogênese (BOWER *et al.*, 1994; ZEIDAN, 2011). Além disso, Costa (2007) salienta que as consequências da bucefalose também estão correlacionadas com a diminuição de larvas dos mexilhões disponíveis nas baías, reduzindo o assentamento de larvas no ambiente natural que acarretam em graves problemas no repovoamento e manutenção dos estoques naturais.

A infecção de *P. perna* por bucefalídeos é grave principalmente no município de Vitória, área altamente antropizada. As fêmeas apresentam as maiores taxas de infecção, indicando que esta espécie está sujeita a declínio populacional durante todos os meses, especialmente no verão. Como base da cadeia trófica, seu declínio e possível mortalidade em massa podem culminar em ruptura e fragmentação do ecossistema, assim, somando-se este fato a comercialização para fins alimentícios é fundamental que estudos como este sejam realizados regularmente a fim de monitorar, de forma preventiva, os aspectos da saúde desses bivalves e proporcionar a segurança necessária para quem dele se alimenta.

## REFERÊNCIAS

- ADDUM, F.M.; OLIVEIRO, C.S. Prevalência parasitária de *Bucephalus* (von Baer, 1827) em *Perna perna* (Linnaeus, 1758) em dois costões rochosos no litoral do Espírito Santo. *Revista Científica Faesa*, v. 6, n. 1, p. 69-76, 2010.
- AMATO, J.F.R. Digenetic trematodes of percoid fishes of Florianópolis, southern Brasil Bucephalidae. *Rev. Brasil. Biol.*, v. 42, n. 4, p. 667-680, 1982.
- ANDRADE, V.R.D. Bucefalose e outras parasitoses associadas a bivalves de interesse econômico do Litoral e Baixo Sul da Bahia. 2017. Disponível em: [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=4983003](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=4983003). Acesso em: 29 de janeiro de 2020.
- BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O. Parasitos e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira. *In: SILVA-SOUZA, A.T.; LIZAMA, M.L.A.; TAKEMOTO, R. Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos*. Maringá: ABRAPOA, p. 165-194, 2012.
- BOWER, S.M.; MCGLADDERY, S.E.; PRICE, I.M. Synopsis of infection diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, n. 4, p. 1-199, 1994.
- CARBALLAL, M. J.; IGLESIAS, D.; SANTAMARINA, J.; FERRO-SOTO, B; VILLALBA, A. Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the Coast of Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 78, p. 87-97. 2001.
- CHENG, T.C. *Parasitología General*. Madrid: 2. Ed. Editorial AC. p. 965, 1978.
- COCHÔA, A.R.; MAGALHÃES, A.R.M. Perdas de sementes de mexilhões *Perna perna* (L., 1758), cultivados na Baía Norte - Ilha de Santa Catarina/SC. *São Paulo: B. Inst. Pesca*, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2008.
- COLE, H.A. On some larval trematode parasites of mussel (*Mytilus edulis*) and cockle *Cardium edule*. *Parasitology*, v. 27, p. 276-280, 1935.
- COSTA, M.B. Avaliação da contaminação por compostos organoestânicos (COEs) no litoral do Espírito Santo por meio de indicadores biológicos, imposex e intersex: uma análise espacial e temporal. Tese (Doutorado em Oceanografia Ambiental) – Programa de pós-graduação em Oceanografia Ambiental do Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.
- COSTA, M.B.; FERNANDEZ, M.A.S.; BARBIERO, D.C.; MELO, F.T.V.; OTEGUI, M.B.P.; FERREIRA, B.S. First record imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 56, p. 145-148, 2008.
- COSTA, M.B.; ZAMPROGNO, G.C.; OTEGUI, M.B.P. PEDRUZZIM F,C.; DALBEM, G.B.; SILVA, D.A.; RESENDE, A.C.B. A temporal and spatial monitoring of organotin pollution in a harborside region of Brazil by imposex and ecological quality ratio using *Leucozonia nassa*. *Environ. Monit. Assess.*, v. 189, n. 650, p. 1-16, 2017.
- COSTA, M.B.; ZAMPROGNO, G.C.; PEDRUZZI, F.C.; DALBEM, G.B.; TOGNELLA, M.M.P. Assessing the Continuous Impact of Tributyltin from Antifouling Paints in a Brazilian Mangrove Area Using Intersex in *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) as Biomarker. *Internacional Journal of Oceanography*, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- COSTA, R.L. Prevalência de enfermidades e histopatologia de *Perna perna* (Mollusca) em Florianópolis/SC, Brasil. Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade

Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 31, 2007.

ELSTON, R.A. Mollusc diseases. Guide for the shellfish farmer. Seattle: University of Washington Press. p. 73, 1990.

FERREIRA, J.F.; MAGALHÃES, A.R.M. Cultivo de Mexilhões. In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. Aquicultura - Experiências Brasileiras. Florianópolis: Multitarefa. p. 221-250, 2004.

FRANÇA, M.A.; DAROS, B.N.; SCHUAB, J.M.F.M.; MILAGRES, M.R.; ZAMPROGNO, G.C.; OTEGUI, M.B.P.; COSTA, M.B. Ciclo reprodutivo de *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Mytilidae) como biomarcador para contaminação ambiental em bancos costeiros naturais. 2020. Em fase de elaboração.

GALVÃO, M.S.N., HENRIQUES, M.B., PEREIRA, O.M., MARQUES, H.L.A. Ciclo reprodutivo e infestação parasitária de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758). Bol. Inst. Pesca v. 32, p. 59-71, 2006.

GARCIA, R.; MAGALHÃES, A.R.M. Protocolo de identificação e quantificação de bucefalose (enfermidade laranja) em mexilhões *Perna perna*. B. Inst. Pesca, v. 34, n. 1, p. 11-19, 2008.

HENRIQUES, M. B. Resistência do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), proveniente de bancos naturais da Baixada Santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo. Doutorado apresentado ao Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, p. 113, 2004.

JESUS, H.C.; COSTA, E. A.; MENDONÇA, A.S.F.; ZANDONADE, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 378-386, 2004.

KINNE, O. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). Diseases of Marine Animals, Introduction Bivalvia to Scaphopoda. v.2. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland. P. 961, 1983.

LASIAK, T. 1992 Bucephalid trematode infections in mytilid bivalves from the rocky intertidal of southern Chile. *J. Mollus. Stud.*, v. 58, p. 29–36, 1992.

LASIAK, T. The prevalence of Proctoeces (Trematoda: Fellodistomidae) metacercarial infections in the brown mussel *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae) around the southern African coast. *S.-Afr. J. Zool.*, v. 24, n. 3, p. 178-186, 1989.

LAUCKNER, G. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: Kinne, O. (Ed.). Diseases of Marine Animals, Introduction Bivalvia to Scaphopoda. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland. v.2. p. 477–961, 1983.

LEITE, L.A. Influência da predação, parasitismo e densidade de sementes nas perdas de mexilhões *Perna perna* (L., 1758), cultivados na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 39, 2007.

LIMA, F.C.; ABREU, M.G.; MESQUITA, E.F.M. Monitoramento histopatológico de mexilhão *Perna perna* da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 53, n. 2, p. 1-5, 2001.

LOUREIRO, E. D. R.; MORAIS, R. B. C. Influência da poluição da Baía de Guanabara na infecção parasitária de mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758). In: MORAES, R. Efeitos de poluentes em organismos marinhos. São Paulo: Arte & Ciências Villipress, p. 89-101, 2001.

LUNETTA, J.E. Fisiologia da reprodução dos mexilhões (*Mytilus perna* – Mollusca: Lamellibranchia). *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha.*, v. 26, p. 33-112, 1969.

MAGALHÃES, A.R.M. Efeito da parasitose por trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição do mexilhão *Perna perna* (L.). Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 185, 1998.

MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F. Patologias e manejo em malacocultura. In: SILVA-SOUZA, A.T.; LIZAMA, M.L.A.; TAKEMOTO, R. Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos. Maringá: ABRAPOA, p. 387, 2006.

MAGALHÃES, A.R.M.; PIMPÃO, D.M.; ALVES, R.; SARTOR, F; BECKER, A.P. Parasitismo em mexilhões de estoques naturais na ilha de Santa Catarina-SC, Brasil. In: VI Encontro Brasileiro de Patologistas de organismos aquáticos (ENBRAPOA). II Encontro Latino-Americano de Patologistas de Organismos Aquáticos (ELAPOA). Florianópolis, p.4, 2000.

MARCHIORI, N.C. Identificação e ciclo de vida de *Bucephalus margaritae* (Ozaki e Ishibashi, 1934) (Digenea, Bucephalidae) do litoral de Santa Catarina, Brasil. Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 42, 2008.

MARCHIORI, N.C. Oviposição, eclosão e desenvolvimento de *Aphnoblasteria mastigatus* (Suriano, 1986) (Platyhelminthes, Monogenea), parasito de *Rhamdia quelen*, e sua relação com a temperatura e salinidade da água. Tese apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 94, 2013.

MEDEIROS, S.C. Bucefalose no cultivo de mexilhões: relação do parasita com os hospedeiros iniciais. Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, p. 68, 2013.

ORTIZ, L.C. Resíduos sólidos em praias do Espírito Santo sob diferentes regimes de uso. Monografia apresentada ao Departamento de Oceanografia da Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, p. 69, 2010.

PEREIRA JÚNIOR., J.; ROBALDO, R.B.; SOUTO-RAITER, V.M.M. Um possível ciclo de vida de *Bucephalus varicus* (Manter, 1940) (Trematoda: Bucephalidae) no Rio Grande do Sul. Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia Pontifícia Universidade Católica do RS, v. 9, n. 1, p. 31-36, 1996.

PODRATZ, P. L., MERLO, E., SENA, G.C., MOROZESK, M., BONOMO M.M., MATSUMOTO, S. T., DA COSTA, M. B., ZAMPROGNO, G.C.; BRANDÃO, P.A.; CARNEIRO, M. T.; MIGUEL EDE, C.; MIRANDAALVES, L.; SILVA, I. V.; GRACELI, J. B. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. *Reproductive Toxicology*. v. 57, p. 29- 42. 2015.

ROBALDO, R.B. Parasitos digenéticos do camorim *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) cultivado em Itamaracá, Pe, Brasil. Recife. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Pernambuco, p. , 1995.

ROMÃO, L.S.; FERREIRA, L.P.; MAGGIONI, R.; ARAÚJO, R.L.; GESTERIRA T.C.V.; DA SILVA, P.M.; SABRY, R.C. Patógenos em duas espécies de bivalves comercialmente importantes do estuário do Rio Pacoti, Estado do Ceará, Brasil. *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 47, p. 57–63, 2014.

SCHAEFER, A.L.C. Macro e micropatógenos em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) e implicações na mitilicultura catarinense. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 123, 2015.

SEED, R.; SUCHANEK, T.H. Population and community ecology of *Mytilus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, v. 25, n. 4, p. 87-169, 1992.

SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A. Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* mussels from a culture station in Ratones Grande Island, Brazil. *Journal*

of Invertebrate Pathology, v. 79, p. 154-162, 2002.

SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A. Pathologies in comercial bivalve species from Santa Catarina State, southern Brazil. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, v. 92, p. 571-579, 2012.

SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F. Infestation of *Perna perna* mussel (Bivalvia: Mytilidae) by digenetic trematodes of the family Bucephalidae, *Bucephalus* genus, in Brasil. J. Med. & Appl. Malacol., 8: 25, 1996.

SOUZA, W.P. Spatial scale and the processes structuring a guild of larval trematode parasites, in: Esch, G.W., Bush, A.O., Aho, J.M. (Eds.), Parasite communities: patterns and processes. London: Chapman & Hall, p. 41-67, 1990.

SUÁREZ-MORALES, E.; SCARDUA, M.P.; SILVA, P.M. Occurrence and histopathological effects of *Monstrilla* sp. (Copepoda: Monstrilloida) and other parasites in the brown mussel *Perna perna* from Brazil. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, v. 90, p. 953-958, 2010.

THANGAVELU, R., SANJEEVARAJ, P.J. Host-parasite relation between *Bucephalopsis haemeanas* and *Crassostrea madrasensis* in the Pulicat Lake. J. Mar. Biol. Ass. India., v. 29, p. 220-225, 1987.

UMIJI, S.; LUNETTA, J.E.; LEONEL, R.M.V. Infestation of the mussel *Perna perna* by digenetic trematodes of the Bucephalidae family, gen. *Bucephalus*. An. Acad. Bras. Cienc., v. 47, p. 115-117, 1976.

WARDLE, W.J. Larval Bucephalids (Trematoda: Digenea) parasitizing bivalve molluscs in the Galveston Bay Area, Texas. J Helminthol Soc Wash, v. 57, n. 1, p. 5-11, 1990.

ZEIDAN, G.C., LUZ, M.S.A., BOEHS, G. Parasites of economically important bivalves from the southern coast of Bahia State, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., v. 21, p. 391-398, 2011.