

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS MARINHOS E COSTEIROS

MATEUS PIRES DA CRUZ

**Material particulado atmosférico sedimentável como um
disruptor osmorregulatório do bivalve marinho *Perna
perna***

SANTOS

2024

MATEUS PIRES DA CRUZ

**Material particulado atmosférico sedimentável como
um disruptor osmorregulatório do bivalve marinho *Perna
perna***

Dissertação apresentada a
Universidade Santa Cecília como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ecologia, sob a
orientação do Profa. Dra. Helen
Sadauskas-Henrique.

SANTOS

2024

571.9543 C963m	<p>Cruz, Mateus Pires da. Material particulado atmosférico sedimentável como um disruptor osmorregulatório do bivalve marinho Perna perna / Mateus Pires da Cruz. 2024. 39 f.</p> <p>Orientador: Dra. Helen Sadauskas Henrique.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade Santa Cecília, Programa de pós-graduação em Sustentabilidade de ecossistemas marinhos e costeiros , Santos, SP, 2024.</p> <p>1. Metais. 2. Metalóides. 3. Brânquias. 4. Hemolinfa. 5. Conchas. 6. Material particulado atmosférico . I. Henrique, Helen Sadauskas. II. Material particulado atmosférico sedimentável como um disruptor osmorregulatório do bivalve marinho Perna perna.</p>
-------------------	--

AGRADECIMENTOS

O autor do trabalho gostaria de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento Superior (CAPES) - Código De Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Bolsa 2019/08491-0) pelo financiamento. Agradeço á paciência e as explicações da Profa. Dra. Helen Sadauskas. Agradeço ao apoio emocional da Coordenadora Profa. Dra. Ursulla Souza Pereira.

RESUMO

O material particulado atmosférico (MPA) pode contaminar ecossistemas aquáticos devido à precipitação contínua (material particulado atmosférico sedimentável, MPAs). O bivalve marinho *Perna perna* é um potencial alvo do MPAs em áreas contaminadas por ser um organismos sésil e filtrador. Este estudo investigou a bioacumulação de metais e metalóides nos tecidos moles, parâmetros fisiológicos, metabolismo energético, e a resistência da concha de *P.perna* expostos à diferentes concentrações do MPAs em diferentes tempos. Hipotetizamos que a bioacumulação de metal e metalóides provenientes do MPAs nos tecidos moles do mexilhão será dependente da concentração e do tempo, enquanto as respostas biológicas estarão relacionadas com a presença desses elementos nos tecidos moles. Assim, foram realizadas exposições semi-estáticas (2, 4, 7, 15 e 30 dias) em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1 g L⁻¹) do MPAs. A Bioacumulação de metais e metalóides na água e nos tecidos moles; glicose, lactato, íons (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ e Mg²⁺) no plasma, osmolalidade na hemolinfa; atividades das enzimas: Na⁺, K⁺ ATPase (NKA); H⁺ATPase (VHA), anidrase carbônica (AC) e Ca²⁺ATPase nas brânquias, e o ensaio de resistência da concha em relação à exposição ao MPAs foram avaliados. A bioacumulação foi dependente do metal/metalóide nas diferentes concentrações de MPAs, mas não aumentou progressivamente em relação ao tempo de exposição. Zn e Ba em 0,01g L⁻¹; Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, e Cd em 0,1 g L⁻¹; e Ni, Fe e Zn em 1 g L⁻¹, apresentaram aumentos significativos em relação ao controle. O tempo de exposição e as concentrações do MPAs não causaram alterações na glicose, lactato, Na⁺, Cl⁻, e Mg²⁺ plasmáticos e osmolalidade na hemolinfa, tampouco na resistência da concha. No entanto, as atividades das enzimas branquiais (NKA, VHA, CA e Ca²⁺ATPase) e as concentrações de Ca²⁺ e K⁺ na hemolinfa variaram com o tempo e o tratamento. O Cd apresentou correlações com a osmolalidade; o Sr com K⁺; e o Rb com Na⁺, NKA e CA. Nossos resultados sugerem que os elementos provenientes do MPAs, podem alterar os sítios ativos e passivos das brânquias, causando alterações iônicas e a bioacumulação *Perna perna*.

Palavras-chave: Brânquias. Conchas. Hemolinfa. Material particulado atmosférico. Metais. Metalóides.

ABSTRACT

Atmospheric particulate matter (MPA) can contaminate aquatic ecosystems due to continuous precipitation (settleable atmospheric particulate matter, SePM). The marine bivalve *Perna perna* is a potential SePM target in contaminated areas. This study investigated if increased SePM concentration and time exposure can lead to metals bioaccumulation in *P. perna*, affecting its osmoregulatory parameters and shell resistance. Thus, semi-static exposures (2, 4, 7, 15 and 30 days), at different SePM concentrations (0.01; 0.1; 1 g L⁻¹), were conducted. We analysed metal bioaccumulation in soft tissue. Glucose, lactate, ions (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Mg²⁺) and osmolality were evaluated in haemolymph. Enzymatic activities: Na⁺, K⁺ ATPase (NKA), v-type H⁺ ATPase, carbonic anhydrase (CA) and Ca²⁺ ATPase were assessed in gills. Additionally, a shell resistance assay was conducted to verify the shell biomineralization regarding SePM exposure. The bioaccumulation was element-dependent at different SePM concentrations but did not increase progressively regarding the exposure time. The 0.1 g L⁻¹ treatment presented higher concentrations of the six most significant metals (Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, and Cd) in the soft tissue, while 0.01 and 1 g L⁻¹ treatments presented higher concentrations of some elements (Ni, Zn, and Ba; Fe and Zn, for 0.01 and 1 g L⁻¹, respectively). The exposure time and SePM concentrations did not cause alterations, neither in haemolymph glucose, lactate, Na⁺, Cl⁻, Mg²⁺ concentrations nor in the osmolality and shell resistance. However, the activities of gill enzymes (NKA, v-type H⁺ ATPase, CA, and Ca²⁺ ATPase) and haemolymph Ca²⁺ and K⁺ concentrations varied with time and treatment. Cd presented correlations with osmolality; Sr, with K⁺; and Rb, with Na⁺, NKA and CA. This suggests that these metals, arising from SePM, could alter the gill active and passive sites for element absorption, causing osmo and ion disturbances to *Perna perna*.

Keywords: Gill. Hemolymph. Metalloids. Metals. Particulate atmospheric matter. Shells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<p>Figura 1. Concentração de íons (média ± erro padrão) na hemolinfa de <i>Perna perna</i> do grupo controle (0,0 g L⁻¹ MPAs) e grupos expostos a 0,01, 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs durante 30 dias (2, 4, 7, 15, 30 dias). Concentrações de Na⁺(A), K⁺ (B), Ca²⁺ (C), Mg²⁺(D), Cl⁻(E) e osmolalidade (F).....</p>	24
<p>Figura 2. Glicose (A) e lactato (B) (média ± erro padrão) na hemolinfa de <i>Perna perna</i> do grupo controle (0,0 g L⁻¹ MPAs) e grupos expostos a 0,01, 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs mais de 30 dias (2, 4, 7, 15, 30 dias)</p>	25
<p>Figura 3. Na⁺, K⁺ ATPase (A) e H⁺ ATPase tipo v (B) (média ± erro padrão) das brânquias de <i>Perna perna</i> do grupo controle (0,0 g L⁻¹ MPAs) e grupos expostos a 0,01, 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs durante 30 dias (2, 4, 7, 15, 30 dias).....</p>	27
<p>Figura 4. Ca²⁺ ATPase (A) e anidrase carbônica (B) (média ± erro padrão) das brânquias de <i>Perna perna</i> do grupo controle (0,0 g L⁻¹ MPAs) e grupos expostos a 0,01, 0,1 e 1,0 g L⁻¹ durante 30 dias.....</p>	28
<p>Figura 5. Coeficientes de correlação de postos de Spearman (N = 85) entre respostas biológicas (Glucose “Gluc”; Lactato “Lact”; Anidrase carbônica “CA”; Hemolinfa Osmolalidade “Osm-He”, Potássio “K-He”, Sódio “Na -He”, Magnésio “Mg-He”, Cloreto “Cl-He”; enzimas branquiais Ca²⁺ ATPase “Ca-ATPase-Gills”; tipo v H⁺ ATPase “H⁺ATPase- Gills”, Na⁺, K⁺ ATPase “NKA- Gills”, projéteis forças de compressão e as concentrações de metais e metalóides em tecido mole de <i>Perna perna</i>.....</p>	30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Concentrações de metais e metalóides (média \pm erro padrão) no MPA e dissolvidos em cada água experimental (MPAs) nas diferentes concentrações (0,0: controle; 0,01; 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs) ao longo de 30 dias(2, 4, 7, 15 , 30)..... 20
- Tabela 2. Metais e metalóides (n = 5, média \pm erro padrão) nos tecidos moles do mexilhão *Perna perna* após a exposição a diferentes concentrações (0,0: controle; 0,01; 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs) ao longo de 30 dias (2, 4, 7, 15 , 30)..... 22
- Tabela 3. Força de compressão (média \pm erro padrão) necessária para produzir a primeira ruptura nas conchas de *Perna perna* do grupo controle (0,0 g L⁻¹ MPAs) e grupos expostos a 0,01, 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs durante 30 dias..... 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Alumínio
AS	Arsênio
FE	Ferro
BA	Bário
CD	Cádmio
CE	Cério
CU	Cobre
LA	Lântanio
MN	Manganês
MPA	Material Particulado Atmosférico
NI	Níquel
PB	Chumbo

RB	Rubídio
SE	Selênio
MPAs	Material Particulado Atmosférico Sedimentável
SR	Estrôncio
ZN	Zinco
ZR	Zircônio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1. Material particulado atmosférico sedimentável ambiental (MPAs).....	14
2.2. Exposição ao MPAs.....	14
2.3. Análise de metais e metalóides.....	15
2.4 Análise fisiológica.....	15
2.4.1. Glicose, Lactato, íons (Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ e Mg ²⁺) e osmolalidade.....	15
2.4.2. Atividades de enzimas (Na ⁺ , K ⁺ ATPase, H ⁺ ATPase tipo v, anidrase carbônica e Ca ²⁺ ATPase) nas brânquias.....	16
2.5. Análise da compressão das conchas.....	17
2.6. Análise estatística.....	17
3. RESULTADOS	18
3.1 Parâmetros físicos e químicos da água e análises de metais e metalóides nos	

tecidos moles.....	18
3.2 Glicose, Lactato, íons (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+}) e osmolalidade.....	23
3.3 Atividades de enzimas (Na^+ , K^+ ATPase, H^+ ATPase tipo v, anidrase carbônica e Ca^{2+} ATPase) nas brânquias.....	26
3.4 Análise de compressão.....	29
3.5 Análise de correlação.....	29
4.DISSCUSSÃO	31
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

O material particulado atmosférico (MPA), resultante de atividades industriais, constitui uma das vias de contaminação dos ecossistemas com metais e metalóides (Türtscher et al., 2017). No Brasil, a poluição por MPA é agravada pelas operações metalúrgicas (Santos et al, 2017; Galvão et al., 2022) que liberam fumaça contínua pelas chaminés promovendo uma notável e importante produção de MPA com composição complexa em termos de tipos, quantidades, e aspectos físicos de seus componentes.

Metais e metalóides, que são contaminantes persistentes constituem 80% do MPA liberado pelas indústrias metalúrgicas (Soares et al., 2022). Esses contaminantes podem ser transferidos para ecossistemas aquáticos por meio de precipitação contínua (por exemplo, material particulado atmosférico sedimentável, MPAs) (Souza et al, 2021). Os metais e metalóides podem estar presentes no ambiente em solução, como íons livres hidratados, complexados com ligantes orgânicos e inorgânicos, ou na forma sólida, suspensa como partículas ou associada a sedimentos. Várias dessas formas podem interagir com a biota, bioacumular nos organismos, biomagnificar ao longo da cadeia alimentar, causando efeitos deletérios na biota e induzindo desequilíbrio ecológico nos ecossistemas aquáticos (Yamamoto et al. 2016). Metais e metalóides podem competir por sítios de absorção de elementos essenciais (por exemplo, As x fósforo; Cu x Na; Zn x Co; Cd x Pb; Sr x Ca; Ni x Mg) (Wood, 2011), o que pode reduzir a captação e a homeostase de nutrientes essenciais. Além disso, essa competição pode inibir a extrusão ativa de íons como Na^+ e Cl^- em organismos marinhos, prejudicando o equilíbrio iônico. Algumas enzimas são descritas como cruciais para esse equilíbrio, além de outros processos fisiológicos essenciais para bivalves, como a calcificação da concha. A Na^+ , K^+ ATPase (NKA) é uma enzima basolateral que bombeia ativamente Na^+ para fora da célula, atuando também como uma bomba de Cl^- na mesma direção (Tresguerres et al., 2023). Além disso, a NKA tem sido considerada uma enzima de múltiplas funções, além da função dos movimentos transepiteliais de íons (Boo et al., 2017). A H^+ -ATPase (VHA) é crítica para a excreção de HCO_3^- em organismos marinhos e é vital para a regulação ácido-base (Tresguerres, 2016). A metaloenzima anidrase carbônica (CA) desempenha um papel crucial na hidratação do CO_2 para

formar H^+ e HCO_3^- . Esta enzima é essencial para vários processos fisiológicos, como regulação ácido-base, respiração, regulação iônica e calcificação da concha em espécies aquáticas (Harayashiki et al., 2022; Vitale et al., 1999). Em moluscos marinhos, a CA, juntamente com a **Ca²⁺ ATPase** encontrada nas brânquias, estão principalmente associadas à formação de carbonato ($CaCO_3$) em suas conchas (Wang et al., 2017).

Organismos sésseis e filtradores, como o *P.perna*, são uma ferramenta poderosa para avaliar o risco ecológico de metais e nanopartículas metálicas presentes em MPA (Duarte et al. 2023). Estudos ecotoxicológicos já foram empregadas na costa sudeste do Brasil, confirmando que ambientes estuarinos e costeiros próximos a áreas industriais metalúrgicas sofrem com a presença dos contaminados provenientes do MPAs (Souza et al., 2018). Ainda, a presença de partículas metálicas já foram identificadas em diferentes elos da cadeia trófica de estuários contaminados pelo MPAs (Souza et al., 2013, 2018, 2021, 2022), evidenciando sua transferência através da teia alimentar (Souza et al., 2018).

Nesse sentido, levantamos a hipótese de que aumentos na concentração de MPA e no tempo de exposição levam a maior bioacumulação de metais e metaloides, perturbando parâmetros fisiológicos e reduzindo a resistência da concha no mexilhão marinho *Perna perna*. Esta hipótese foi verificada através de (1) quantificação da bioacumulação de metais e metaloides nos tecidos moles de *P. perna* ao longo de 30 dias de exposição ao MPA; (2) avaliar atividades de enzimas Na^+ , K^+ ATPase (NKA), H^+ ATPase (VHA), anidrase carbônica (CA) e Ca^{2+} ATPase nas brânquias; (3) avaliar as concentrações de íons (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+}), glicose e lactato plasmáticos e osmolalidade na hemolinfa; (4) analisar a resistência das conchas e (5) correlacionar a bioacumulação com os parâmetros biológicos analisados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material particulado atmosférico sedimentável ambiental (MPAs)

O MPA foi amostrado na Ilha do Boi (20°17'03,8"S, 40°14'24,9"W), cidade de Vitória, Espírito Santo, Brasil, em outubro de 2020 (Duarte et al., 2023). Esta área

apresenta elevados níveis de emissões de MPA da indústria metalúrgica vizinha (Complexo de Tubarão) (Galvão et al., 2022). O procedimento de amostragem seguiu a metodologia descrita por Souza et al. (2021) e foi realizado pela JUNTOS SOS Ambiental. As amostras foram coletadas diariamente a cerca de 20m do solo durante 30 dias consecutivos em uma área de 5000 m². Foram coletados no período 20 kg de MPA que foram subamostrados em recipientes plásticos (1 kg) e armazenados até serem utilizados nos experimentos.

2.2. Exposição ao MPAs

Os *Perna perna* (n= 360, comprimento médio 61,76 ± 3,07 mm, largura 31,12 ± 2,90 mm e peso 20,45 ± 4,27 g) foram obtidos de maricultura localizada na praia da Cocanha (Caraguatatuba, litoral paulista) longe de qualquer fonte de contaminação e transportados ao laboratório em caixas térmicas. Para a realização dos experimentos, foram obtidos 1000 L de água marinha filtrada do aquário marinho do município de Guarujá, Estado de São Paulo, que coleta água do mar (20 m de distância da costa).

Em laboratório, os indivíduos de *P.perna* foram aclimatados durante 10 dias utilizando água marinha filtrada com aeração e temperatura constantes (20 ± 2°C). Exposições semi-estáticas durante 2, 4, 7, 15 e 30 dias ao MPAs em diferentes concentrações (0: controle; 0,01; 0,1; 1,0 g L⁻¹) foram realizadas utilizando 20 aquários separados de 50 L cada um contendo 20 indivíduos, onde, a cada tempo de exposição, 5 indivíduos foram retirados de cada tratamento experimental (0: controle; 0,01; 0,1; 1,0 g L⁻¹).

As concentrações de MPAs utilizadas corresponderam às concentrações ambientalmente relevantes segundo o órgão regulador Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA) do estado do Espírito Santo (IEMA, 2022). Durante a exposição, os parâmetros físico-químicos foram controlados e monitorados a cada dois dias (temperatura: 20 ± 2 °C; aeração constante; salinidade: 35%; amônia total: 2 mg L⁻¹ no máximo). A água do aquário foi trocada a cada 15 dias, incluindo a adição de um novo MPA para manter a concentração inicial. Os mexilhões foram alimentados a cada dois dias (2 mL de fitoplâncton, marca Seachem®, 1–20 µm) sob fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro. Amostras de água para análises dos metais e metalóides presentes na água dos aquários foram coletadas no final do

experimento. A hemolinfa e as brânquias foram amostradas e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) e as conchas (valva direita) em freezer (-20°C) até o momento das análises.

2.3. Análise de metais e metalóides

As amostras de água do experimento dos diferentes tratamentos foram acidificadas com ácido nítrico (2%), filtradas em filtros de nitrocelulose (0,45 µm), dessalinizadas, transferidas para tubos de polietileno e mantidas a 4°C até a análise. Os tecidos moles dos indivíduos (n = 3) foram secos a 37-42°C; em seguida, ácido nítrico destilado (4 mL) e ácido clorídrico (1 mL) foram adicionados a 0,5 g de tecido (massa seca) e digeridos em recipientes fechados com tampa de polietileno em forno de micro-ondas (digestor Mars Xpress 6, Berghof speedwave XPERT, Alemanha) de acordo com o Método USEPA 200.8 (1994). Os metais e metalóides presentes na água experimental e nos tecidos moles digeridos foram quantificados (28 elementos) com Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). O procedimento para análise de metais e metalóides está detalhado em Duarte et al. (2023).

2.4 Análise fisiológica

2.4.1. Glicose, Lactato, íons (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ e Mg²⁺) e osmolalidade

As amostras de hemolinfa foram utilizadas para análise da osmolalidade e posteriormente foram centrifugadas para separação do plasma (5000 rpm, 10 min, temperatura ambiente) e posteriores análises da glicose; lactato; Na⁺, Cl⁻, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺. Glicose, lactato, Cl⁻, Ca²⁺ e Mg²⁺ foram determinados através de kits colorimétricos comerciais (Labtest®, Brasil) em amostras de plasma diluídas (10x). O Na⁺ e o K⁺ foram determinados em amostras de plasma diluídas (1:100) utilizando fotômetro de chama (Quimis Q498M, Brasil). A osmolalidade plasmática foi determinada nas amostras sem diluição utilizando um microosmômetro de pressão de vapor (Wescor 5600, VAPRO®).

2.4.2 Atividades das enzimas (Na⁺, K⁺ ATPase, H⁺ ATPase, anidrase carbônica e Ca²⁺ ATPase) nas brânquias

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich. Na⁺, K⁺ ATPase (NKA) e a H⁺, ATPase foram medidas de acordo com Kültz & Somero (1995). Resumidamente, o ensaio é baseado na inibição da atividade de NKA pela ouabaína (2 mmol L⁻¹), e da atividade H⁺ ATPase tipo v pela N-etilmaleimida (NEM, 2 mmol L⁻¹) em uma mistura reacional (recém-preparado) contendo 30 mmol L⁻¹ de imidazol, 45 mmol L⁻¹ de NaCl, 15 mmol L⁻¹ de KCl, 3 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 0,4 mmol L⁻¹ de KCN, 1 mmol L⁻¹ de Na₂ATP, 0,2 mmol L⁻¹ NADH, 0,1 mmol L⁻¹ de frutose 1,6-bifosfato, 2 mmol L⁻¹ de fosfoenolpiruvato (PEP), 3 UI ml⁻¹ de piruvato quinase (PK), 2 UI ml⁻¹ de lactato desidrogenase (LDH). Uma mistura de reação sem qualquer inibidor foi utilizada para medir a atividade total da ATPase. Os filamentos branquiais congelados foram pesados e homogeneizados com um homogeneizador elétrico (Dremel® MultiPro 395JU, Racine, EUA) em 10 volumes de tampão gelado contendo 150 mmol L⁻¹ de sacarose, 50 mmol L⁻¹ de imidazol, 10 mmol L⁻¹ de EDTA, 2,5 mmol L⁻¹ de ácido desoxicólico, pH 7,5, e depois centrifugado por 5 minutos (2.000 g) a 4°C. O ensaio foi realizado a 25°C combinando 200 µL da mistura reacional (com ouabaína, com NEM ou sem inibidores) e 5 µL do homogeneizado. A alteração na absorvância a 340 nm foi lida durante 10 min. As atividades de NKA e H⁺ ATPase tipo v foram calculadas como a diferença entre a atividade total e a atividade com inibidores de ouabaína e NEM. A atividade é expressa como µmol ATP h⁻¹ mgproteína⁻¹.

A AC foi determinada de acordo com Vitale et al. (1999). Os filamentos branquiais congelados foram pesados e homogeneizados com um homogeneizador elétrico (Dremel® MultiPro 395JU) em 10 volumes de tampão fosfato 10 mM gelado (pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado (10.000 g) por 5 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para ensaio de AC e teor de proteína. A atividade do CA foi quantificada pela taxa de queda do pH após a adição de água gelada saturada com CO₂. Neste procedimento, 50 µL de homogeneizado de tecido foram então adicionados a um béquer pequeno contendo 7,5 mL do tampão de ensaio (225 mmol L⁻¹ de manitol, 75 mmol L⁻¹ de sacarose, 10 mmol L⁻¹ de Tris base e 10 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio monobásico em pH 7,4). A taxa de queda do pH foi medida após a adição ao béquer de 1 mL de água destilada saturada com CO₂ gelada (4 °C). O pH foi acompanhado por 20 s, com leituras a cada 4 s. A inclinação da regressão linear do pH em relação ao tempo corresponde à taxa da reação catalisada (taxa

catalisada, CR). A taxa não catalisada (NCR) foi avaliada como a taxa de queda do pH ao longo do tempo na ausência de homogeneizado de tecido, com a adição de 50 µL do tampão de diluição da amostra. A atividade específica da CA foi calculada como: $CA = [(CR/NCR) - 1] \text{ mg proteína}^{-1} \text{ total}$.

O método descrito por Jorge et al. (2013), baseado em Vajreswari et al. (1983), foi utilizada para determinar a atividade da Ca^{2+} ATPase. A atividade foi medida espectrofotometricamente pela liberação de fosfato inorgânico (Pi) durante o período de incubação (30 min a 30°C) do meio reacional (5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 189 mM NaCl, 20 mM Tris-base, 2 mM ouabaína e 3 mM ATP) e amostras. Para interromper a reação, o meio com as amostras foi resfriado em gelo por 10 minutos. Uma solução colorida (10% de ácido ascórbico e 0,42% de molibdato de amônio em 0,5 mM H_2SO_4 ; Ames, 1966) foi adicionada e incubada por 20 min, seguida pela medição da absorbância a 620 nm. A solução padrão de fósforo 0,65 mM (P3869, Sigma) foi utilizada para a curva padrão de Pi. A atividade enzimática foi expressa como nM Pi mg proteína⁻¹ min⁻¹. Para todas as atividades enzimáticas, a concentração proteica total dos homogenatos foi determinada de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão e lida em 595 nm.

2.5. Análise da compressão das conchas

As conchas dos bivalves (valva direita) de cada tratamento e tempo de exposição foram submetidas a um teste de compressão para quantificar a resistência às forças mecânicas. O teste foi realizado utilizando uma linha Universal EMIC Test Machine DL. A função de compressão foi selecionada com avanço definido de 1 mm min⁻¹ e faixa de medição entre 22 e 1501 N. As conchas foram avaliadas individualmente e a resistência máxima foi obtida pela análise dos resultados gerados no software TESC SCRIPT, que consiste no registro da força e na primeira ruptura significativa dos projéteis (O'Neill et al., 2018).

2.6. Análise estatística

Todos os dados foram relatados como médias ± erro padrão. A significância estatística foi aceita quando $P < 0,05$. Todos os dados foram testados quanto à normalidade de distribuição e similaridade de variância, quando os dados não atendiam a essas premissas foi aplicado um teste não paramétrico. Diferenças

significativas entre os tratamentos foram determinadas aplicando ANOVA two-way após a confirmação de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos. Os métodos a posteriori Holm-Sidak (paramétrico) ou Dunn (não paramétrico) foram aplicados para avaliar diferenças entre os tratamentos, dependendo da normalidade da distribuição dos dados e da similaridade de variância. Todas as análises estatísticas e gráficos utilizaram os softwares Sigma Stat (versão 3.5) e Sigma Plot (versão 11.0) (Jandel Scientific, San Jose, EUA).

Os coeficientes de correlação de Spearman foram realizados entre as respostas biológicas e os metais e metalóides (cujas concentrações foram significativamente diferentes do controle) bioacumulados em toda a matriz biológica (dados somados após transformação para cada elemento para padronizar a escala). Para as análises utilizando os mesmos dados transformados (“intervalo”) foi utilizado o método ilustrativo de Husson & Pagès (2005), bem como o teste estatístico de correlação de Spearman. A distância euclidiana foi usada como métrica de dissimilaridade. Os cálculos foram realizados utilizando os pacotes “FactoMineR” (Lê et al., 2008), “Factoextra” “Stats” (R Core Team, 2021) e “Heatmaply” (Galili et al., 2018). O pacote “Factoextra” pode extrair e visualizar melhor os resultados de análises multivariadas de dados como o *biplot*, que insere as distâncias de similaridade (Distâncias de Similaridade) das variáveis dependentes (bioacumulação de metais e respostas biológicas) e independentes (tratamentos e tempos de exposição) na mesma figura.

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros físicos e químicos da água e análises de metais e metalóides nos tecidos moles.

Os parâmetros físicos e químicos da água durante a exposição ao MPAs não diferiram significativamente entre os tratamentos e tempos de exposição (ANOVA: $F = 0,01-1,70$; $gl=3$ e 6 ; $p=0,23-0,76$) e são apresentados em (Duarte et al., 2023). A análise do MPA (pó antes de ser adicionado aos aquários experimentais) demonstrou que ele é composto principalmente de Fe, Al, Ti, Mn, e Zi; entretanto, alguns elementos de terras raras (REEs) foram quantificados em MPA, como o Ce, Y e La (Tabela 1). Na análise da água (MPAs), os elementos As, Bi, Cd,

Hg, Mo, Nb, Au, Ag, Se e W estavam abaixo do limite de detecção e o Nb estava abaixo do limite de quantificação. Para tecidos moles de *Perna perna*, Fe e Ba apresentaram maiores concentrações para mexilhões expostos à maior concentração de MPAs (1 g L^{-1}) em relação ao controle (Tabela 2). Além disso, uma concentração significativamente elevada de Ba foi encontrada apenas em *P.perna* expostos à concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ em relação ao controle (Tabela 2). A concentração de Ni diferiu significativamente do controle nas concentrações de $0,01$ e $0,1 \text{ g L}^{-1}$; as concentrações de Cu, Rb, Sr e Cd foram significativamente maiores na concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$. A concentração de Zn foi significativamente diferente dos controles em todas as concentrações do MPAs estudadas (Tabela 2).

	$\pm 0,09$	$\pm 0,52$		$\pm 0,12$	$\pm 0,07$		$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,00$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$				
	46,36	90,54	3,45	32,85	3,92	LOD	0,87	LOD	0,323	0,39	0,25	8,40	0,18	LOD	LOD	LOD	LOD
2	$\pm 0,68$	$\pm 0,72$	$\pm 0,04$	$\pm 0,27$	$\pm 0,02$		$\pm 0,00$		$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,09$	$\pm 0,04$	LOD	LOD	LOD	LOD
	97,30	112,24	4,48	32,59	4,08	LOD	0,92	2,04	0,27	0,47	0,26	8,56	0,16	LOD	LOD	LOD	LOD
4	$\pm 1,95$	$\pm 0,44$	$\pm 0,02$	$\pm 0,19$	$\pm 0,01$		$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$	$\pm 0,04$				
	32,37	104,56	4,40	32,46	3,40	1,22	1,42	1,72	0,44	1,16	0,32	1,44	0,11	1,22	LOD	LOD	LOD
7	$\pm 0,61$	$\pm 0,65$	$\pm 0,11$	$\pm 0,27$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,00$	$\pm 0,03$	$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$	$\pm 0,01$			
	34,20	82,09	LOD	36,75	2,72	1,74	0,93	LOD	0,19	0,70	0,24	9,65	0,14	1,74	LOD	LOD	LOD
15	$\pm 0,51$	$\pm 0,25$		$\pm 0,33$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,00$		$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,06$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$			
	26,44	101,30	LOD	43,83	3,82	1,36	1,99	LOD	0,154	1,12	0,45	1,87	0,10	1,36	LOD	LOD	LOD
30	$\pm 0,70$	$\pm 0,69$		$\pm 0,18$	$\pm 0,03$	$\pm 0,06$	$\pm 0,01$		$\pm 0,00$	$\pm 0,01$							

Tabela 2. Metais e metalóides (n = 5, média ± erro padrão) nos tecidos moles do mexilhão *Perna perna* após a exposição a diferentes concentrações (0,0: controle; 0,01; 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs) ao longo de 30 dias (2, 4, 7, 15, 30).

	Fe	Ni	Cu	Zn	Rb	Sr	Cd	Ba	
	µg g ⁻¹								
Control	2	5,10 ± 5,10	3,19 ± 2,50	8,74 ± 5,76	54,58 ± 38,60	2,74 ± 1,37	5,36 ± 5,36	0,41 ± 0,35	0,26 ± 0,15
	4	1,40 ± 1,40	4,80 ± 4,67	4,97 ± 2,95	81,22 ± 76,09	2,15 ± 1,19	29,38 ± 13,79	0,02 ± 0,02	0,09 ± 0,08
	7	36,89 ± 20,85	7,13 ± 4,07	3,46 ± 2,24	166,12 ± 93,65	3,76 ± 0,49	30,55 ± 4,45	0,48 ± 0,24	0,32 ± 0,09
	15	45,53 ± 26,00	4,10 ± 3,40	7,61 ± 3,90	119,63 ± 119,63	2,96 ± 1,49	46,02 ± 0,58	1,20 ± 0,27	0,59 ± 0,05
	30	45,17 ± 22,86	2,25 ± 2,04	7,40 ± 3,70	0,00 ± 0,00	3,40 ± 1,74	24,25 ± 12,19	0,96 ± 0,20	0,34 ± 0,17
0,01	2	46,74 ± 5,59	8,50 ± 3,52	14,69 ± 2,96	634,22 ± 70,38	4,91 ± 0,48	40,20 ± 3,01	0,86 ± 0,14	0,69 ± 0,06
	4	36,88 ± 7,48	11,72 ± 5,67	11,56 ± 1,29	591,05 ± 124,60	4,51 ± 1,04	32,84 ± 5,91	0,93 ± 0,33	0,65 ± 0,13
	7	76,00 ± 55,08	37,86 ± 35,54	9,52 ± 3,11	697,43 ± 433,69	4,03 ± 1,15	33,13 ± 11,25	1,26 ± 0,64	0,44 ± 0,16
	15	94,73 ± 26,15	18,98 ± 3,40	13,81 ± 2,91	512,91 ± 20,61	6,45 ± 1,13	55,90 ± 10,55	1,28 ± 0,43	0,44 ± 0,03
	30	160,83 ± 44,51	52,53 ± 11,41	18,30 ± 3,70	926,57 ± 121,11	7,55 ± 2,61	56,60 ± 14,62	2,44 ± 0,20	0,92 ± 0,17
0,1	2	123,66 ± 42,02	25,85 ± 5,40	16,95 ± 0,92	623,57 ± 82,72	6,10 ± 0,22	34,31 ± 4,49	1,40 ± 0,30	0,54 ± 0,04
	4	168,15 ± 120,27	12,72 ± 7,52	12,41 ± 5,94	499,91 ± 206,90	5,30 ± 2,60	49,58 ± 30,78	1,50 ± 0,93	0,55 ± 0,27
	7	102,38 ± 17,06	15,58 ± 6,05	10,58 ± 2,89	546,78 ± 175,86	6,30 ± 2,45	49,85 ± 16,01	1,10 ± 0,18	0,60 ± 0,17
	15	187,44 ± 60,73	22,37 ± 8,31	14,88 ± 0,29	850,43 ± 144,37	6,96 ± 1,34	85,40 ± 13,38	2,13 ± 0,47	1,06 ± 0,18
	30	242,53 ± 109,09	38,34 ± 25,63	15,49 ± 5,74	981,48 ± 352,38	7,05 ± 2,66	57,79 ± 20,02	2,39 ± 1,21	1,10 ± 0,51
1	2	83,84 ± 54,22	4,15 ± 3,77	7,42 ± 1,5	463,00 ± 56,19	4,03 ± 0,55	22,39 ± 1,67	0,51 ± 0,40	0,66 ± 0,08
	4	464,74 ± 456,89	6,02 ± 4,77	12,67 ± 11,46	383,11 ± 327,74	3,63 ± 3,34	27,85 ± 26,15	0,90 ± 0,81	0,84 ± 0,65
	7	216,83 ± 108,54	8,93 ± 2,95	12,09 ± 2,36	482,71 ± 128,75	4,63 ± 0,60	40,18 ± 2,02	0,82 ± 0,12	1,15 ± 0,50
	15	117,40 ± 43,79	20,57 ± 8,43	9,38 ± 0,67	550,20 ± 98,92	4,20 ± 0,36	34,90 ± 6,12	1,06 ± 0,15	0,77 ± 0,08
	30	410,95 ± 298,47	10,81 ± 3,29	16,68 ± 7,37	672,45 ± 206,75	3,59 ± 1,82	47,73 ± 13,62	1,41 ± 0,43	1,03 ± 0,31

3.2 Glicose, Lactato, íons (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+}) e osmolalidade

Não foram encontradas diferenças nas concentrações de Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- e osmolalidade (Figuras 1A, D, E e F). As concentrações de K^+ plasmático aumentaram nos indivíduos expostos a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de MPAs em relação ao: Controle; $0,01$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ após 2 dias e diminuíram em $0,1 \text{ g L}^{-1}$ referente ao Controle após sete dias de exposição (Figuras 1B), além disso, as concentrações de K^+ no plasma dos indivíduos expostos a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ após dois dias de exposição aumentaram em relação a todos os tempos de exposição (4, 7, 15 e 30 dias) (Figura 1B). Da mesma forma, as concentrações de Ca^{2+} plasmático aumentaram nos indivíduos expostos a $0,1$ em relação ao Controle; $0,01$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ MPAs após 2 dias de exposição (Figura 1C). Além disso, para $0,1 \text{ g L}^{-1}$ foram observadas reduções nas concentrações de Ca^{2+} em após 4, 7 e 30 dias em relação a dois dias de exposição (Figura 1C). Não foram encontradas diferenças nas concentrações de glicose e lactato plasmáticos dos indivíduos expostos as diferentes concentrações de MPAs nos diferentes tempos (Figura 2A e B).

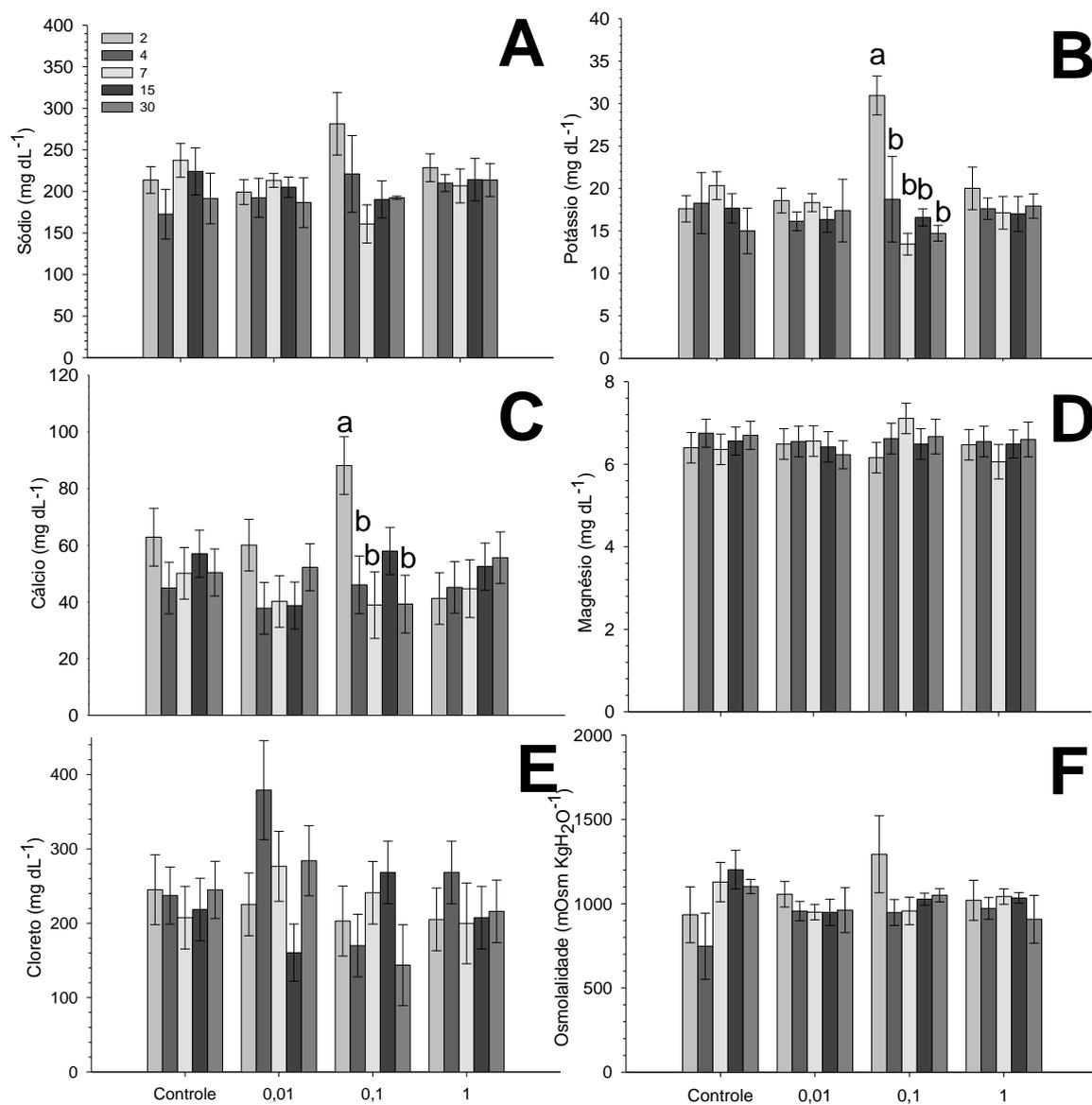


Figura 1. Concentração de íons (média \pm erro padrão) no plasma e osmolalidade na hemolinfa de *Perna perna* do grupo controle (0,0 g L⁻¹ MPAs) e grupos expostos (0,01; 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs) ao longo de 30 dias (2, 4, 7, 15, 30). Concentrações de Na⁺(A), K⁺ (B), Ca²⁺ (C), Mg²⁺(D), Cl⁻(E) e osmolalidade (F).

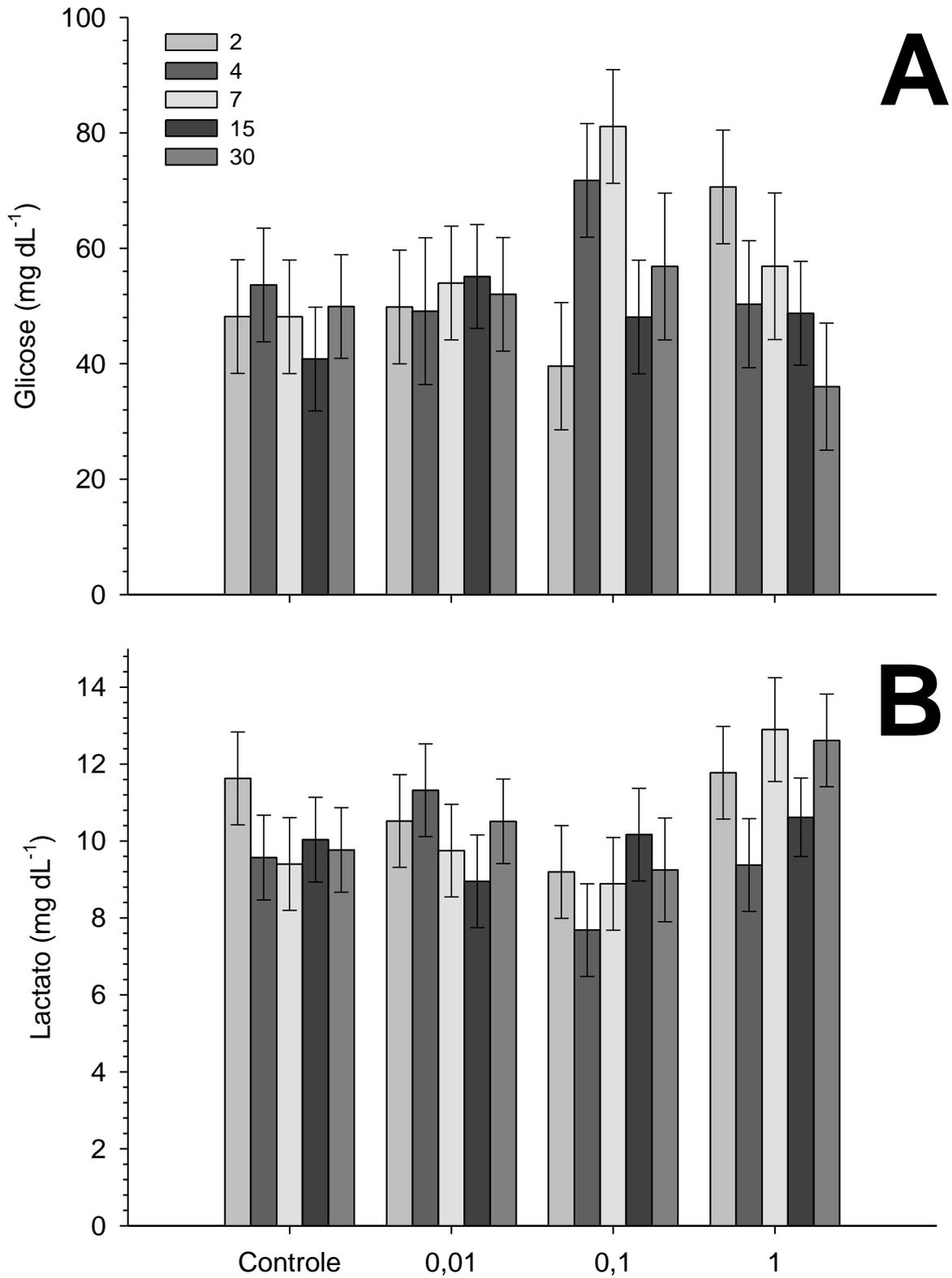


Figura 2. Glicose (A) e lactato (B) (média \pm erro padrão) no plasma de *Perna perna* do grupo controle (0,0 g L⁻¹ MPAs) e grupos expostos (0,01, 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs) ao longo de 30 dias (2, 4, 7, 15, 30).

3.3 Atividades de enzimas (Na⁺, K⁺ ATPase, H⁺ ATPase tipo v, anidrase carbônica e Ca²⁺ ATPase) nas brânquias

A atividade da NKA diminui nos indivíduos expostos a 0,1 em relação a 1 g L⁻¹ MPAs após 4 dias de exposição (Figura 3A) e a atividade da NKA diminui nos indivíduos expostos a 1 g L⁻¹ MPAs após 15 dias em relação à 4 dias de exposição (Figura 3A), A atividade da VHA diminui nos mexilhões expostos a 1 g L⁻¹ MPAs após 30 dias em relação às exposições de 2 e 4 dias (Figura 3B). A atividade da Ca²⁺ ATPase aumentou em 0,1 g L⁻¹ MPAs em relação ao Controle; 0,01, 1g L⁻¹ MPAs após dois dias de exposição (Figura 4A), Assim, após dois dias de exposição a atividade da Ca²⁺ ATPase foi maior em 0,1 g L⁻¹ MPAs em relação a 4, 15 e 30 dias de exposição (Figura 4A). A atividade da AC aumentou em 0,01 g L⁻¹ MPAs em relação a 0,1 g L⁻¹ MPAs e ao controle após 15 dias de exposição (Figura 4B), Ainda, a atividade da AC no Controle foi maior após dois dias em relação aos demais tempos de exposição, e menor após sete dias em relação a dois dias de exposição para 0,01 g L⁻¹ MPAs (Figura 4B).

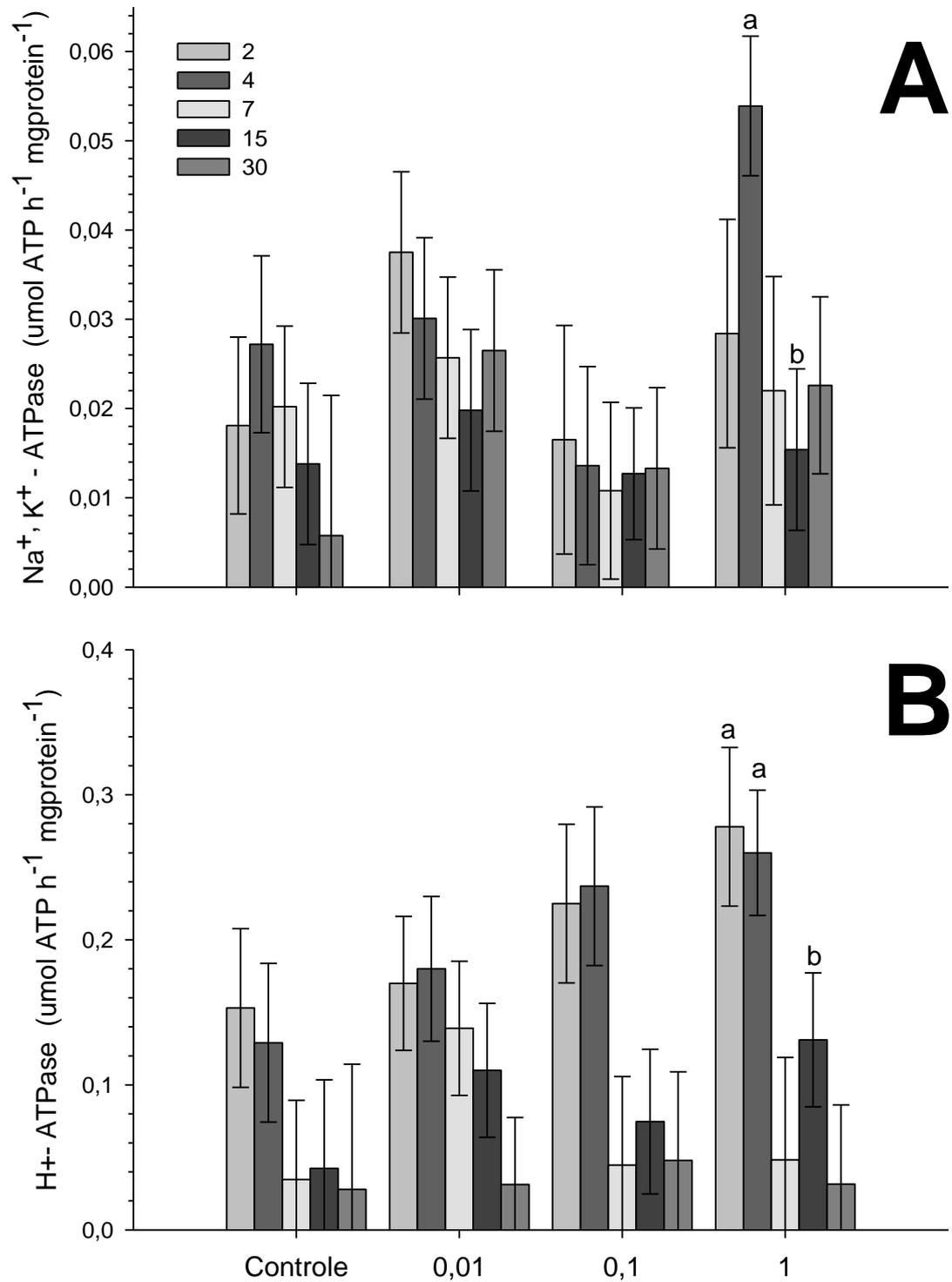


Figura 3. Na⁺, K⁺ ATPase (A) e H⁺ ATPase tipo v (B) (média ± erro padrão) das brânquias de *Perna perna* do grupo controle (0,0 g L⁻¹ MPAs) e grupos expostos (0,01; 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs) ao longo de 30 dias (2, 4, 7, 15, 30).

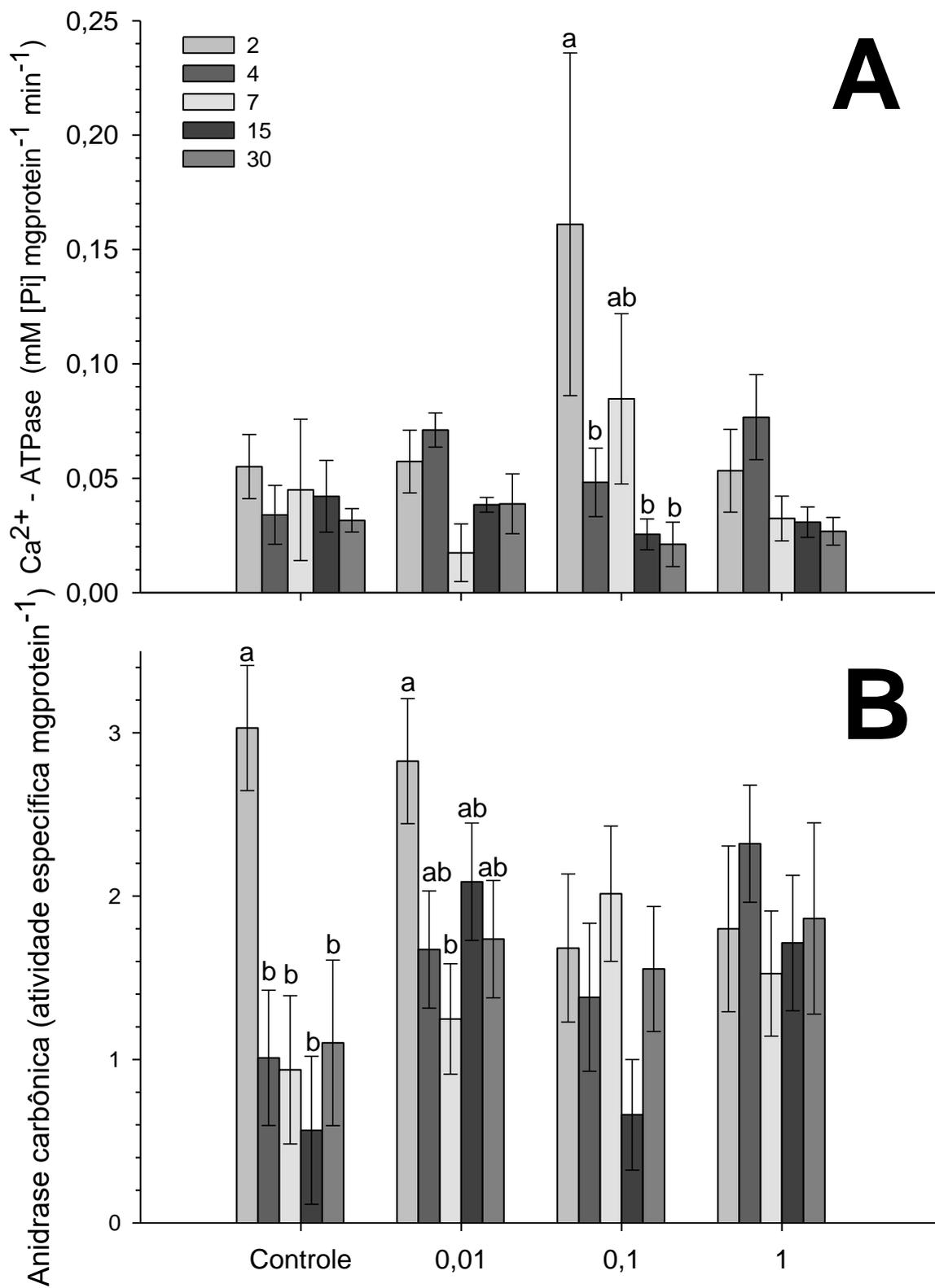


Figura 4. Ca^{2+} ATPase (A) e anidrase carbônica (B) (média \pm erro padrão) das brânquias de *Perna perna* do grupo controle (0,0 g L⁻¹ MPAs) e grupos expostos (0,01; 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs) ao longo de 30 dias (2, 4, 7, 15, 30).

3.4 Análise de compressão

As análises de compressão mecânica mostraram que foi necessário aplicar em média 300 N de força de compressão para produzir a primeira ruptura nas conchas, sem diferenças entre os tratamentos e tempo de exposição (Tabela 3).

Tabela 3. Força de compressão (média \pm erro padrão) necessária para produzir a primeira ruptura nas conchas de *Perna perna* do grupo controle (0,0 g L⁻¹ MPAs) e grupos expostos (0,01; 0,1 e 1,0 g L⁻¹ MPAs) ao longo 30 dias (2, 4, 7, 15, 30).

	2	4	7	15	30
Compressão força em Newton					
Controle	286 \pm 46	338 \pm 9	380 \pm 47	325 \pm 56	300 \pm 87
0,01	375 \pm 82	364 \pm 40	422 \pm 30	314 \pm 13	288 \pm 50
0,1	290 \pm 77	400 \pm 66	358 \pm 41	245 \pm 51	332 \pm 24
1	310 \pm 76	341 \pm 16	288 \pm 16	437 \pm 41	304 \pm 58

3.5 Análise de correlação

Foram encontradas correlações significativas ($p < 0,05$) entre os metais e metalóides e os parâmetros fisiológicos. Em correlações positivas foram encontradas entre osmolaridade plasmática e Cd (coeficiente de Spermán: 0,15), e correlações negativas foram encontradas entre Na^+ e Rb plasmáticos (coeficiente de Spermán: -0,33), e entre K^+ e Sr plasmáticos (coeficiente de Spermán: -0,28) (Figura 5).

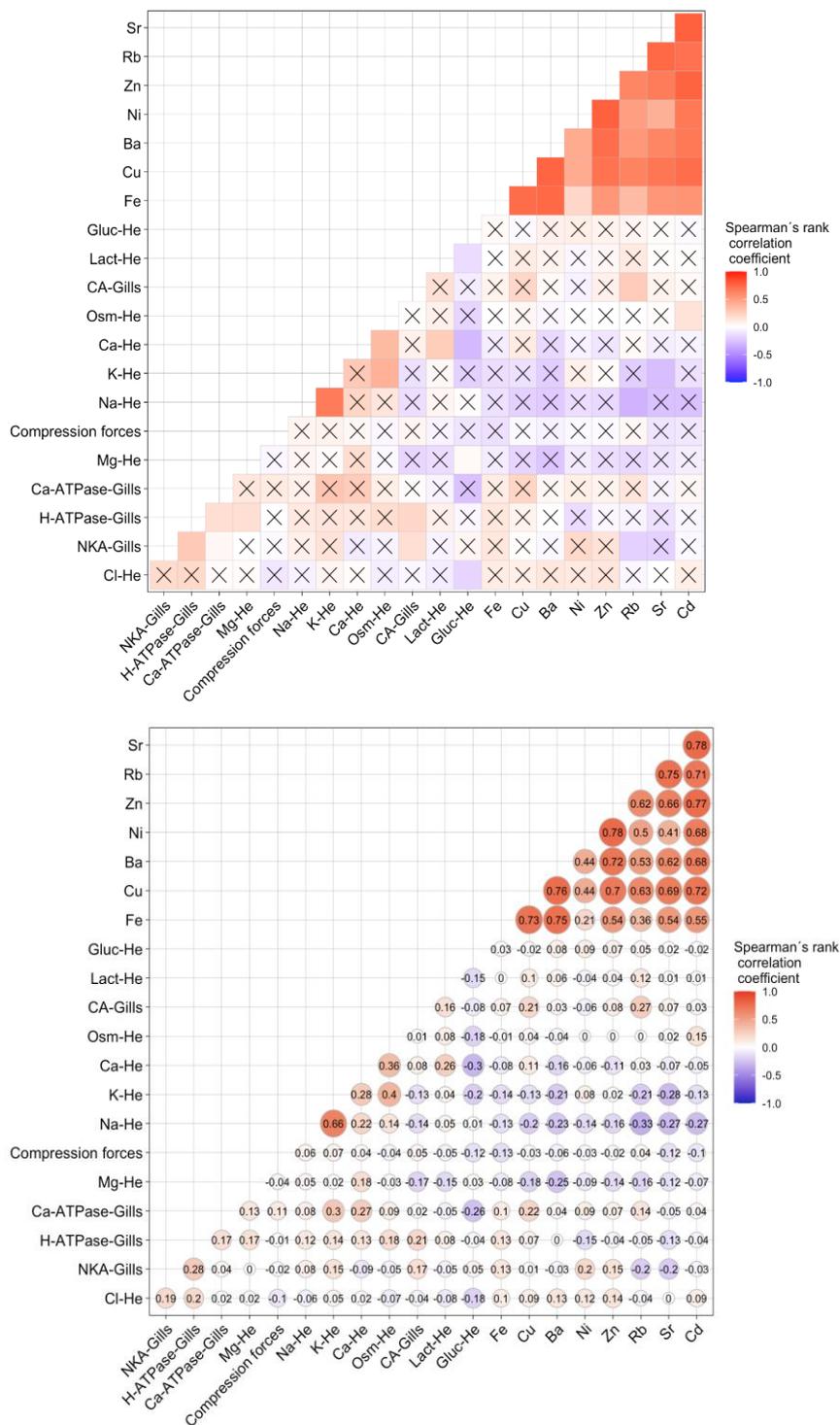


Figura 5. Coeficientes de correlação de postos de Spearman (N = 85) entre respostas biológicas (Glicose “Gluc”; Lactato “Lact”; Anidrase carbônica “CA”; Hemolinfa Osmolalidade “Osm-He”, Potássio “K-He”, Sódio “Na -He”, Magnésio “Mg-He”, Cloreto “Cl-He; enzimas branquiais Ca²⁺ ATPase “Ca-ATPase-Gills”; tipo v H+ ATPase “H-ATPase- Gills”, Na⁺, K⁺ ATPase “NKA- Gills” e projéteis Forças de compressão); e as concentrações de metais e metalóides em tecido mole de *Perna perna* que apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (Fe, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Cd, Ba). Correlações não significativas indicadas por “X” (P>0,05),

4. DISCUSSÃO

Apenas oito (8) dos vinte e oito (28) elementos detectados em amostras de tecidos (Fe, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Cd e Ba) (Duarte et al., 2023) apresentaram concentrações significativas no tecido mole. Ainda não foram observados aumentos dependentes da concentração e do tempo na bioacumulação de metais, o que significa que as concentrações de metais nos tecidos moles de *P. perna* não variaram nas diferentes concentrações e tempos de exposição (embora a bioacumulação tenha sido avaliada considerando todos os tecidos, sem verificar diferenças entre os diferentes tecidos). Nesse ponto, vale mencionar que, na água do mar, a salinidade é a variável que mais influencia a especiação de metais, resultando em diferentes biodisponibilidades para organismos aquáticos. A menor biodisponibilidade de metais na água do mar deve-se principalmente aos altos níveis de cloreto (Cl^-) e ao efeito protetor da competição por altas concentrações de sódio (Na^+), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}), incluindo a presença de outros ânions (por exemplo, OH^- , HCO_3^- , SO_4^{2-}) (Wood, 2011).

Quando incorporados por organismos aquáticos, os mecanismos de toxicidade dos metais estão diretamente relacionados à essencialidade biológica do metal e ao tempo de exposição (aguda e crônica). No presente estudo, quatro (4) dos oito (8) metais significativos são caracterizados como essenciais (Fe, Ni, Cu e Zn), enquanto os outros quatro são não essenciais (Rb, Sr, Cd e Ba). Uma vez que o metal entra na célula, ele se liga a uma variedade de ligantes existentes que mantêm um gradiente de difusão direcionado para dentro. Isso impede seu efluxo, mantendo assim o gradiente eletroquímico para iniciar manifestações tóxicas, como a inativação da atividade enzimática e componentes bioquímicos (Van der Oost et al., 2003). Metais essenciais possuem uma curva de resposta à concentração em forma de sino (ou curva dose-efeito), com deficiência ocorrendo em baixas concentrações e toxicidade em altas concentrações, com um platô intermediário. Para os metais não essenciais, há um platô de tolerância quando sua fisiologia é normal. Dentro desse intervalo, vários mecanismos, incluindo excreção e desintoxicação, influenciam a efetivamente da entrada de metais. No entanto, exceder esse intervalo pode levar à toxicidade (Cobbina et al., 2015).

Embora os níveis de glicose e lactato possam ser indicadores eficazes de estresse (Falfushynska et al., 2019; Gago-Tinoco et al., 2014; Giacomini et al., 2014; Rajalekshmi & Mohandas, 1993; Sivaramakrishna & Radhakrishnaiah), não encontramos diferenças significativas para *P. perna* expostos a diferentes concentrações de MPAs nos diferentes tempos de exposição. No entanto, a diminuição das reservas de glicose, associada ao elevado gasto de energia, já foi relatada em amêijoas *Ruditapes philippinarum* (De Marchi et al., 2017), em peixes *Catostomus commersonii* (Bessemmer et al., 2015), em mexilhões *Unio tumidus* (Falfushynska et al., 2018) expostos a nanopartículas e na amêijoia marinha *Mesodesma mactroides* exposta ao cobre (Giacomini et al., 2014). Nossos resultados demonstram que *P. perna* não foi bioenergeticamente afetado pelo MPAs nas concentrações e tempos de exposição estudados. No entanto, foi encontrada uma correlação negativa entre glicose e lactato, o que indica que a demanda energética dos mexilhões poderia ser compensada pela oxidação anaeróbica de combustíveis energéticos, como o lactato, durante a exposição ao MPAs.

Pagenkopf (1983) formulou o Modelo de Interação da Superfície Branquial (GSIM), que propôs que a toxicidade resulta da ligação de cátions metálicos livres a um número fixo de sítios de “interação” aniônica na superfície das brânquias. O GSIM também revelou que outros cátions livres (por exemplo, Ca^{2+} , Mg^{2+} e H^+) poderiam oferecer proteção competindo com os cátions metálicos livres por esses sítios de interação. Além disso, a captação de partículas metálicas dissolvidas pelas brânquias pode ocorrer via transportadores específicos de metais (para metais essenciais), via “mimetismo iônico” e via simples difusão através do epitélio (Wood, 2011). Nesse sentido, alguns metais podem competir com elementos essenciais, como Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} , reduzindo sua captação por simples competição. Sabe-se que o Cu simula o Na^+ ; Zn, Cd e Sr simula o Ca^{2+} ; Ni simula o Mg^{2+} . No entanto, as concentrações de Na^+ e Mg^{2+} na hemolinfa dos mexilhões não foram afetadas pelo MPAs em nenhum tempo de exposição estudado. Os metais como o Cu podem inibir a NKA basolateral. A atividade da NKA diminuiu em mexilhões expostos a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ em comparação com 1 g L^{-1} MPAs após 4 dias de exposição. Além disso, a exposição a 1 g L^{-1} MPAs após 15

dias diminuiu a atividade da NKA em comparação com a exposição à mesma concentração de MPAs após 4 dias.

Em organismos marinhos, a NKA excreta ativamente Na^+ e Cl^- , e sua inibição em *P. perna* não foi suficiente para promover distúrbios nas concentrações plasmáticas de ambos Na^+ e Cl^- . No entanto, diminuições no K^+ foram observadas em *P. perna* expostos a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ MPAs durante 30 dias. A NKA transporta Na^+ intracelular para fora e K^+ extracelular para dentro através da membrana plasmática. Provavelmente, a inibição da NKA em mexilhões expostos ao MPAs foi responsável pela queda de K^+ observada em mexilhões nessas condições.

Além da diminuição do K^+ , a osmolaridade da hemolinfa permaneceu inalterada. Sabe-se que osmólitos inorgânicos e orgânicos são responsáveis pela manutenção da pressão osmótica no fluido extracelular. Assim, a exposição ao MPAs não interferiu nessa manutenção em *P. perna* expostos, desconsiderando as concentrações de MPAs e o tempo de exposição. Por outro lado, o K^+ apresentou correlações negativas com Sr, enquanto a NKA se correlacionou com Rb, mostrando que esses metais podem desempenhar um papel importante na inibição dos processos osmorregulatórios em *P. perna* expostos ao MPAs.

A VHA pode garantir a homeostase do pH intracelular, protegendo as células contra o estresse oxidativo endógeno induzido por metais pesados divalentes, inibindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Techo et al., 2020). O mexilhão de profundidade *Gigantidas platifrons* e o camarão *Litopenaeus vannamei* expostos a Cd (Zhou et al., 2023) e Cu (Guo et al., 2021), mostraram níveis mais elevados de VHA. A inibição da VHA em *P. perna* expostos a 1 g L^{-1} MPAs após 2, 4 e 30 dias poderia levar a prejuízos na inibição da produção de ROS. De fato, os mexilhões expostos ao MPAs por 30 dias exibiram instabilidade da membrana lisossomal e danos ao DNA (Duarte et al., 2023).

A AC é uma metaloenzima dependente de zinco que desempenha papéis-chave em uma ampla variedade de processos fisiológicos envolvendo CO_2 e HCO_3^- , e está relacionada a vários processos metabólicos, incluindo respiração e transporte de CO_2 e HCO_3^- através de diferentes tecidos, além do controle da homeostase de CO_2 , pH, excreção de eletrólitos e calcificação (Lionetto et al.,

2012). Nossos resultados mostram que a AC foi inibida em *P. perna* expostos por 7 dias a 0,01 g L⁻¹ MPAs, enquanto aumentou após 15 dias para 0,01 g L⁻¹ e 1 g L⁻¹ MPAs.

Uma inibição significativa in vitro da AC citosólica por Ag⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺ foi observada em invertebrados aquáticos (Skaggs & Henry, 2002) e nas brânquias dos caranguejos *Callinectes sapidus* e *Carcinus maenas*. Considerando o papel importante da AC no processo de calcificação, o efeito inibitório de metais (por exemplo, Cd) na atividade da AC pode diminuir significativamente o crescimento da concha (Soto et al., 2000) e a resistência (Gouveia et al., 2022). De maneira similar, a atividade da Ca²⁺ ATPase pode participar dos processos de calcificação (Harayashiki et al., 2022). Estudos anteriores mostraram que a atividade da Ca²⁺ ATPase é afetada quando moluscos são expostos agudamente a metais, como Cd, Cu, Hg, Ni e Zn (Jorge et al., 2013b; Santini et al., 2011). No presente trabalho, a atividade da Ca²⁺ ATPase foi inibida em mexilhões expostos a 0,1 g L⁻¹ MPAs após 4, 7 e 30 dias. Essa inibição provavelmente causou uma menor concentração de Ca²⁺ na hemolinfa de *P. perna* nos mesmos tratamentos. Apesar da conhecida participação da AC e da Ca²⁺ ATPase na calcificação e resistência das conchas, não observamos mudanças na resistência das conchas. Por outro lado, Roberto et al, (2010) relataram uma inibição significativa da AC no manto e um aumento da atividade da AC na glândula digestiva de *M. galloprovincialis* expostos in vivo ao Cd, Isso demonstrou que a sensibilidade da AC e da Ca²⁺ ATPase a metais parece ser específica ao tecido.

5. CONCLUSÃO

A exposição as diferentes concentrações de MPAs foi capaz de causar bioacumulação de metais e metalóides nos tecidos moles e distúrbios ionoregulatórios em *P. perna* ao longo de 30 dias de exposição, Esses distúrbios não foram associados ao progressivo aumento das concentrações do MPAs e do tempo. Entretanto, foram correlacionados à bioacumulação de Cd, Rb e Sr. A inibição das ATPases levou a reduções nas concentrações de K⁺ e Ca²⁺, que não foram suficientes para causar desequilíbrio osmótico e interferiram na resistência da concha.

6. REFERÊNCIAS

- Al-Kindi, A, Y, A., Brown, J, A., Waring, C, P., & Collins, J, E, (1996), Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water-soluble fraction of crude oil. **Journal of Fish Biology**, 49, 1291–1305.
- AL-Kindi, A, Y, A., Brown, J, A., & Waring, C, P, (2000), Endocrine, physiological and histopathological responses of fish and their larvae to stress with emphasis on exposure to crude oil and various petroleum hydrocarbons. **Sultan Qaboos University Journal for Science [SQUJS]**, 5, 1.
- Arrivabene, H, P., Souza, I, da C., Có, W, L, O., Conti, M, M., Wunderlin, D, A., & Milanez, C, R, D, (2015), Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy, histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in Brazil. **Chemosphere**, 127, 27–34.
- Bessemer, R, A., Butler, K, M, A., Tunnah, L., Callaghan, N, I., Rundle, A., Currie, S., ... MacCormack, T, J, (2015), Cardiorespiratory toxicity of environmentally relevant zinc oxide nanoparticles in the freshwater fish *Catostomus commersonii*. **Nanotoxicology**, 9, 861–870.
- Bradford, M, M, (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 254, 248–254.
- Brauner, C, J., Ballantyne, C, L., Vijayan, M, M., & A.I, V., V, (1999), Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, 123, 127–134.
- Cobbina, S, J., Chen, Y., Zhou, Z., Wu, X., Feng, W., Wang, W., ... Yang, L, (2015), Low concentration toxic metal mixture interactions: Effects on essential and non-essential metals in brain, liver, and kidneys of mice on sub-chronic exposure. **Chemosphere**, 132, 79–86.
- De Marchi, L., Neto, V., Pretti, C., Figueira, E., Chiellini, F., Morelli, A., ... Freitas, R, (2017), The impacts of seawater acidification on *Ruditapes philippinarum* sensitivity to carbon nanoparticles. **Environmental Science: Nano**, 4, 1692–1704.
- Duarte, L, F, de A., Ortega, A, dos S, B., Paço, M, de S., Sadauskas-Henrique, H., Cesar-Ribeiro, C., Souza, I, C., ... Pereira, C, D, S, (2023), Settleable atmospheric particulate matter harms a marine invertebrate: Integrating chemical and biological damage in a bivalve model. **Science of the Total Environment**, 881.
- Duarte, R, M., Honda, R, T., & Val, A, L, (2010), Acute effects of chemically dispersed crude oil on gill ion regulation, plasma ion levels and haematological parameters in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquatic Toxicology**, 97, 134–141.
- Falfushynska, H, I., Gnatyshyna, L, L., Ivanina, A, V., Khoma, V, V., Stoliar, O, B., & Sokolova, I, M, (2019), Bioenergetic responses of freshwater mussels *Unio tumidus* to the combined effects of nano-ZnO and temperature regime. **Science of the Total Environment**, 650, 1440–1450.

Falfushynska, H, I., Gnatyshyna, L, L., Ivanina, A, V., Sokolova, I, M., & Stoliar, O, B, (2018), Detoxification and cellular stress responses of unionid mussels *Unio tumidus* from two cooling ponds to combined nano-ZnO and temperature stress. **Chemosphere**, 193, 1127–1142.

Gago-Tinoco, A., González-Domínguez, R., García-Barrera, T., Blasco-Moreno, J., Bebianno, M, J., & Gómez-Ariza, J, L, (2014), Metabolic signatures associated with environmental pollution by metals in Doñana National Park using *P. clarkii* as bioindicator. **Environmental Science and Pollution Research**, 21, 13315–13323.

Galili, T., O'Callaghan, A., Sidi, J., & Sievert, C, (2018), heatmaply: an R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. **Bioinformatics**, 34, 1600–1602.

Galvão, E, S., Santos, J, M., Reis Junior, N, C., Feroni, R, de C., & Orlando, M, T, D, (2022), The mineralogical composition of coarse and fine particulate material, their fate, and sources in an industrialized region of southeastern Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, 194.

Giacomin, M., Jorge, M, B., & Bianchini, A, (2014), Effects of copper exposure on the energy metabolism in juveniles of the marine clam *Mesodesma mactroides*. **Aquatic Toxicology**, 152, 30–37.

Gouveia, N., Oliveira, A, J, L, A., Yokota Harayashiki, C, A., Souza, J, C., Longo, E., Cano, N, F., ... Castro, Í, B, (2022), Chemical contamination in coastal areas alters shape, resistance and composition of carnivorous gastropod shells. **Chemosphere**, 307.

Guo, H., Chen, T., Liang, Z., Fan, L., Shen, Y., & Zhou, D, (2021), iTRAQ and PRM-based comparative proteomic profiling in gills of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under copper stress. **Chemosphere**, 263, 128270.

Harayashiki, C, A, Y., Sadauskas-Henrique, H., de Souza-Bastos, L, R., Gouveia, N., Luna, A, J., Ostrensky, A., & Castro, I, B, (2022), Contamination gradient affects differently carbonic anhydrase activity of mollusks depending on their feeding habits. **Ecotoxicology**, 31, 124–133.

Husson, F., & Pagès, J, (2005), Scatter Plot and Additional Variables. **Journal of Applied Statistics**, 32, 341–350.

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

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

Kültz, D., & Somero, G, (1995), Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. **The Journal of experimental biology**, 198, 1883–1894.

Lê, S., Josse, J., & Husson, F, (2008), FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, 25.

Lionetto, M, G., Caricato, R., Giordano, M, E., Erroi, E., & Schettino, T, (2012), Carbonic anhydrase as pollution biomarker: An ancient enzyme with a new use. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, MDPI 2012, pp, 3965–3977, doi:10,3390/ijerph9113965.

Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M, P., Angulo, E., & Giamberini, L, (2002), Cellular and subcellular distribution of metals in mollusks. **Microscopy Research and Technique**, 56, 358–392.

O'Neill, M., Cafiso, D., Mala, R., La Rosa, G., & Taylor, D, (2018), Fracture toughness and damage development in limpet shells. **Theoretical and Applied Fracture Mechanics**, 96, 168–173.

Pagenkopf, G, K, (1983), Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. **Environmental Science & Technology**, 17, 342–347.

Rajalekshmi, P., & Mohandas, A, (1993), Effect of heavy metals on tissue glycogen levels in the freshwater mussel, *Lamellidens corrianus* (Lea), Roberto, C., Giulia, L, M., Francesco, D., Aldo, V., & Trifone, S, (2010), Carbonic anhydrase activity in *Mytilus galloprovincialis* digestive gland: Sensitivity to heavy metal exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 152, 241–247.

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

Sivaramakrishna, B., & Radhakrishnaiah, K, Mercury induced alterations in the energetics of hepatopancreas of two freshwater molluscs, *Pila globosa* and *Lamellidens marginalis*.

Skaggs, H, S., & Henry, R, P, (2002), Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 133, 605–612.

Soto, M., Ireland, M, P., & Marigómez, I, (2000), Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in 'Mussel-Watch' programmes. **Science of The Total Environment**, 247, 175–187.

Souza, I, da C., Duarte, I, D., Pimentel, N, Q., Rocha, L, D., Morozesk, M., Bonomo, M, M., ... Fernandes, M, N, (2013), Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**, 180, 136–144.

Souza, I, da C., Arrivabene, H, P., Craig, C, A., Midwood, A, J., Thornton, B., Matsumoto, S, T., ... Fernandes, M, N, (2018), Interrogating pollution sources in a mangrove food web using multiple stable isotopes. **Science of The Total Environment**, 640–641, 501–511.

Souza, I, da C., Arrivabene, H, P., Azevedo, V, C., Duarte, I, D., Rocha, L, D., Matsumoto, S, T., ... Fernandes, M, N, (2021), Different trophodynamics between two proximate estuaries with differing degrees of pollution. **Science of The Total Environment**, 770, 144651.

Souza, I, da C., Morozesk, M., Siqueira, P., Zini, E., Galter, I, N., Moraes, D, A, de, ... Fernandes, M, N, (2022), Metallic nanoparticle contamination from environmental atmospheric particulate matter in the last slab of the trophic chain: Nanocrystallography, subcellular localization and toxicity effects. **Science of The Total Environment**, 814, 152685.

Souza-Bastos, L, R., & Freire, C, A, (2011), Osmoregulation of the resident estuarine fish *Atherinella brasiliensis* was still affected by an oil spill (Vicuña tanker, Paranaguá Bay, Brazil), 7 months after the accident. **Science of The Total Environment**, 409, 1229–1234.

Techo, T., Jindarungrueng, S., Tatip, S., Limcharoensuk, T., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., & Auesukaree, C, (2020), Vacuolar H⁺ -ATPase is involved in preventing heavy metal-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Environmental microbiology**, 22, 2403–2418.

Türtscher, S., Berger, P., Lindebner, L., & Berger, T, W, (2017), Declining atmospheric deposition of heavy metals over the last three decades is reflected in soil and foliage of 97 beech (*Fagus sylvatica*) stands in the Vienna Woods. **Environmental Pollution**, 230, 561–573.

Vajreswari, A., Rao, P, S., Kaplay, S, S., & Tulpule, P, G, (1983), Erythrocyte membrane in rats fed high erucic acid-containing mustard oil: Osmotic fragility, lipid composition, and (Na⁺, K⁺)- and (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPases. **Biochemical Medicine**, 29, 74–84.

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N, P, E, (2003), Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13, 57–149.

Vitale, a, M., Monserrat, J, M., Castilho, P., & Rodriguez, E, M, (1999), Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (decapoda, grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, 122, 121–129.

Wood, C, M, (2011), AN INTRODUCTION TO METALS IN FISH PHYSIOLOGY AND TOXICOLOGY: BASIC PRINCIPLES. **Fish Physiology**, 31, 1–65.

Wood, C, M, (2012), An introduction to metals in fish physiology and toxicology: Basic principles, Elsevier Inc, Vol, 31A, Yamamoto, F, Y., Pereira, M, V, M., Lottermann, E., Santos, G, S., Stremel, T, R, O., Doria, H, B., ... Ribeiro, C, A, O, (2016), Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçu River (Southern Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, 23, 18111–18128.

Zhou, L., Li, M., Zhong, Z., Chen, H., Wang, M., Lian, C., ... Li, C, (2023), Toxicological effects of cadmium on deep-sea mussel *Gigantidas platifrons* revealed

by a combined proteomic and metabolomic approach. **Frontiers in Marine Science**, 10.