

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

**MOLUSCOS TERRESTRES *LITTORARIA ANGULIFERA* E
MELAMPUS COFFEA COMO BIOMONITORES DA
QUALIDADE AMBIENTAL DE MANGUEZAIS
PERNAMBUCANOS**

JULYANNE TORRES BEZERRA DE MÉLO

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir De França

Recife, PE
Agosto, 2014

JULYANNE TORRES BEZERRA DE MÉLO

**MOLUSCOS TERRESTRES *LITTORARIA ANGULIFERA* E
MELAMPUS COFFEA COMO BIOMONITORES DA
QUALIDADE AMBIENTAL DE MANGUEZAIS
PERNAMBUCANOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração Instrumentação Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir De França

Recife, PE
Agosto, 2014

Catálogo na fonte

Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

M528m Mélo, Julyanne Torres Bezerra de.

Moluscos terrestres *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* como biomonitores da qualidade ambiental de manguezais pernambucanos. / Julyanne Torres Bezerra de Mélo. - Recife: O Autor, 2014.

79 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2014.

Inclui referências bibliográficas.

***MOLUSCOS TERRESTRES LITTORARIA ANGULIFERA E
MELAMPUS COFFEA COMO BIOMONITORES DA QUALIDADE
AMBIENTAL DE MANGUEZAIS PERNAMBUCANOS***

Julyanne Torres Bezerra de Mélo

APROVADA EM: 01.08.2014

ORIENTADOR: Prof. Dr. Elvis Joacir de França

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Edvane Borges da Silva – CAV/UFPE

Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo – DBR/UFPE

Profa. Dra. Ana Maria Graciano Figueiredo – IPEN/USP

Visto e permitida a impressão

Coordenador(a) do PROTEN/DEN/UFPE

DEDICATÓRIA

A meus pais, Juarez e Livanete, e meu irmão,
Miguel Neto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em minha vida, guiando meus passos e permitindo que meus sonhos sejam concretizados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elvis Joacir De França, pela paciência, cumplicidade, amizade, acreditar em meu potencial e por desempenhar o papel de orientador com bastante competência.

Ao Serviço de Análises Ambientais do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE), por receberem-me no desenvolvimento e realização deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares (PROTEN) e ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (DEN-UFPE).

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares (PROTEN) pelo aprendizado propiciado.

Às professoras componentes da banca avaliadora, pela disponibilidade e contribuição para enriquecimento de meu trabalho.

Ao Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR), pela receptividade no início desta jornada.

Às Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo e Dra. Rebeca da Silva Cantinha pela importante contribuição na definição e implementação deste trabalho.

Aos técnicos do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste pelo auxílio e contribuição no desenvolvimento das atividades laboratoriais.

Aos servidores do Departamento de Energia Nuclear e do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste pela disponibilidade sempre que solicitados.

Aos meus colegas e companheiros do mestrado pela amizade, companheirismo e horas de estudo compartilhadas.

Às secretárias Kalidja, Nilvânia e Magali pelo apoio e cordialidade sempre que solicitadas.

A todos os meus amigos e familiares, em especial, minha avó Gasparina, pelo apoio e pela compreensão nos momentos de renúncia.

À minha mãe, Livanete, pelo apoio incondicional ao longo deste processo de dissertação e de muitos outros. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Você é minha fortaleza.

Ao meu pai, por tudo que me ensinou. Obrigada pela sua generosidade e simplicidade. Pelo amor incondicional, pelo carinho e afeto.

Obrigada, Miguel, pelo amor e cumplicidade. Obrigada por estar ao meu lado, sempre. Você é o melhor irmão que Deus poderia me presentear!

À Filó (*In memoriam*), Gisele, Pepê e Penélope pela alegria e companheirismo no silêncio das horas de estudo.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!!!

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

RESUMO

Dentre os ecossistemas brasileiros, o manguezal é tido como um dos indicadores ambientais mais representativos de integridade da Zona Costeira, dada à sua vegetação característica e à variedade de nichos ecológicos ocupados por diversas espécies de animais. As espécies de moluscos terrestres *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* são bastante abundantes nesses ecossistemas, contudo pouco se conhece sobre a acumulação de elementos químicos em seus tecidos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a bioacumulação de elementos químicos essenciais (Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn) e traço associado (Sr) em ambas as espécies a fim de verificar a viabilidade do uso de moluscos terrestres como biomonitores de qualidade ambiental de quatro manguezais da Costa Pernambucana. Amostras de tecidos moles de ambas as espécies foram analisadas pelas técnicas Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia – EDXRF e Espectrometria de Absorção Atômica por Chama - FAAS. De acordo com os valores do número E_n obtidos a partir da análise dos materiais de referência SRM 2976 *Mussel tissue* e SRM1547 *Peach leaves*, ambas as técnicas foram adequadas para a quantificação de Cl, Fe, Mg, P, Sr e Zn. Entretanto, a FAAS mostrou-se mais interessante do que a EDXRF devido às menores incertezas analíticas para os resultados dos materiais de referência certificados para a determinação de Cu, K e Mn. As espécies *L. angulifera* e *M. coffea* absorveram quantidades comparáveis dessas substâncias químicas nos tecidos, mas a espécie *L. angulifera* mostrou maior acumulação de elementos químicos tóxicos em potencial. Mesmo com a variabilidade de elementos químicos de *L. angulifera*, os resultados obtidos para o Manguezal do Rio Formoso foram considerados naturais (*background*). No manguezal sob forte influência antrópica (Parque Memorial Arcoverde), Cu e Zn foram acumulados nos tecidos das espécies em quantidades exorbitantemente maiores daquelas consideradas letais para outras espécies de moluscos. Considerando a necessidade de organismos nativos para a avaliação de qualidade ambiental, ambas as espécies foram caracterizadas como potenciais monitores de elementos químicos de manguezais.

Palavras-chave: biomonitoração; manguezais; moluscos; EDXRF; FAAS

ABSTRACT

Among the Brazilian ecosystems, mangrove is considered one of the most representative indicators of the coastal zone environmental integrity due to the characteristic vegetation and the variety of ecological niches occupied by diverse animal species. The terrestrial mollusks species *Littoraria angulifera* and *Melampus coffea* are quite abundant in these ecosystems, although there is a lack of studies about the accumulation of chemical elements in their tissues. This study aimed at the assessment of the bioaccumulation of essential chemical elements (Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P and Zn) and associated trace (Sr) in both species in order to verify the applicability of terrestrial mollusks as biomonitors of environmental quality of four mangroves of Pernambuco State Coast. The samples were analyzed by the techniques Energy Dispersive X-Ray Fluorescence (EDXRF) and Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). According to the values of E_n number obtained by the analysis of the reference materials SRM 2976 Mussel Tissue and SRM1547 Peach leaves, both techniques were adequate for quantifying Cl, Fe, Mg, P, Sr and Zn. However, the FAAS was considered more interesting than EDXRF for determining Cu, K, Mn and Zn due to the lower analytical uncertainties of the results of the certified reference materials. The *L. angulifera* and *M. coffea* species showed comparable ability of chemical element uptake in tissues, but *L. angulifera* has achieved higher accumulation of potential toxic chemical elements. In spite of chemical element variability of *L. angulifera*, the results obtained for the Rio Formoso Mangrove were considered as background values. In the highly impacted mangrove (Parque Memorial Arcoverde), Cu and Zn were highly accumulated in species tissues accomplishing huge amounts in some way considered lethal for other mollusks species. Considering the needs of biomonitor native organism for environmental quality assessment, both species were characterized as potential monitors of chemical elements in mangroves.

Keywords: biomonitoring; mangroves; mollusks; EDXRF; FAAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aparelho respiratório dos gastrópodes pulmonados	20
Figura 2 – Características morfológicas gerais da concha de gastrópode (A e B). Recolhimento no interior da concha e fechamento pelo opérculo (C, D, E e F).	21
Figura 3 – Indivíduos de <i>Melampus coffea</i> na raiz de <i>Rhizophora mangle</i>	24
Figura 4 – Indivíduo de <i>Littoraria angulifera</i> em raiz de <i>Rhizophora mangle</i>	25
Figura 5 – Sistema Biológico dos Elementos – SBE*.....	29
Figura 6 – Esquema de um espectrômetro EDXRF.	31
Figura 7 – Funcionamento do espectrômetro de absorção atômica.....	33
Figura 8 – Localização das sete unidades amostrais. (1) Rio Formoso: unidades amostrais A, B e C. (2) Parque Memorial Arcoverde: unidade amostral D. (3) Itamaracá: unidade amostral E. (4) Maracaípe: unidades amostrais F e G.	36
Figura 9 – Exemplo de biometria dos moluscos avaliados neste trabalho. A. <i>Littoraria angulifera</i> . B. <i>Melampus coffea</i>	38
Figura 10 – Equipamento de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva – EDXRF ...	41
Figura 11 – Incongruência das frações de massa de Mn em moluscos analisados por EDXRF e FAAS.....	47
Figura 12 – Resultados obtidos das frações de massa de Zn inferiores a 1.000 mg kg ⁻¹ em moluscos analisados por EDXRF e FAAS.....	48
Figura 13 – Resultados obtidos das frações de massa de Zn superiores a 1.000 mg kg ⁻¹ em moluscos analisados por EDXRF e FAAS.....	49
Figura 14 – Comparação da composição química elementar de <i>Melampus coffea</i> e <i>Littoraria angulifera</i> para os indivíduos de Maracaípe	53
Figura 15 – Comparação da composição de elementos químicos de <i>Melampus coffea</i> e <i>Littoraria angulifera</i> em Maracaípe, Itamaracá e Parque Memorial Arcoverde.	54
Figura 16 – Matriz de gráficos de dispersão para os dados padronizados de fração de massa de elementos químicos determinados em <i>Littoraria angulifera</i>	58
Figura 17– Dendrograma baseado nos valores dos fatores de indivíduos de <i>Littoraria angulifera</i> coletados em diversos locais.....	60
Figura 18 – Comparação entre as frações de massa de Zn (mg kg ⁻¹) determinadas em todas as localidades estudadas para moluscos da espécie <i>Littoraria angulifera</i>	62

Figura 19 – Comparação entre as frações de massa de Cu (mg kg^{-1}) determinadas em todas as áreas estudadas para moluscos da espécie <i>Littoraria angulifera</i>	63
Figura 20 – Diferenças entre as frações de massa de Zn (mg kg^{-1}) obtidas para a espécie <i>Melampus coffea</i> nas áreas estudadas.	64
Figura 21 – Diferenças entre as frações de massa de Cu (mg kg^{-1}) obtidas para a espécie <i>Melampus coffea</i> nas áreas estudadas.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diversidade da vegetação característica dos mangues pernambucanos.	18
Tabela 2 – Ciclos de aquecimento para o preparo químico de amostras em forno digestor por micro-ondas.	40
Tabela 3 – Características para determinação de elementos químicos por EDXRF. Analitos ordenados pelo número atômico.	41
Tabela 4 – Condições analíticas para a determinação de Cu, K, Mn e Zn por FAAS.	42
Tabela 5 – Valores obtidos e certificados (mg kg^{-1}) e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para os materiais de referência SRM 2976 Mussel tissue e SRM 1547 Peach leaves analisado por EDXRF.	45
Tabela 6 – Frações de massa dos valores obtidos e certificados (mg kg^{-1}) e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência SRM 2976 Mussel tissue analisado por FAAS.	46
Tabela 7 – Estatística descritiva para as médias das frações de massa dos elementos químicos (mg kg^{-1}), desvio padrão (DP), valores mínimos e máximos obtidos nas unidades amostrais do município de Rio Formoso (unidades amostrais 1A, 1B e 1C).	50
Tabela 8 – Análise de variância para os resultados de Rio Formoso.	51
Tabela 9 – Comparação entre as frações de massa de elementos químicos (mg kg^{-1}) para <i>L. angulifera</i> e <i>M. coffea</i> de Maracaípe.	52
Tabela 10 – Matriz de correlação de Pearson das frações de massa de elementos químicos determinados em <i>Littoraria angulifera</i> de todos os locais.	55
Tabela 11 - Matriz de correlação de Pearson das frações de massa de elementos químicos determinados em <i>Melampus coffea</i> do Parque Memorial Arcoverde, Forte Orange e Maracaípe (unidades amostrais 2D, 3E e 4G).	56
Tabela 12 – Frações de massa obtidas (mg kg^{-1}) por FAAS e EDXRF em moluscos da espécie <i>Littoraria angulifera</i> para todos os manguezais estudados.	57
Tabela 13 – Análise fatorial por componentes principais (Rotação = Varimax) aplicada às frações de massa de elementos químicos de <i>L. angulifera</i> . Cargas fatoriais destacadas indicam as maiores correlações com as variáveis.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	<i>Atomic Absorption Spectrometry</i> / Espectrometria de Absorção Atômica
EDXRF	<i>Energy Dispersive X-Ray Fluorescence</i> / Fluorescência de raios-X por dispersão de energia
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> / Espectrometria de Absorção Atômica por Chama
IUPAC	<i>International Union for Pure and Applied Chemistry</i>
PCB	<i>Polychlorinated Biphenyls</i> / Bifenis policlorados
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
ESR	Espectroscopia de ressonância de rotação de elétrons
SETAC	<i>Society of Environmental Toxicology and Chemistry</i>
Si(Li)	<i>Silicon-lithium Detector</i> / Detector de silício-lítio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Biodiversidade dos mangues	17
2.2. Filo Mollusca.....	19
2.2.1. Classe Gastropoda	19
2.2.1.1. Subclasse Prosobranchia.....	23
2.2.1.2. <i>Melampus coffea</i>	23
2.2.1.3. <i>Littoraria angulifera</i>	25
2.3. Bioacumulação para a biomonitoração de elementos químicos	26
2.3.1. Biomonitoração de elementos químicos com moluscos	27
2.4. Elementos químicos.....	29
2.5. Técnicas analíticas.....	30
2.5.1. Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF)	30
2.5.2. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Áreas de estudo.....	35
3.1.1. Rio Arinquiná (Área 1; unidades amostrais A, B e C).....	35
3.1.2. Parque Memorial Arcoverde (Área 2; unidade amostral D)	37
3.1.3. Praia do Forte Orange (Área 3; unidade amostral E)	37
3.1.4. Maracaípe (Área 4; unidades amostrais F e G)	37
3.2. Amostragem.....	37
3.3. Preparação das amostras.....	39
3.3.1. Preparo químico das amostras.....	39
3.4. Etapa 1 - EDXRF	40
3.5. Etapa 2 –FAAS	41

3.6. Análise estatística	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Qualidade dos procedimentos analíticos	44
4.1.1. EDXRF.....	44
4.1.2. FAAS.....	45
4.2. Aplicabilidade das técnicas analíticas	46
4.3. Variabilidade dos dados de fração de massa para a espécie <i>Littoraria angulifera</i> em Rio Formoso.....	49
4.4. Comparação entre espécies de moluscos terrestres de manguezais	51
4.5. Correlação entre elementos químicos.....	54
4.6. Biomonitoração de elementos químicos essenciais e traço associado	56
4.7. Bioacumulação de cobre e zinco	61
5. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

Dentre os ecossistemas brasileiros, o manguezal é tido como um dos indicadores ambientais mais representativos de integridade da Zona Costeira, devido à vegetação característica e à variedade de nichos ecológicos, proporcionando um berçário de muitas espécies marinhas e o habitat de tantas outras. Esses ambientes estão sujeitos à ação das marés e à influência das bacias hidrográficas, recebendo o aporte marinho e grande carga de substâncias químicas do continente que permanecem retidos nesse ecossistema. Além disso, desempenham diversas funções econômicas e ambientais, destacando-se a proteção da costa e a retenção de sedimentos pela vegetação. A participação na ciclagem de elementos químicos também merece destaque a partir da decomposição de matéria orgânica por bactérias e fixação destas substâncias (ALVES, 2001).

A degradação ambiental decorrente da poluição por substâncias químicas indesejáveis é considerada um dos problemas mais preocupantes atualmente, pois se torna uma ameaça ainda não totalmente conhecida para a conservação da biodiversidade do planeta. Esse tipo de contaminação ocorre, principalmente, em consequência da disseminação descontrolada de substâncias químicas provenientes de atividades antrópicas (RAINBOW, 1995; AZIZULLAH et al., 2011). Dentre as substâncias, os elementos químicos têm recebido atenção especial por estarem associados a diversas fontes antrópicas como atividades industriais, de mineração e agrícolas e devido aos possíveis efeitos tóxicos causados por sua persistência no ambiente (CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2000; CUIZANO; NAVARRO, 2008; PATRÓN-PRADO, 2010). Torna-se então necessário avaliar a qualidade ambiental dos manguezais, principalmente ao se empregar as espécies nativas desses ecossistemas.

Algumas espécies de moluscos terrestres como *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) (Gastropoda: Littorinidae) e *Melampus coffea* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda, Ellobiidae) são amplamente distribuídos nos manguezais, sendo principalmente encontrados na costa nordestina (MATTHEWS, 1970; MATTHEWS-CASCON; LOTUFO, 2006). Por sua expressiva população, essas espécies têm potencial para a aplicação como biomonitoras. No entanto, não se encontram na literatura trabalhos que tenham empregado tais espécies como biomonitoras de qualidade ambiental.

Tendo em vista a abundância das espécies *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* e a importância dos manguezais para a conservação da biodiversidade, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a bioacumulação de elementos químicos essenciais (Cl, Cu, Fe, K, Mg,

Mn, P e Zn) e traço associado (Sr) por moluscos adultos das espécies *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* a fim de verificar a viabilidade do uso de moluscos terrestres como biomonitores de qualidade ambiental de quatro manguezais da Costa Pernambucana.

Especificamente, neste trabalho avaliaram-se:

- a aplicabilidade das técnicas analíticas Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) e Espectrometria de Absorção Atômica por chama (FAAS) para quantificação de elementos químicos nos tecidos de moluscos;
- o procedimento analítico das duas técnicas para a obtenção de protocolos de avaliação da qualidade ambiental;
- a variabilidade ambiental a partir dos valores de fração de massa obtidos para a espécie *Littoraria angulifera* em Rio Formoso,
- a capacidade de acumulação dos elementos químicos Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Sr e Zn de ambas as espécies.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O manguezal é um ecossistema litorâneo de elevada importância ecológica, apresentando grande diversidade estrutural e funcional. Dominante no litoral brasileiro, ocorre em terrenos baixos, sujeitos à ação das marés e é formado por vasas lodosas ou arenosas que favorecem a colonização pela vegetação natural conhecida como mangue. Juntamente com os estuários, atua como exportador de biomassa para os sistemas adjacentes. Esse tipo de vegetação sofre influências fluviais e marinhas e ocupa tipicamente os estuários. Contudo, constitui faixa descontínua ao longo dos 6.800 km da Costa Brasileira, entre os estados do Amapá e Santa Catarina (BRASIL, 2012; LACERDA et al., 1990; BERNINE; REZENDE, 2004).

O manguezal desempenha diversas funções ambientais e econômicas, destacando-se a proteção da costa e retenção de sedimentos pela vegetação. Suas características de vegetação rica e águas rasas e calmas também são fundamentais para a reprodução de várias espécies, principalmente de crustáceos e peixes, além de servirem como área de alimentação e abrigo de aves tanto nativas quanto migratórias (ALVES, 2001; PRATES et al., 2010). Contudo, o aspecto lamoso dos manguezais, suas respectivas características químicas e o desconhecimento de sua relevância podem dificultar ações conservacionistas desses ecossistemas estuarinos (PAIVA, 2014).

2.1. Biodiversidade dos mangues

A vegetação de manguezais é considerada exuberante, contudo pouco diversa no que tange ao número de espécies ocorrentes (Tabela 1). Algumas destas espécies podem alcançar porte arbóreo (8 a 10 metros), sendo usadas na construção civil; ainda assim, mangues de pequeno porte têm sido empregados como lenha. Rica em tanino, a casca da *Rhizophora mangle* é usada para tingir linhas e redes de pesca, peças artesanais em cerâmica, além de serem empregadas na indústria farmacêutica (GODOY, 1997; LIMA, 2007; BUENO et al., 2010; FERREIRA et al., 2011).

Tabela 1– Diversidade da vegetação característica dos mangues pernambucanos.

Região	Família	Espécie	Nome popular
Pantanosa	Rhizophoraceae	<i>Rhizophora mangle</i> L.*	“mangue-vermelho”
	Combretaceae	<i>Conocarpus erectus</i> L.*	“mangue-de-botão”
		<i>Laguncularia racemosa</i> Gaertn. f.*	“mangue-manso”
	Verbenaceae	<i>Avicennia nitida</i> Jacq.	“mangue-canoé”
		<i>Avicennia schaueriana</i> Stap. & Lechman*	-
Marginal	Polypodiaceae	<i>Acrostichum aureum</i> L.	“samambaia-açu”
	Aizoaceae	<i>Sesuvium portulacastrum</i> L.	-
	Leguminosae	<i>Dalbergia hecastophyllum</i> L. (Taub.).	-
	Sapindaceae	<i>Dodonaea viscosa</i> (Jacq.)	-

* Espécies mais frequentes. Fonte: LIMA (2007).

A diversidade de espécies de macroalgas nos manguezais apresenta-se bastante restrita, com número reduzido de espécies que sempre ocorrem nas regiões entremarés e, geralmente, associam-se ao substrato lamoso ou às raízes escoras e aos pneumatóforos (CORREIA; SOVIEZORSKI, 2005).

Como outrora ressaltado, os manguezais possuem uma variedade de nichos ecológicos que resultam em fauna diversa com representantes dos diversos filos (ALVES, 1999; ALVES, 2001). No Brasil, foram registradas cerca de 200 espécies de peixes que os utilizam como proteção contra predadores, para alimentação ou para reprodução e desova. Quanto ao número de espécies de aves nos manguezais pernambucanos, há variação nos números registrados na literatura. Entretanto, pode-se afirmar a ocorrência de mais de 65 espécies de pássaros residentes e visitantes (PEREQUITO et al., 2008; LACERDA, 2009; PASSOS-FILHO et al., 2010). Estima-se a presença de cerca de 50 espécies de mamíferos nos manguezais, incluindo morcegos, furões, macacos, preguiças e botos. Há também répteis, como tartarugas marinhas, jacarés e algumas espécies de cobras (LACERDA, 2009; ALVES; PONTES, 2009).

Nos manguezais é possível observar um grande número de espécies de invertebrados como insetos, anelídeos, briozoários, crustáceos, nemertíneos, equinodermos, artrópodes e celenterados. Dentre eles, os moluscos merecem destaque devido à importância ambiental (são detritívoros, consumidores de microorganismos, herbívoros e fazem parte da cadeia alimentar de outros animais) e econômica (uso na alimentação e produção de pérolas) e

epidemiológica (hospedeiros intermediários de parasitoses como angiostrongilose e esquistossomose) (RUPERT et al., 2005; THIENGO et al., 2005; NEVES, 2011)

2.2. Filo Mollusca

Mollusca é o segundo maior filo do reino Metazoa, composto por mais de 130.000 espécies distribuídas em sete classes (Aplacophora, Monoplacophora, Polyplacophora, Gastropoda, Cephalopoda, Bivalvia e Scaphopoda). São invertebrados não segmentados de corpo mole, protegidos geralmente por uma concha calcária externa. Possuem pé muscular, cabeça, boca e órgãos dos sentidos, coração, gônadas, rim e uma massa visceral, contendo a maior parte do trato intestinal (RUPERT et al., 2005).

As classes mais significativas em números de espécies no filo Mollusca são a Gastropoda, com 110.000 (80%) e a Bivalvia, com 20.500 (15%) das espécies. As outras cinco classes, em ordem decrescente do número de espécies são Polyplacophora, Cephalopoda, Scaphopoda, Aplacophora e, finalmente, Monoplacophora.

Os moluscos desempenham importantes funções ecológicas em diferentes ecossistemas aquáticos e terrestres no mundo, devido à sua adaptabilidade. Em áreas estuarinas, praias arenosas e formações rochosas, são recurso alimentar para as demais espécies, incluindo o homem. Devido sua importância econômica, bivalves e alguns gastrópodes são bastante procurados por comunidades costeiras para fins comerciais (OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003; RUPERT et al., 2005; NEVES, 2011).

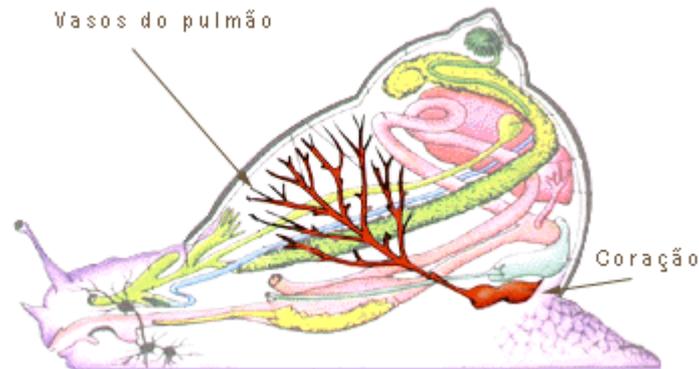
2.2.1. Classe Gastropoda

Os gastrópodes possuem grande adaptabilidade aos mais variados *habitats* e compreendem desde formas de moluscos marinhos primitivos aos caracóis e lesmas terrestres, animais mais evoluídos e de respiração pulmonar. Geralmente são deslizantes, porém com baixa mobilidade, porque, em sua maioria, possuem conchas pesadas e órgãos locomotores lentos (HICKMAN et al., 2004; RUPERT et al., 2005).

A respiração, em quase todos os gastrópodes, é por meio de cnetídios localizados nos prosobrânquios primitivos na cavidade do manto ou do tegumento, enquanto as espécies mais evoluídas necessitam de brânquias. Nos gastrópodes pulmonados, a respiração ocorre por meio de uma cavidade pulmonar, resultante da modificação da cavidade palial (Figura 1). Os indivíduos com esta característica têm uma porção muito vascularizada no manto, com função

semelhante a um pulmão. Nesse caso, necessitam subir à superfície para troca gasosa, caso vivam em ambientes aquáticos (LEME, 1995; HICKMAN et al., 2004; RUPPERT et al., 2005).

Figura 1 – Aparelho respiratório dos gastrópodes pulmonados



Fonte: Malaconet (2003).

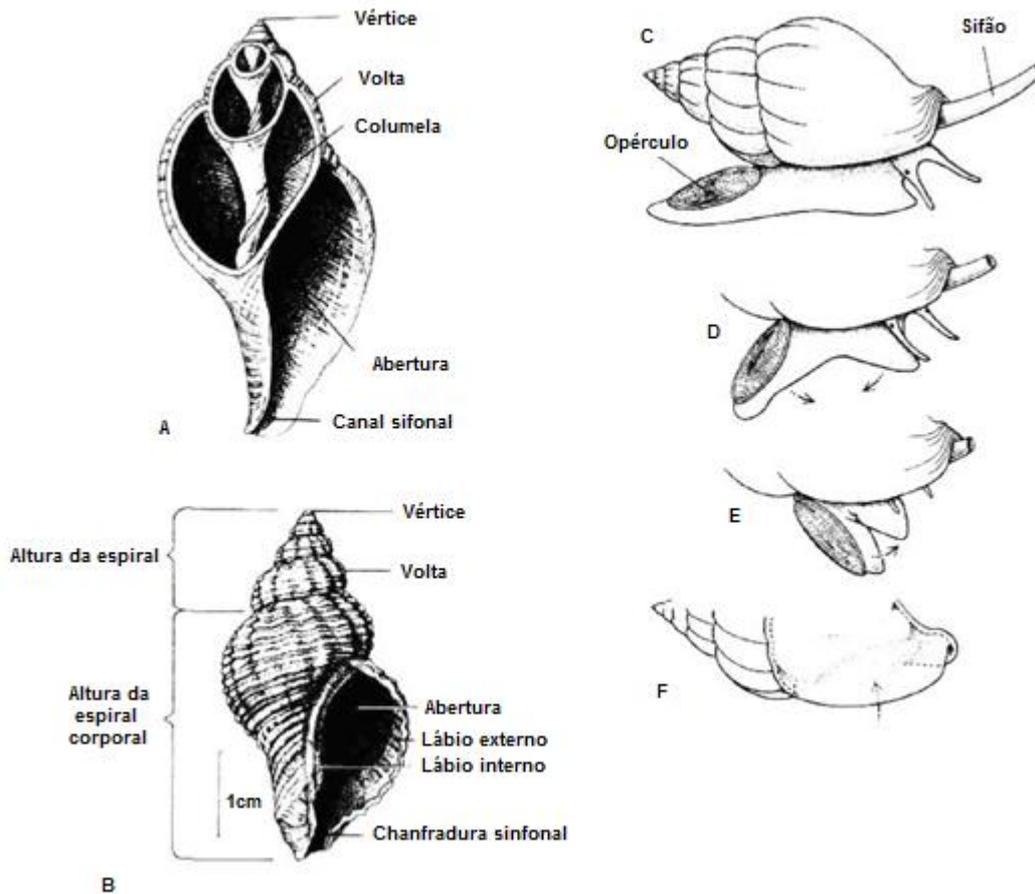
Quase todos os gastrópodes têm seu aparelho excretor constituído de um único nefrídeo. O aparelho nervoso inclui três pares de gânglios conectados por nervos e órgãos sensoriais como olhos ou fotorreceptores, órgão táteis e quimiorreceptores. O osfrádio, área sensorial localizada no sifão inalante da maior parte dos gastrópodes, atua como quimiorreceptor (HICKMAN et al., 2004; RUPPERT et al., 2005).

Há gastrópodes monóicos e dióicos. Durante a cópula nas espécies monóicas, ocorre intercâmbio de espermatozoides ou de espermatóforos. Depois da cópula, cada indivíduo deposita seus ovos em galerias superficiais. A maioria das espécies desta classe depositam seus óvulos e espermatozoides na água. Em outras espécies, a fecundação é interna e seus ovos fecundados podem ser eliminados no plâncton ou nos substratos (HICKMAN et al., 2004; RUPPERT et al., 2005).

A maioria dos gastrópodes bem desenvolvidos recolhe cabeça e pé por meio de uma estreita abertura da concha, comprimindo-se e dobrando-se à medida que seu corpo é recolhido. A concha de gastrópodes, geralmente é uma espiral cônica, composta de voltas tubulares que contém a massa visceral do animal. O vértice é composto pelas espirais mais antigas, com aquelas mais recentes e maiores que se enrolam em torno de um eixo central, a columela. A maior espiral, a volta corporal, termina na abertura em que cabeça e pé do animal protraem (Figura 2). Algumas subclasses, como a Prosobranchia, caracterizam-se por uma abertura contínua, sem formar entalhes ou canal, perfeitamente vedada por um opérculo

calcário ou córneo, quando as partes moles estão totalmente recolhidas como mostra a Figura 1 (LEME, 1995).

Figura 2 – Características morfológicas gerais da concha de gastrópode (A e B). Recolhimento no interior da concha e fechamento pelo opérculo (C, D, E e F).



Fonte: RUPPERT et al. (2005).

Quimicamente, a concha típica de gastrópode consiste de perióstraco externo, composto de material proteico e bronzeado com quinona, camadas mais internas da concha consistem de carbonato de cálcio, de uma camada calcária mais externa e de duas camadas calcárias internas (RUPPERT et al., 2005).

O peso e o volume da volta principal do corpo na volta maior da concha pressionam o lado direito da cavidade do manto e, aparentemente, interferem com os órgãos deste lado. Como consequência, apresentam assimetria bilateral (HICKMAN et al., 2004; RUPPERT et al., 2005).

Embora seja geralmente fino, o perióstraco pode ser ausente ou espesso e peludo. As lâminas das camadas calcárias internas orientam-se geralmente perpendicularmente à

superfície, mas, em alguns gastrópodes, as lâminas da camada mais interna são paralelas à superfície, formando um arranjo chamado de nacarado ou nácar, que torna a superfície interna lisa e lustrosa. A cor da concha é resultante de pigmentos presentes no perióstraco ou nas camadas calcárias. O tamanho da concha é resultado da adição de minerais provenientes da borda externa do manto nos lábios internos e externos (espiral característica ou logarítmica da concha). Esse crescimento geralmente não é contínuo e os intervalos podem ser frequentemente determinados pelas linhas de crescimento intervalares como nos bivalves e pela escultura da superfície da concha. Na maioria dos gastrópodes, a velocidade de crescimento da concha diminui com a idade (RUPPERT et al., 2005).

Existem gastrópodes de, praticamente, todos os tipos de hábitos alimentares, sendo a maioria herbívora, raspando partículas de algas do substrato. Algumas espécies alimentam-se de folhas e rebentos ou plâncton. Alguns são necrófagos e outros carnívoros. Os gastrópodes também podem alimentar-se de material orgânico depositado em areia e argila. Outros coletam matéria orgânica, porém só podem digerir os microorganismos contidos nele (HICKMAN et al., 2004; RUPPERT et al., 2005).

Apesar da diversidade de espécies, é possível fazer algumas generalizações sobre a alimentação dos gastrópodes (RUPPERT et al., 2005):

1. Geralmente emprega-se rádula na alimentação. Na maioria dos gastrópodes, a rádula trata-se de um órgão de alimentação extremamente desenvolvido, que pode agir como um raspador, uma grossa, uma escova, um cortador, uma pinça ou um transportador. Depois da maceração com a rádula ou algum mecanismo triturador, a digestão é realizada pela glândula digestiva.
2. A digestão é parcialmente extracelular.
3. As enzimas destinadas à digestão extracelular, na maioria das vezes, são produzidas pelas glândulas salivares, pelas bolsas esofágicas, pelos divertículos digestivos ou por uma combinação dessas estruturas.
4. No estômago ocorre a digestão extracelular e nos divertículos digestivos, ocorre, esporadicamente, a absorção e digestão intracelular.

A classe Gastropoda é dividida em três subclasses: Prosobranchia, Opisthobranchia e Pulmonata. Os moluscos presentes em manguezais pertencem à subclasse Prosobranchia, caracterizada por moluscos com cavidade paleal aberta anteriormente, dióicos, operculados, de hábito marinho, embora alguns sejam de água doce ou terrestres (LEME, 1995).

2.2.1.1. Subclasse Prosobranchia

As características desta subclasse estão relacionadas com a condição de suas brânquias, localizadas anteriormente ao coração e ao padrão estreptonêurico do sistema nervoso. Também é característico por terem sexos separados (dióicos). Entre os prosobrânquios, apenas a família Titiscaniidae não apresenta concha (LEME, 1995).

São animais de *habitat* marinho bentônico, embora haja representantes de água doce e terrestres. Apresentam cavidade do manto anterior e, na maioria das famílias, as espécies perderam o átrio direito e apresentam opérculo (RUPERT et al., 2005).

A subclasse era dividida em três ordens fundamentadas em um conjunto de estruturas e fenômenos de complexidade diferenciada, resultando em Archaeogastropoda, Mesogastropoda e Neogastropoda. Em 1960, a ordem Caenogastropoda foi introduzida por Cox, e as ordens citadas passaram a ser consideradas subordens (LEME, 1995).

A subordem Mesogastropoda é constituída por famílias bastante diversificadas em aspectos morfológicos, fisiológicos e ecológicos. Assim, apresenta representantes em todos os ambientes com grande gama de transformações anatômicas adaptativas (LEME, 1995; RUPPERT et al., 2005).

A subordem Archaeogastropoda reúne espécies limitadas ao ambiente bentônico marinho. Nesta ordem, encontram-se algumas famílias, por exemplo Ellobiidae, consideradas a base da evolução dos Pulmonata, que habitam principalmente as regiões de transição da zona entremarés. Gêneros dessa subordem, inclusive *Melampus*, caracterizam-se pelo desenvolvimento do sistema nervoso, do aparelho digestivo, principalmente na estrutura do estômago, e pela ausência completa de ureteres (LEME, 1995).

2.2.1.2. *Melampus coffea*

Melampus coffea, molusco pertencente à ordem Archaeopulmonata, subordem Archaeogastropoda, é uma espécie de caracol intertidal de concha ovalada, afinando em direção à base e bastante comum em manguezais brasileiros (Figura 3). A maioria dos caracóis é marrom com três faixas claras horizontais. A cor de fundo em alguns indivíduos pode variar de tons de cinza ou bege para marrom amarelado. A abertura é estreita e longa, com lábio externo e margem interna do rolamento com dois dentes. Ao contrário de muitos outros caracóis, *M. coffea* prescinde de opérculo (LEME, 1995; MATTHEWS-CASCON; LOTUFO, 2006; SMS, 2009b; RUPPERT et al., 2005). É bastante comum em manguezais e

marismas do oceano Atlântico, distribuindo-se do estado americano da Flórida ao Uruguai, inclusive nos manguezais da Costa Brasileira (MATTHEWS-CASCON; LOTUFO, 2006).

Figura 3– Indivíduos de *Melampus coffea* na raiz de *Rhizophora mangle*



Fonte: http://www.sms.si.edu/irlspec/images/Melamp_coffeu.jpg.

Entre os principais fatores determinantes da distribuição desses organismos, estão o tipo de sedimento, a alta salinidade, a umidade relativa, a proporção de submersão durante as marés altas, a composição específica da flora, a densidade de árvores do hábitat e a produção de serapilheira (PRICE, 1980; MCMAHON; RUSSEL-HUNTER, 1981; PROFFITT; DEVLIN, 2005; MAIA; TANAKA, 2007).

Esses caramujos respiram através da cavidade do manto, que funciona como um pulmão, porém ainda dependem da água para reprodução (RUSSEL-HUNTER et al., 1972). Maia et al. (2012) acompanharam o ciclo reprodutivo e o desenvolvimento embrionário de *M. coffea* e concluíram que esta espécie é hermafrodita simultâneo, apresentando componentes masculinos e femininos distribuídos intercaladamente em seus folículos. Apresenta também um ciclo reprodutivo sincrônico bem definido, evidenciando-se períodos sucessivos de amadurecimento, de liberação dos ovos e de repouso (sem reprodução). Afirmaram também em seus estudos que, nos períodos de estiagem, não há atividade reprodutiva e que, após essa estação – quando os valores de pluviosidade aumentam e a salinidade diminui – as populações são bastante densas e predominam indivíduos de menor tamanho.

A alimentação ocorre diretamente no substrato durante a maré baixa, contribuindo para a degradação da serapilheira. Realizam um processo de migração vertical diária, subindo na vegetação para não se afogarem com a maré alta (PROFFITT; DEVLIN, 2005; MAIA; TANAKA, 2007; TAVARES et al., 2011).

2.2.1.3. *Littoraria angulifera*

Entre os organismos colonizadores das árvores do mangue, estão os gastrópodes da família Littorinidae. Pertencente à subordem Mesogastropoda, ordem Caenogastropoda, indivíduos da espécie *Littoraria angulifera* são observados em abundância na região costeira do nordeste brasileiro, habitando as raízes e folhas de *Rhizophora mangle*, *Avicenia sp.* e *Laguncularia racemosa* (MATTHEWS; KEMPF, 1970; REID, 1989; MATHEWS-CASCON; LOTUFO, 2006). Algumas espécies de *Littoraria* eram anteriormente classificadas como *Littorina* (ANTWI; AKUNFI, 1987; PRINCZ, 1981), mas este gênero restringe-se às espécies do hemisfério norte (REID, 1985; REID, 1989). Sua concha pode atingir até 30 mm de comprimento. De espiral longa cônica e volta corporal lisa, apresenta teleoconcha com seis a oito voltas. A abertura da concha possui formato oval com lábio columelar liso e lábio externo fino. A concha apresenta variação na cor, sendo mais comum, aquelas de coloração bege com manchas irregulares axiais que variam da cor marrom à laranja (Figura 4). Opérculo córneo fino de cor marrom claro está presente nesta espécie (SMS, 2009a; MATHEWS-CASCON; LOTUFO, 2006).

Trata-se de uma espécie neotropical que ocorre em florestas de mangue em ambos os lados do oceano Atlântico, ocupando zonas de maré alta. No Brasil, tem ocorrência do Ceará até Santa Catarina e em ilhas oceânicas. É o único littorínídeo encontrado exclusivamente em manguezais (MERKT; ELLISON, 1998; MATTHEWS-CASCON; LOTUFO, 2006).

Figura 4 – Indivíduo de *Littoraria angulifera* em raiz de *Rhizophora mangle*.



Fonte: A Autora.

São terrestres quando adultos, em suas preferências alimentares incluem fungos marinhos, macroalgas e, principalmente, raízes de *R. mangle* (KOHLMEYER; BEBOUT, 1986; WATSON; NORTON, 1987; CHRISTENSEN, 1998; FIELDS; ELLINGTON, 1992).

Entre seus predadores, têm-se espécies de peixes, crustáceos, aves e moscas parasitoides (REID, 1985; DUNCAN; SZELISTOWSKI, 1998).

Reid (1989) descreveu as espécies da família Littorinidae com exceção de *L. angulifera*, caracterizando suas estruturas quanto à morfologia, filogenia e evolução destas espécies, simplificando a taxonomia. Boulding e Alstynne (1993) identificaram diferenciações no crescimento e desenvolvimento de espécies do gênero *Littorina*. Estas espécies, quando comparadas a outros caramujos encontrados na região costeira, apresentaram crescimento mais significativo e maior resistência.

Sokolova e Berger (2000) verificaram que caramujos da espécie *Littorina saxatilis* de concha marrom apresentavam melhores níveis de sobrevivência do que os caramujos da mesma espécie de concha púrpura, o que sugere a possibilidade de diferentes níveis de adaptação em caracóis de mesma espécie, podendo proporcionar vantagem seletiva.

Erlandsson e Johannesson (1994) observaram o comportamento sexual de *Littorina littorea*, em que as fêmeas maiores, de acordo com o tamanho da concha, são mais férteis. Entretanto, de acordo com testes de fertilidade e evolução em caramujos de espécies do gênero *Littorina*, verificou-se maior sensibilidade a variações de temperatura para indivíduos desta espécie (CHASE; TOMAS, 1995; JOHANNESON et al., 2010).

A família Littorinidae tem sido objeto de muitos estudos morfológicos, comportamentais e de variação da composição proteica. Na sua maioria, esses estudos foram realizados para esclarecer questões relacionadas com a estrutura da população ou problemas taxonômicos e sistemáticos. Entretanto, há na literatura, estudos utilizando moluscos da espécie *Littoraria angulifera* como bioindicador de qualidade ambiental de manguezais (MARTÍNEZ et al., 2013) e biomarcador para tributilestanho, substância utilizada como antiincrustante em cascos de navios e embarcações (COSTA et al., 2013).

2.3. Bioacumulação para a biomonitoração de elementos químicos

O processo de bioacumulação resulta em frações de massa de elementos químicos mais elevadas de substâncias químicas nos tecidos vivos em comparação com aquelas do substrato. A acumulação também pode ser baseada na comparação com outras espécies ocorrentes no mesmo local (SIJM; HERMENS, 2000). Os efeitos fisiológicos dessa acumulação podem ser reversíveis, transitórios, quando são ativados os sistemas de desintoxicação dos organismos, agudos e crônicos, ou, até mesmo, inofensivos. Contudo, a maior parte dos efeitos

ecotoxicológicos decorrentes da bioacumulação de substâncias químicas são, ainda, desconhecidos. Estreitamente relacionada com esse conceito, está a biomagnificação, que é o processo de acumulação de substâncias nos níveis tróficos mais elevados da cadeia alimentar (BEEK et al., 2000).

A taxa de acumulação no organismo depende não só da disponibilidade do elemento químico no ambiente, mas também de fatores ambientais como o acúmulo de elementos químicos no substrato. O nível máximo alcançado é regulado pela capacidade do organismo de excretar as substâncias químicas ou, alternativamente, armazená-las (BRYAN, 1979; RAINBOW, 1995).

Baseando-se na resposta dos organismos ao processo de bioacumulação, os componentes biológicos de um ecossistema podem ser utilizados como bioindicadores para informar a qualidade do ambiente ou como biomonitores para quantificar esse atributo (OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003).

Segundo Rainbow (1995), a escolha de um biomonitor deve ser baseada em:

- a. identificação taxonômica confiável,
- b. conhecimento da biologia das espécies biomonitoras selecionadas, incluindo o tipo de alimentação e o ciclo de vida e
- c. realização de abordagem comparativa com vários organismos escolhidos para cobrir uma gama de fontes de elementos químicos em um local.

Diversas destas espécies são utilizadas em estudos de biomonitoração ambiental, com destaque para crustáceos e moluscos, que são abundantes nos estuários, possuindo relevância comercial (econômica) e ecológica. Em decorrência disto, espécies como *Talitrus saltator* (crustáceo), *Perna perna* (mexilhão) e *Limnoperna fortunei* (mexilhão-dourado) têm sido utilizadas em estudo de biomonitoração ambiental (OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003; UGOLINI et al., 2004; MATTHEWS-CASCON; LOTUFO, 2006; UNGHERESE et al., 2010; FERREIRA et al., 2013; MARENGONI et al., 2013).

2.3.1. Biomonitoração de elementos químicos utilizando moluscos

Estudos ambientais sugerem que a capacidade de acumular elementos químicos em frações de massa superiores às do ambiente permite a utilização de moluscos como biomonitores (CLEMENTS et al., 2006; JÓŹWIAK et al., 2010; SIRIPROM et al., 2012; BORDEAN et al., 2014). Suas características permitem sua aplicação em programas de

monitoração de qualidade ambiental. Frequentemente, ressaltam-se vantagens, perspectivas e limitações para o uso de moluscos terrestres e aquáticos para a monitoração de agentes de estresse químico em seu ambiente específico, além de pesquisas de bioacumulação e efeitos biológicos em ecossistemas costeiros e de água doce (OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003).

Frações de massa de Cd, Cu, Pb e Zn foram determinadas em caracóis da espécie *Littoraria brevicula* em Onsan, Coréia do Sul, para avaliar o impacto ambiental gerado pelo complexo industrial da região. A distribuição espacial dos elementos químicos no caramujo e na água do mar indica que o complexo industrial perto da Baía é a fonte de entrada desses elementos químicos. Especialmente, as frações de massa de Cd e Pb no caramujo e na água do mar foram inversamente relacionadas com a distância do complexo industrial (KANG et al., 1999).

Beiras et al. (2003) verificaram a bioacumulação de Hg, Cu, Pb e bifenispolioclorados (PCBs) em mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis*. A correlação entre os valores das frações de massa nos sedimentos com os moluscos foram tão significativas em nível de 95% de confiança quanto à relação entre as frações de massa na água do mar e nos moluscos.

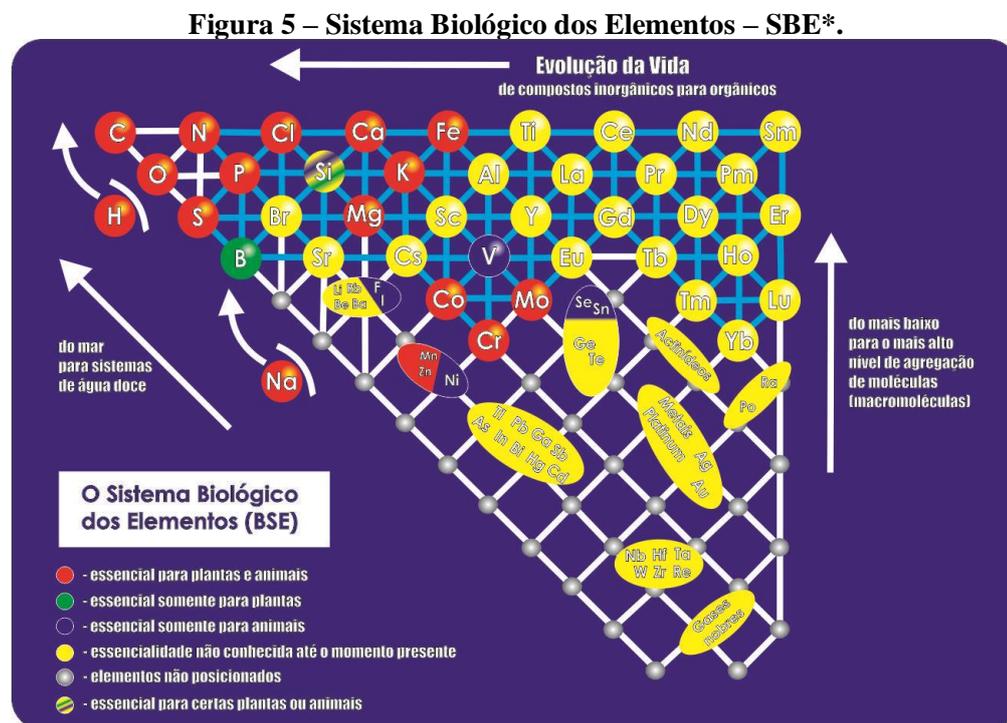
Siriprom et al. (2012) estudaram os elementos químicos em conchas de bivalves *Perna viridis* por fluorescência de raios-X por energia dispersiva - EDXRF e espectroscopia de ressonância de rotação de elétrons - ESR. Com base em suas observações, afirmaram que as conchas desta espécie são constituídas principalmente de Ca e Sr. As informações de elementos químicos traços mostraram relação significativa com aquelas da concha.

Gastropodes representam a única classe de moluscos terrestres e, conseqüentemente, são os únicos que podem ser usados para bioindicação e biomonitoração. Contudo, moluscos são pouco empregados como biomonitores para a avaliação da qualidade ambiental de ecossistemas terrestres, quando comparados a líquens, briófitas, plantas vasculares e de outros grupos de invertebrados, como nematóides, anelídeos e artrópodes (OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003; SANTOS, 2011).

Ao utilizar o caracol *Cantareus aspersus*, Bordean et al. (2014) corroboraram o emprego de moluscos terrestres para a avaliação de qualidade ambiental. Nesse caso, comprovaram a capacidade de acumulação de manganês a partir do solo contaminado com o elemento químico, sugerindo papel fundamental de caracóis na ciclagem de manganês no ecossistema em questão.

2.4. Elementos químicos

Elementos químicos são base para a vida terrestre, contudo nem todos os elementos químicos possuem suas funções biológicas claramente conhecidas. Fränzle e Markert (2000) construíram o Sistema Biológico dos Elementos, SBE, a partir da correlação de dados da função fisiológica dos elementos individuais em organismos vivos, do desenvolvimento evolutivo do ambiente inorgânico e de informações da absorção dos elementos pela planta (molécula simples ou troca de íons) para elucidar a utilização dos elementos químicos pelos organismos (Figura 5). Nesta figura, H e Na exercem várias funções no sistema biológico, por isso não são fixos no sistema. Outros não foram posicionados devido à ausência de informações, como é o caso de elementos tóxicos, lantanídeos e actinídeos.



*Baseado na correlação entre dados da função fisiológica dos elementos químicos individuais em organismos vivos, do desenvolvimento evolutivo do ambiente inorgânico e de informações da absorção dos elementos químicos pelas plantas.

Fonte: Adaptado de Fränzle e Markert (2000).

Os nutrientes podem ser subdivididos em macro e micronutrientes. Cálcio, potássio e magnésio são, por exemplo, requeridos por organismos vivos em altas frações de massa, sendo chamados de macronutrientes. Cobre, ferro, zinco, manganês, molibdênio e selênio são exemplos de micronutrientes, ou seja, necessários em pequenas quantidades (FRÄNZLE; MARKERT, 2000).

Por outro lado, o termo metal pesado refere-se aos elementos químicos de peso específico maior que 5 g cm^{-3} ou de número atômico maior que 20. Esse termo é comumente associado aos elementos químicos tóxicos, contudo, para os demais elementos químicos, a denominação de relevância ambiental é mais adequada, pois, na maior parte das vezes, seu efeito indesejado não é completamente estabelecido (FRANÇA, 2006). Elementos químicos como cobalto, cobre, ferro, manganês, níquel, selênio e zinco são benéficos em pequenas quantidades para os seres vivos, contudo podem causar efeitos danosos quando presentes em grande quantidade (RAINBOW, 1995; FRÄNZLE; MARKERT, 2000). Estudos ambientais envolvendo as mais diversas substâncias químicas tornam-se, assim, necessários para o entendimento do uso, acumulação e toxicidade dos elementos químicos para um ecossistema. Diversas técnicas analíticas são recomendadas para garantir o maior número de elementos químicos avaliados simultaneamente.

2.5. Técnicas analíticas

O sucesso de um programa de biomonitoração depende das técnicas analíticas a serem utilizadas para a qualidade do procedimento analítico e da gama de elementos químicos a serem analisados. Grande número de pesquisas têm empregado diferentes métodos analíticos como a fluorescência de raios-X por dispersão de energia - EDXRF e a espectrometria de absorção atômica - AAS, dependendo dos elementos químicos a serem estudados (CAMEL, 2003; MARGUÍ et al., 2005; GONZALVEZ et al., 2009; CARTER et al., 2013).

2.5.1. Fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDXRF)

As técnicas de raios-X baseiam-se nas medidas de emissão, absorção, espalhamento, fluorescência e difração da radiação eletromagnética. Os métodos de fluorescência de raios-X são bastante utilizados para quantificação e qualificação dos elementos químicos da tabela periódica com número atômico maior que o do sódio, obtendo-se as frações de massa dos elementos químicos analisados (ANJOS et al., 2002; SKOOG et al., 2002).

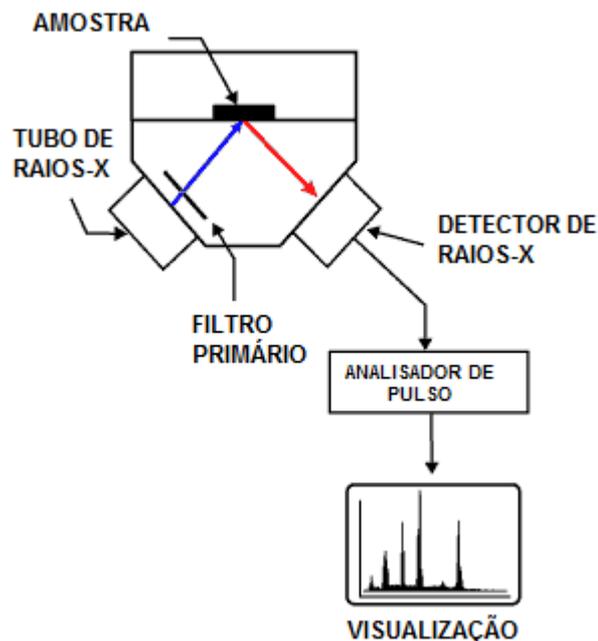
O desenvolvimento do detector semi-condutor de Si(Li) permitiu discriminar raios-X de energias próximas, possibilitando o surgimento da fluorescência de raios-X por dispersão de energia – EDXRF, do inglês, *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence* (LECHNER et al., 1996).

EDXRF consiste na exposição de amostras sólidas ou líquidas a um feixe de raios-X propiciando a excitação dos elétrons dos elementos químicos das amostras a partir da absorção do feixe de raios-X primário, produzido no tubo de Ródio - Rh. Esta excitação resulta na emissão de raios-X característicos que são medidos pelo detector semicondutor. Após amplificação, o espectro de raios-X é analisado em um programa de computador. Desta maneira, é possível realizar análises qualitativas e quantitativas a partir de curvas de calibração (ANJOS et al., 2002; GRIEKEN, 2002; MARGUÍ et al., 2005; JOSHI et al., 2006; SOUSA et al., 2013).

Os raios-X secundários incidem simultaneamente no detector, de geometria simplificada, sem a necessidade de cristais para discriminar essa radiação secundária, nem a prévia discriminação dos diversos comprimentos de onda para informar a composição química da amostra em estudo (ANJOS et al., 2002; GRIEKEN, 2002; MARGUÍ et al., 2005; JOSHI et al., 2006).

A Figura 6 mostra o esquema geral de um EDXRF, composto, basicamente, pela fonte geradora de radiação eletromagnética, filtros para a radiação primária, a irradiação da amostra com consequente geração de raios-X característicos incidindo diretamente sobre a superfície do detector, seguido pelos sistemas eletrônico e de interpretação de dados (GRIEKEN, 2002).

Figura 6 – Esquema de um espectrômetro EDXRF.



Considerando-se os fatores envolvidos na análise química por EDXRF, a técnica requer padronização adequada dos parâmetros para cada rotina experimental. Quanto mais complexas as rotinas de análise, mais precisos serão os resultados. Condição relevante, principalmente em amostras biológicas, cujas composições químicas e variedade de matrizes são consideráveis (REDUS et al., 2009; SOUSA et al., 2013).

Quando comparadas com outras técnicas analíticas multielementares, esta técnica destaca-se pelo baixo custo e rapidez de análise, além da preservação das amostras, por tratar-se de uma técnica não destrutiva (SKROOG et al., 2002; MARGUÍ et al., 2005; PATACA et al., 2005).

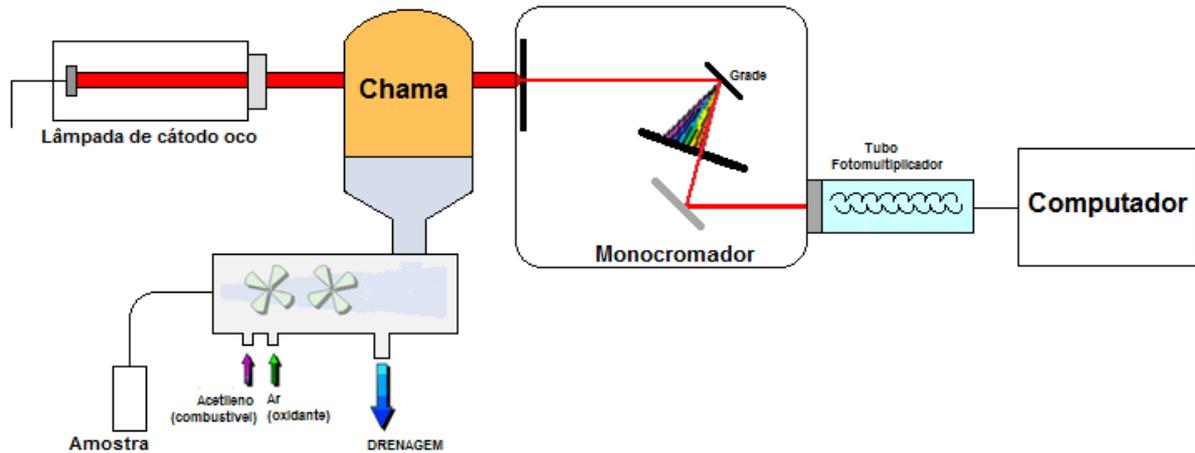
2.5.2. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

A espectrometria de absorção atômica vem sendo empregada para a quantificação de diversos elementos químicos nas mais variadas matrizes como amostras biológicas, ambientais, geológicas e alimentos. Baseia-se na propriedade que os átomos possuem de absorver energia quando estão no estado fundamental (KANG et al., 1999; ALEIXO; NÓBREGA, 2000; BEIRAS et al., 2003; KRUG et al., 2004).

O espectrômetro de absorção atômica é composto por fonte de radiação luminosa, que emite o espectro do elemento químico de interesse, e por sistema de atomização, no qual os átomos da amostra são produzidos. O conjunto de monocromador dispersa a luz e seleciona o comprimento de onda a ser utilizado. O detector mede a intensidade de luz, transformando-a em um sinal elétrico e amplificando-a. Além disso, o registrador mostra a leitura depois do processamento do sinal (KRUG et al., 2004). A Figura 7 ilustra um esquema simplificado do funcionamento de um espectrômetro de absorção atômica.

Um dos tipos de atomizadores mais utilizados é a chama, cujo gás de arraste é o acetileno para a maior parte dos elementos químicos a serem analisados. A espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) é a técnica mais indicada para análise em níveis de mg kg^{-1} (KRUG et al., 2004).

Figura 7 – Funcionamento do espectrômetro de absorção atômica.



Fonte: A autora.

As fontes de radiação mais utilizadas em espectrometria de absorção atômica são as lâmpadas de cátodo oco (HCL - *hollow-cathodelamp*), que são compostas por um ânodo de tungstênio e o cátodo cilíndrico selado em um tubo de vidro preenchido com neônio ou argônio. Essas lâmpadas possuem o elemento químico a ser analisado na constituição do cátodo, o que garante linhas de emissão estreitas e a radiação no comprimento de onda que o analito irá absorver (SKOOG, 2002; KRUG et al., 2004).

O atomizador é constituído de três partes principais, o nebulizador, a câmara de nebulização e o queimador. A primeira parte, nebulizador, é responsável pela conversão da amostra em aerossol (gotículas extremamente pequenas). Essa nebulização ocorre por meio de um fluxo do oxidante gasoso, misturado com um gás combustível, que passa por uma série de placas defletoras, que remove quase todas as gotículas, com exceção das menores da solução. Esse aerossol, com o oxidante e o combustível é levado à chama, na qual ocorre a atomização (SKOOG, 2002). O queimador é alimentado pelos gases, ocorrendo a evaporação do solvente, a vaporização e a dissociação da molécula em seus átomos constituintes. Quanto menor a gotícula, maior a velocidade com que esses processos ocorrem e, assim, é possível garantir a presença do átomo no caminho da radiação para a absorção da intensidade luminosa gerada (CANTLE, 1986).

O monocromador atua na separação da linha espectral de interesse das outras linhas emitidas pela fonte de radiação, por meio da utilização de um prisma ou rede de difração. Este componente ocasionará a decomposição do feixe de radiação em discretos comprimentos de onda, com diferentes ângulos, sendo possível selecionar apenas a linha de comprimento de onda desejado (KRUG et al., 2004).

Os detectores encontrados no espectrômetro de absorção atômica são as válvulas fotomultiplicadoras ou detectores de estado sólido. O detector transforma o sinal recebido em sinal elétrico e a unidade de leitura registra os dados obtidos (KRUG et al., 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram quantificados elementos químicos presentes em moluscos adultos das espécies *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* coletados em manguezais do Estado de Pernambuco a fim de avaliar a aplicabilidade dos procedimentos analíticos, comparar as duas espécies, determinar a variabilidade da espécie *Littoraria angulifera*, estudar a bioacumulação de elementos químicos nestas espécies e qualificar estes moluscos como biomonitores potenciais. Neste trabalho, os elementos químicos Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn foram estudados aplicando-se as técnicas analíticas disponíveis no Serviço de Monitoração Ambiental – SEAMB. Pela característica multielementar da EDXRF, Sr, que está associado ao Ca, também foi incluído neste estudo.

3.1. Áreas de estudo

Como critérios de seleção das áreas de estudo, considerou-se a facilidade de acesso aos locais e a condição antagônica das situações dos manguezais do Parque Memorial Arcoverde e Rio Arinquiná. Foram selecionadas também mais duas áreas, a Praia do Forte na Ilha de Itamaracá e Maracápe, para maior relevância dos dados obtidos para a Costa Pernambucana (Figura 8). Para este estudo, as amostras foram coletadas no mês de julho de 2013, período chuvoso em todas as áreas de estudo selecionadas.

O macroclima das regiões é tipicamente de monções, e do tipo As, segundo o sistema de classificação de Köppen, caracterizando-se por um período chuvoso nos meses de março a agosto e de estiagem de setembro a fevereiro, e temperatura média anual de 25°C (PEAEM, 1998; FIGUEIREDO et al., 2003; RODRIGUES; FARRAPEIRA, 2008).

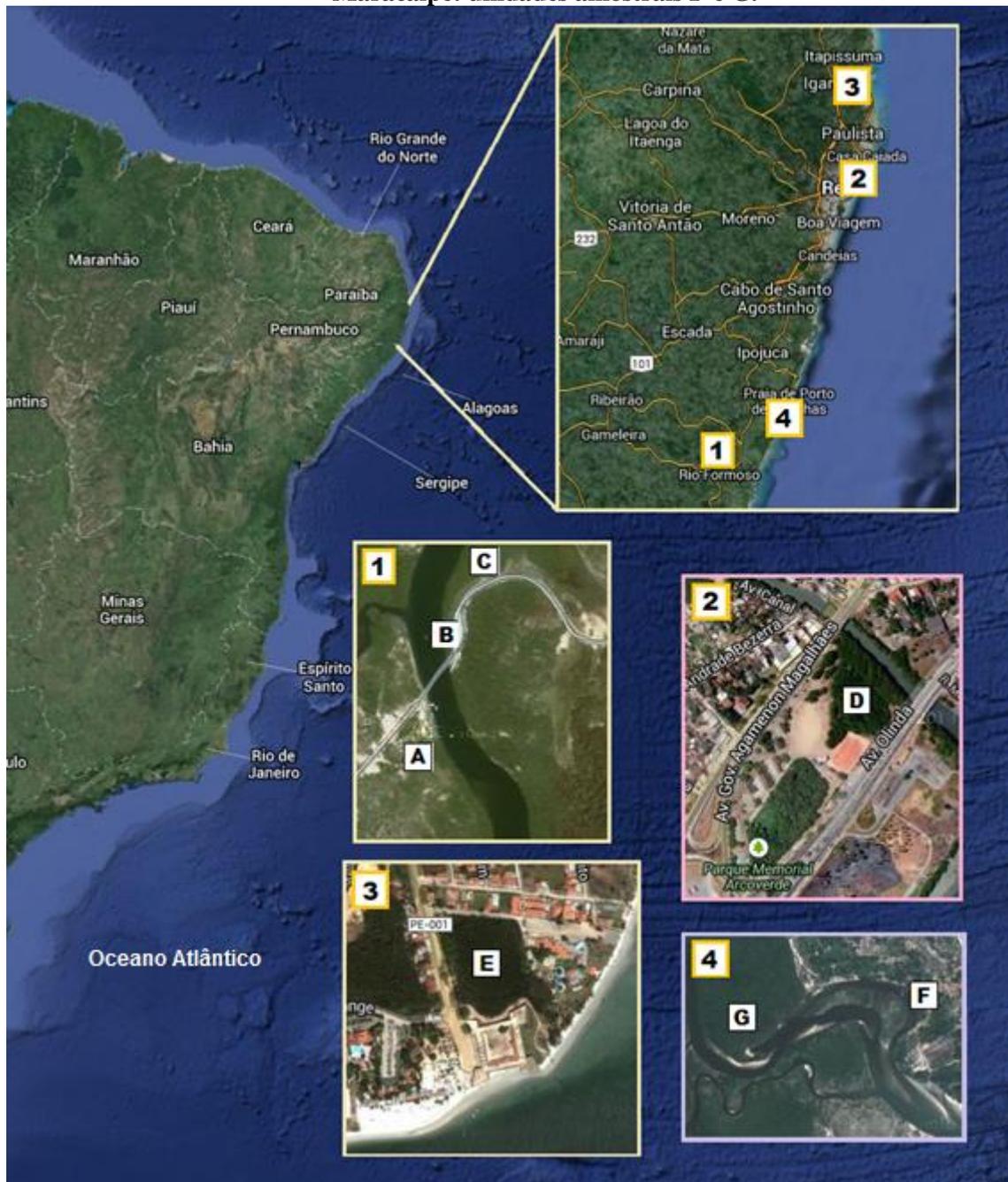
3.1.1. Rio Arinquiná (Área 1; unidades amostrais A, B e C)

A primeira área de estudo foi o Manguezal às margens do Rio Arinquiná (coordenadas: latitude 8°40'05''S; longitude 35°06'40''W), no município de Rio Formoso, litoral sul de Pernambuco. Às suas margens, predomina a vegetação de manguezais. O município de Rio Formoso situa-se na microrregião geográfica da Mata Meridional de Pernambuco, tendo como limite os municípios de Sirinhaém (Norte), Tamandaré (Sul),

Gameleira (Oeste) e o Oceano Atlântico (Leste). A região apresenta clima tropical com estação seca no verão e pluviosidade média anual de aproximadamente 1.900 mm.

Foram selecionadas duas unidades amostrais em margens opostas do Rio Arinquiná (1A e 1B) e outra numa região mais seca, sem a interferência de marés (1C), ilustradas na Figura 8.

Figura 8 – Localização das sete unidades amostrais. (1) Rio Formoso: unidades amostrais A, B e C. (2) Parque Memorial Arcoverde: unidade amostral D. (3) Itamaracá: unidade amostral E. (4) Maracaípe: unidades amostrais F e G.



Fonte: Modificado de Google Earth.

3.1.2. Parque Memorial Arcoverde (Área 2; unidade amostral D)

A unidade amostral 2D (Figura 8) foi selecionada na segunda área de estudo, o manguezal localizado no Parque Memorial Arcoverde, parte do Complexo de Salgadinho. Situa-se no limite intermunicipal de Recife e Olinda e é composto por quatro ilhas de manguezais urbanos. Este manguezal possui uma área total de aproximadamente 82.000 m² e é considerado um ambiente aquático artificial resultante de aterros realizados sobre o complexo estuarino dos rios Beberibe e Capibaribe na década de 70. Indiretamente, o fluxo e refluxo das águas resultantes da oscilação das marés e os efluentes domésticos, com alto teor de matéria orgânica entram em contato com estes manguezais (CUNHA; GUIMARÃES, 2000; FIGUEIREDO et al., 2003). A região apresenta clima tropical com estação seca no verão e pluviosidade média anual de aproximadamente 1.820 mm.

3.1.3. Praia do Forte Orange (Área 3; unidade amostral E)

A Praia do Forte Orange, localizada na ilha de Itamaracá, litoral norte de Pernambuco, possui cerca de 2 km de orla marítima e trata-se de uma área predominantemente turística. A região apresenta pluviosidade média de aproximadamente 1.660 mm ao ano. Nesta área, foi selecionada a unidade amostral 3E (Figura 8), manguezal localizado próximo ao Forte Orange.

3.1.4. Maracaípe (Área 4; unidades amostrais F e G)

O estudo foi realizado na região circunvizinha à Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) - Nossa Senhora do Outeiro de Maracaípe, localizada no Município de Ipojuca, litoral sul de Pernambuco. Nesta área, selecionaram-se duas unidades amostrais com provável interferência de esgoto doméstico (4F) e a outra na área mais próxima à área protegida pela Reserva (4G), conforme ilustra a Figura 8. A precipitação pluviométrica é aproximadamente 2.000 mm ao ano.

3.2. Amostragem

Foram coletados 320 indivíduos de moluscos da espécie *Littoraria angulifera* e 159 de *Melampus coffea*, distribuídos em 55 amostras, sendo 42 amostras de *L. angulifera* e 13 de *M.*

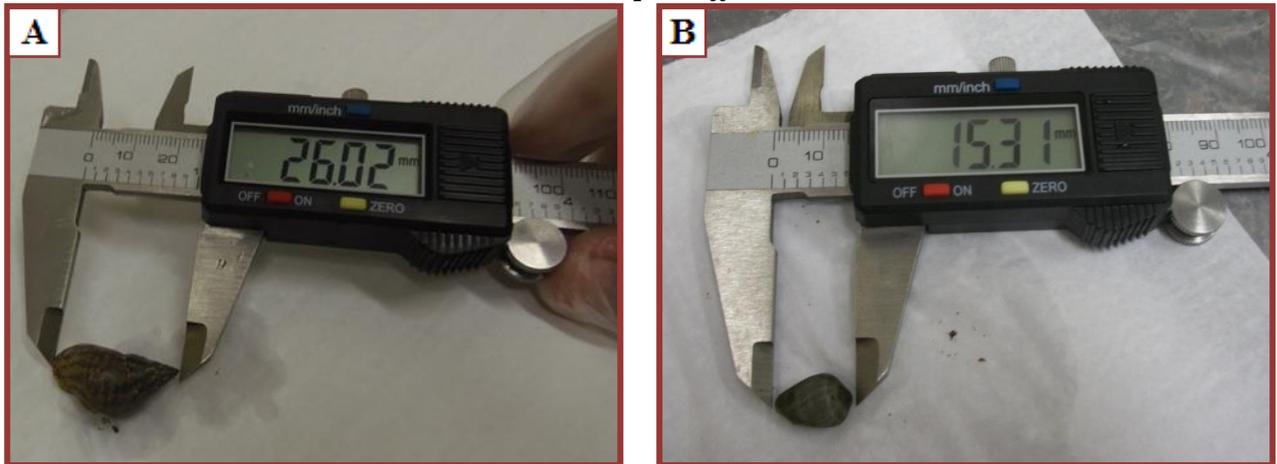
coffea (Tabela 2). Cada amostra foi composta por, em média, sete espécimes de *L. Angulifera*, cujas conchas mediram aproximadamente $24 \text{ mm} \pm 4 \text{ mm}$, ou dez animais de *M. coffea* de tamanho médio de concha de $16,0 \text{ mm} \pm 1,0 \text{ mm}$. A biometria das conchas foi realizada em laboratório com auxílio de paquímetro digital (Figura 9). Na ausência de normas ou leis nacionais regulamentadoras de coleta de material biológico animal em áreas de preservação permanente, foi elaborado protocolo específico no CRCN-NE.

Tabela 2 - Distribuição amostral dos indivíduos

Unidade amostral	Local	A _L	N _L	I/A _L	A _M	N _M	I/A _M
1A	Rio Formoso	12	79	7	-	-	
1B	Rio Formoso	11	86	8	-	-	
1C	Rio Formoso	5	41	8	-	-	
2D	Olinda	2	12	6	5	62	12
3E	Itamaracá	5	47	9	3	34	11
4F	Maracaípe	2	15	8	-	-	
4G	Maracaípe	5	40	8	5	63	13
Total		42	320	8	13	159	12

A_L: número de amostras de *L. angulifera*; N_L: número total de indivíduos de *L. angulifera*; I/A_L: média de indivíduos por amostra de *L. angulifera*. A_M: número de amostras de *M. coffea*; N_M: número total de indivíduos de *M. coffea*; I/A_M: média de indivíduos por amostra de *M. coffea*.

Figura 9 – Exemplo de biometria dos moluscos avaliados neste trabalho. A. *Littoraria angulifera*. B. *Melampus coffea*



Fonte: A Autora.

Após a devida identificação das amostras, os animais foram sacrificados sob refrigeração a -20°C por 12 horas para minimizar sofrimento durante a eutanásia. As conchas foram separadas dos corpos dos moluscos, secas e armazenadas em recipientes de plástico para estudos posteriores. Em seguida, os tecidos moles foram liofilizados por aproximadamente 24 h ou até pesagens sucessivas menores que 1 mg.

3.3. Preparação das amostras

As amostras foram cominuídas para a obtenção de granulometria de 35 mesh (0,5 mm) com auxílio de almofariz de porcelana e transferidas para recipientes devidamente identificados. Concomitante à preparação das amostras, separou-se aproximadamente 0,5 g das amostras em embalagem aberta de papel alumínio feita artesanalmente de dimensões aproximadas 4 cm x 4 cm x 1,5 cm para a correção de umidade. As sub-amostras foram secas em estufa por quatro horas à 100°C. O equilíbrio térmico ocorreu em dessecador por duas horas. A partir do cálculo do teor de água das amostras, foi possível expressar os resultados analíticos em peso seco. Tipicamente, a umidade das amostras foi 12%.

3.3.1. Preparo químico das amostras

Porções-teste de aproximadamente 0,5 g das amostras foram analisadas por EDXRF (vide seção 3.4). As mesmas porções-teste foram submetidas ao tratamento químico após a análise por EDXRF para possibilitar a análise por FAAS VARIAN AAS 220 FS (vide seção 3.3.1 e 3.5). O branco analítico foi analisado juntamente com as amostras.

Para a realização da análise por FAAS, as amostras foram preparadas quimicamente de acordo com o protocolo de Sarruge e Haag (1974), modificado por Vaccaro et al. (2004). Foram transferidos 0,5 g de amostras e material de referência certificado diretamente em tubos de teflon de capacidade de 30 ml, sendo as etapas do procedimento relacionadas abaixo:

- Adição de 6,0 ml de HNO₃ (ácido nítrico) concentrado p.a. (~65%);
- Repouso da solução por 24 horas em capela de fluxo laminar;
- Agitação da solução manualmente a fim de evitar a adesão da mistura às paredes;
- Adição de 1,0 ml de ácido perclórico concentrado (HClO₄).
- Aquecimento da solução em micro-ondas, conforme programa de ciclos adaptado para esse trabalho (Tabela 3).

Tabela 3 – Ciclos de aquecimento para o preparo químico de amostras em forno digestor por micro-ondas.

Ciclo	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Espera (min)
1	40	10	8
2	50	8	8
3	60	6	8
4	70	4	8

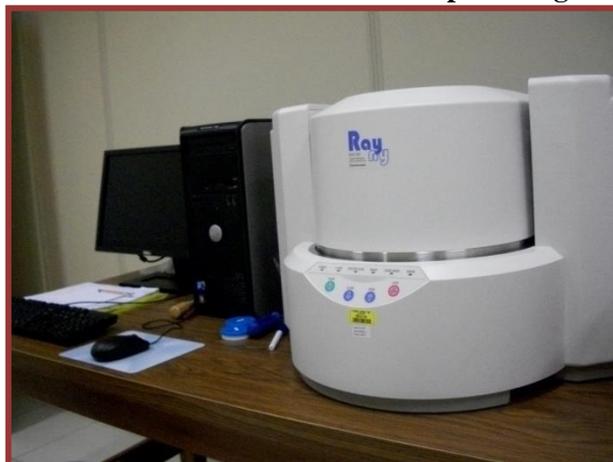
Após resfriamento da solução, a amostra foi transferida para balão volumétrico e adicionada água ultrapura (Milli-Q Element) até completar 25 ml de solução. Em seguida, as soluções foram filtradas e armazenadas sob refrigeração (temperatura de 4 °C).

3.4. Etapa 1 - EDXRF

Porções-teste de 0,5 g de cada amostra e dos materiais de referência SRM 1547 *Peach Leaves*, SRM2796 *Mussel Tissue – Trace Elements & Methylmercury – Freeze-dried*, produzidos pelo *National Institute of Standards and Technology – NIST* foram transferidos para anéis de polietileno, vedados com filme de polipropileno. O arranjo é apropriado para leitura em vácuo por EDXRF. Simultaneamente à análise, foram tomadas porções de 0,5 g para realizar o cálculo do teor de água (umidade) dos materiais de referência e das amostras, conforme explicado na seção 3.3.

A análise de Cl, Fe, Mg, Mn, P, Sr e Zn foi realizada em triplicata no equipamento EDX 720 da Shimadzu Scientific Instruments, INC (Figura 10). Anteriormente à realização das análises químicas, foi efetuada calibração de energia utilizando o padrão A-750, fornecido pela Shimadzu. Como controle da qualidade do equipamento de medição, foi utilizado o padrão SUS, também fornecido pela Shimadzu. As análises foram realizadas no vácuo por um tempo de detecção de 100 segundos, com tempo morto de, no máximo, 35% para cada um dos elementos químicos. Foi utilizada voltagem de 15 kV para a determinação dos elementos químicos com número atômico abaixo de 22 e de 50 kV para os demais elementos químicos (Tabela 4).

Figura 10 – Equipamento de fluorescência de raios-X por energia dispersiva – EDXRF



Fonte: A Autora.

Tabela 4 – Características para determinação de elementos químicos por EDXRF. Analitos ordenados pelo número atômico.

Analito	Voltagem (kV)	Corrente elétrica (μA)	Energia do fotopico (keV)	Filtro*
Mg	15	300	1,25	Nenhum
P	15	300	2,01	Nenhum
Cl	15	1000	2,62	Alumínio
Mn	50	80	5,90	Titânio
Fe	50	80	6,40	Titânio
Zn	50	635	8,64	Prata
Sr	50	50	14,14	Nenhum

*A utilização de filtro reduz as possíveis interferências espectrais durante as análises.

3.5. Etapa 2 –FAAS

Realizou-se a quantificação de Cu, K, Mn, e Zn pela técnica de espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS). Todas as amostras e materiais de referência foram analisados em triplicata no equipamento VARIAN AAS 220 FS. O equipamento foi calibrado empregando-se soluções-padrão Merck (1.000 mg kg^{-1}) com frações de massa conhecidas

para cada elemento químico a ser analisado. Para a realização da análise, foram consideradas as condições analíticas da Tabela 5.

Tabela 5 – Condições analíticas para a determinação de Cu, K, Mn e Zn por FAAS.

	Cu	K	Mn	Zn
Corrente (mA)	10	10	10	4
Comprimento de onda (nm)	324,8	404,4	279,5	213,9
Diâmetro da janela (nm)	0,5	0,5	0,2	0,2
Gás combustível/Oxidante	Acetileno/ar	Acetileno/óxido nitroso	Acetileno/ar	Acetileno/ar

3.6. Análise estatística

Para a análise dos resultados obtidos, os dados foram normalizados e padronizados. Foram realizados, com auxílio dos softwares STATISTICA 10, Origin e SAS, os testes estatísticos em nível de 95% de confiança:

a) Qualidade do procedimento analítico

- O Número E_n (Equação 1) foi empregado para a avaliação da qualidade do procedimento analítico para os materiais de referência certificados analisados por EDXRF e FAAS (ISO 13528, 2005).

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

em que,

X_{obs} = valor obtido na análise da amostra

X_{ref} = valor certificado ou de referência

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

U_{ref} = Incertezas analíticas expandidas da amostra em nível de confiança de 95% do valor certificado ou de referência

b) Aplicabilidade das técnicas

- Regressão linear

- c) Variabilidade dos dados de fração de massa para a espécie *L. angulifera* em Rio Formoso
 - Análise de variância (requisitos: homocedasticidade de variâncias e normalidade dos resíduos), seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey.
- d) Comparação entre as espécies
 - Teste t para médias independentes (variâncias desiguais)
- e) Correlação entre elementos químicos
 - Matriz de correlação de Pearson
- f) Biomonitoração de elementos químicos essenciais e traço associado
 - Análise multivariada utilizando análise fatorial por componentes principais e análise de agrupamento (dendrograma)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Qualidade dos procedimentos analíticos

A qualidade dos procedimentos analíticos foi baseada principalmente na análise de materiais de referências certificados (SRM), sendo as incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança obtidas a partir da combinação de incertezas individuais relacionadas com a precisão e exatidão dos resultados dos materiais de referência certificados para os resultados de EDXRF e FAAS. Valores informativos também foram utilizados nos cálculos de Número E_n conforme os certificados de análise dos materiais de referência.

4.1.1. EDXRF

Na tabela 6, pode-se observar os valores de E_m para os materiais de referência certificados, SRM 2976 *Mussel tissue* e SRM 1547 *Peach leaves*, cujos valores das frações de massa obtidos, valores de referência e informativos constantes nos certificados de análise e números E_n calculados estão apresentados. Pode-se observar que os valores do número E_n obtidos para os elementos químicos quantificados nos materiais de referência analisados estiveram no intervalo entre -1 e 1, faixa considerada adequada conforme a recomendação ISO 13528 (2005).

De acordo com os dados, a qualidade do procedimento analítico foi adequada para a determinação de Cl, Fe, Mg, Mn, P, Sr e Zn em amostras de moluscos por EDXRF. Pode-se afirmar também que houve uma tendência das frações de massa obtidas por EDXRF serem superiores às determinadas por FAAS. Exceções foram observadas para Cl e Mg no SRM 2976 e Mn e P no SRM 1547 (Tabela 6). Isto está provavelmente relacionado com as diferentes curvas de calibração utilizadas nas análises (SOUSA et al., 2013). Vale ressaltar que EDXRF é uma técnica muito dependente da matriz, ressaltando-se ainda mais a necessidade de demonstração da qualidade do procedimento analítico, pois os materiais de referência empregados na construção da curva de calibração foram tecidos de animais e folhas de plantas, ou seja, de matrizes ambientais diversas (SOUSA et al., 2013).

Tabela 6 – Valores obtidos e certificados (mg kg^{-1}) e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para os materiais de referência SRM 2976 Mussel tissue e SRM 1547 Peach leaves analisado por EDXRF.

SRM 2976					
Analito	Valor obtido		Valor certificado		E_n
	Média	Incerteza	Média	Incerteza	
Cl*	56000	\pm 400	57000	\pm 5000	-0,2
Fe	190	\pm 12	171	\pm 4,9	0,5
Mg*	4700	\pm 670	5300	\pm 500	-0,3
P**	8900	\pm 110	8300		-
Sr*	104	\pm 6	93	\pm 2	0,7
Zn	150	\pm 8	137	\pm 13	0,6
SRM 1547					
Analito	Valor obtido		Valor certificado		E_m
	Média	Incerteza	Média	Incerteza	
Ca	16000	\pm 140	15600	\pm 200	0,1
Mg	4500	\pm 520	4320	\pm 80	0,1
Mn	96	\pm 14	98	\pm 3	-0,1
P	1250	\pm 60	1370	\pm 70	-0,3

O número E_n (adimensional) foi obtido a partir das diferenças entre os valores obtidos e certificados divididos pela soma quadrática das respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança. *Valores de referência. ** Valor informativo

Apesar da comprovação da qualidade da técnica EDXRF pelo cálculo do número E_n , devem-se levar em consideração as incertezas analíticas calculadas. Os valores de referência são valores parcialmente certificados que representam as melhores estimativas do valor real. No entanto, estes valores não satisfazem os critérios para a certificação do NIST e são fornecidos com incertezas associadas que podem refletir apenas a precisão de medição, não incluir todas as fontes de incerteza ou refletir uma falta de concordância estatística suficiente entre vários métodos analíticos. Comparando estes valores, a estimativa de incerteza analítica da fração de massa de Cl ficou abaixo daquela constante no certificado de análise do SRM 2976 (Tabela 6), indicando a dificuldade da determinação do elemento químico por outras técnicas analíticas empregadas na certificação do material de referência.

4.1.2. FAAS

Para a técnica de FAAS, foi empregado o material de referência SRM 2976, cujos valores das frações de massa obtidos, valores de referência nos certificados de análise e números E_n calculados estão apresentados na Tabela 6. Ao considerar o tratamento químico das amostras para a análise por FAAS, foi empregado apenas o material SRM 2976 para a garantia da qualidade do procedimento analítico. Todos estes valores também encontram-se no intervalo entre -1 e 1 (Tabela 7), faixa considerada adequada conforme a recomendação

ISO 13528 (2005), o que permite afirmar a qualidade do procedimento analítico para a determinação de Cu, K, Mn e Zn em amostras de moluscos por FAAS.

Tabela 7 – Frações de massa dos valores obtidos e certificados (mg kg^{-1}) e suas respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança para o material de referência SRM 2976 Mussel tissue analisado por FAAS.

Analito	Valor obtido		Valor certificado		Número E_n *
	Média	Incerteza	Média	Incerteza	
Cu	4,1	\pm 0,2	4,02	\pm 0,33	0,7
K*	9700	\pm 980	9700	\pm 500	0,0
Mn*	36	\pm 4	33	\pm 2	0,6
Zn	130	\pm 7	137	\pm 13	-0,5

O número E_n , unidade adimensional, foi obtido a partir das diferenças entre os valores obtidos e certificados divididos pela soma quadrática das respectivas incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança. *Valores de referência.

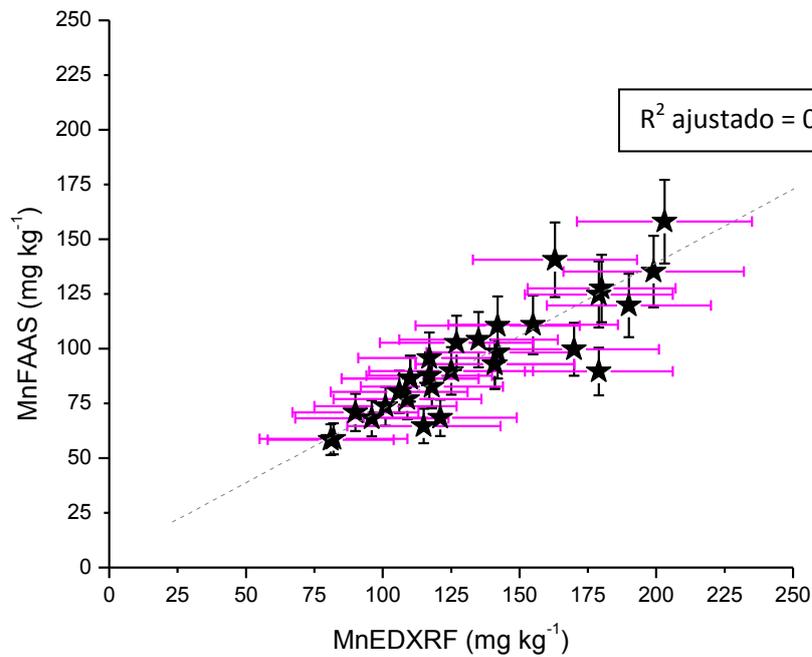
A técnica analítica FAAS teve sua qualidade do procedimento analítico comprovada mesmo para K e Mn, cujo certificado de análise somente indica valores de referência, ou seja, parcialmente certificados.

4.2. Aplicabilidade das técnicas analíticas

Os elementos químicos Mn e Zn foram analisados tanto por EDXRF quanto por FAAS, possibilitando a comparação dos resultados de fração de massa entre essas duas técnicas.

A incongruência entre os resultados de Mn para os moluscos determinados por FAAS e EDXRF está ilustrada na Figura 11, em que foram plotados apenas as frações de massa, cujas as respectivas incertezas analíticas expandidas foram menores que 40%. As incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança foram menores para os resultados de FAAS. Houve uma clara tendência do EDXRF produzir resultados com valores maiores indicados pelo ângulo de inclinação menor que 45° , referente à projeção da reta tracejada. Como não se detectou tal tendência para os valores dos materiais de referência, assumiu-se que essa tendência dos resultados das análises de EDXRF para Mn estejam relacionadas a algum tipo de interferência da matriz e da preparação das amostras (tamanho de partículas) (POUZAR et al., 2001). Importante ressaltar que o tamanho máximo das partículas das amostras (0,5 mm) é maior que aquele dos materiais de referência (0,18 mm). Somado ao efeito da matriz, o elemento químico Fe pode ter afetado os resultados de Mn devido às interferências espectrais.

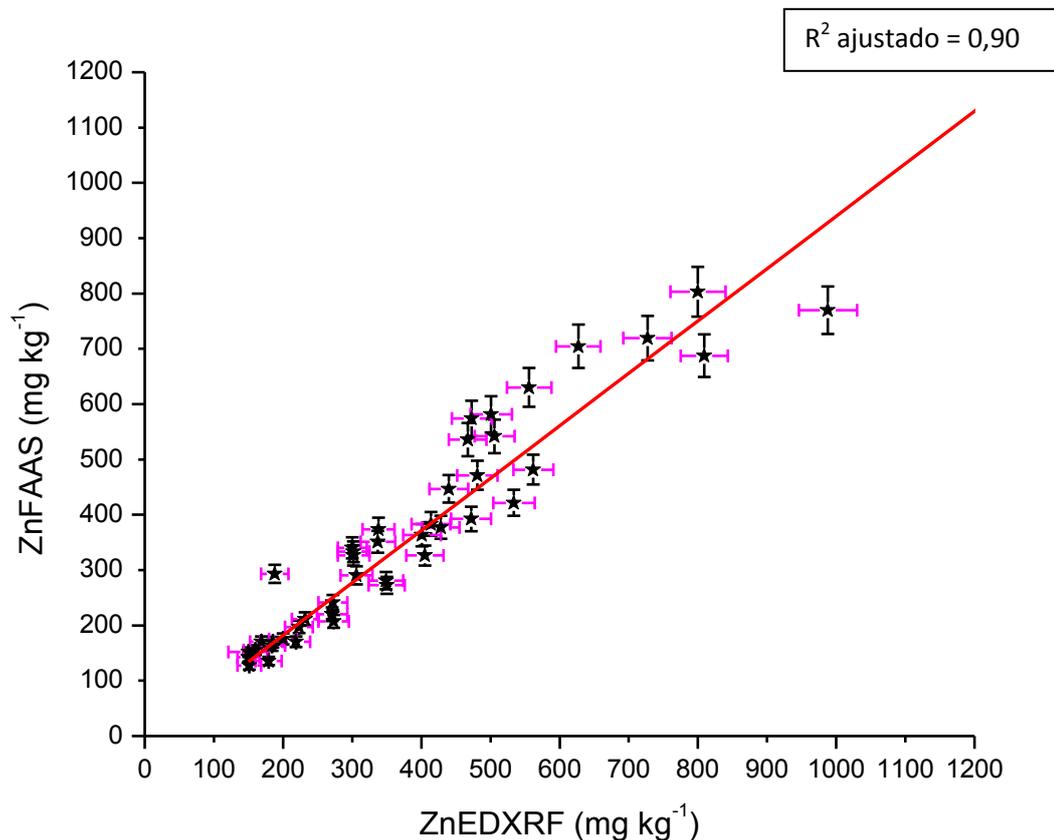
Figura 11 – Incongruência das frações de massa* de Mn em moluscos analisados por EDXRF e FAAS.



*Barras de erro horizontais e verticais equivalem, respectivamente, às incertezas analíticas expandidas para EDXRF e FAAS em nível de 95% de confiança.

A Figura 12 mostra os resultados de EDXRF e FAAS desmembrados para frações de massa abaixo de 1000 mg kg^{-1} de Zn e a Figura 13, a determinação de altas frações de massa de Zn para a comparação das técnicas em moluscos. Diferentemente de Mn, os resultados da regressão indicam, em nível de 95% de confiança, a equivalência entre os resultados produzidos pelas técnicas. Quanto maior a proximidade dos pontos à reta, maior a equivalência entre os resultados obtidos por EDXRF e FAAS, respeitando-se a inclinação da reta de 45° .

Figura 12 – Resultados obtidos das frações de massa* de Zn inferiores a 1.000 mg kg⁻¹ em moluscos analisados por EDXRF e FAAS.

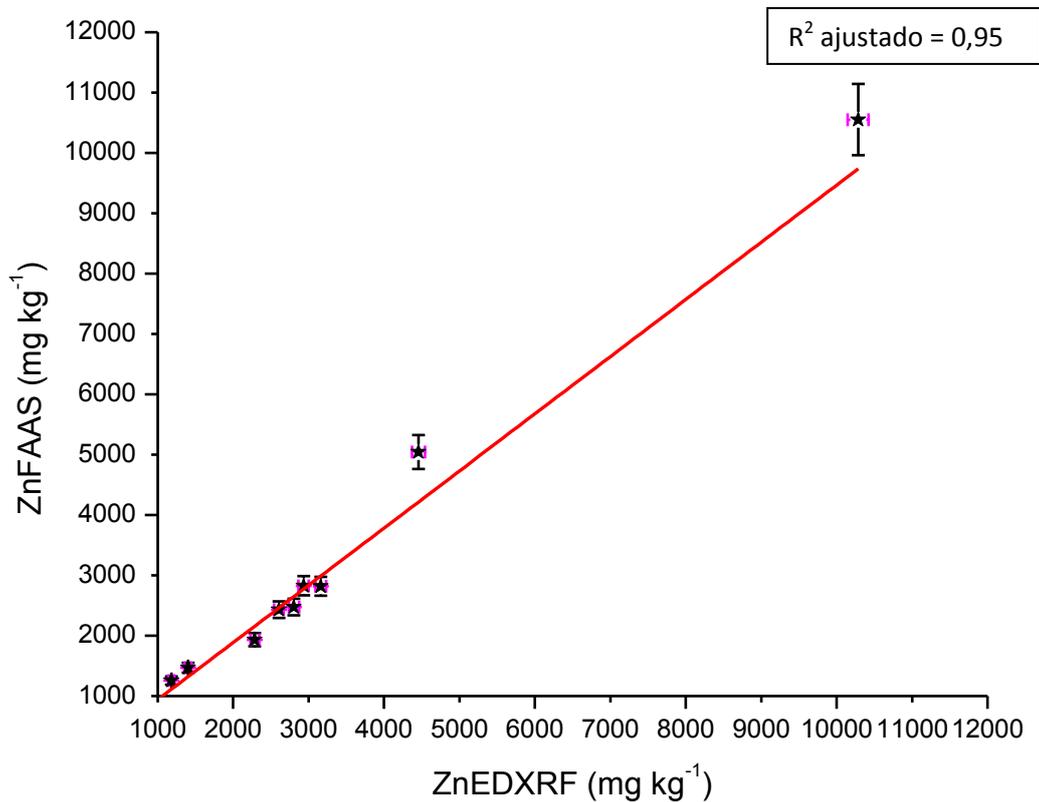


*Barras de erro horizontais e verticais equivalem, respectivamente, às incertezas analíticas expandidas para EDXRF e FAAS em nível de 95% de confiança.

Cadore et al. (2008) verificaram que a EDXRF permitiu a quantificação rápida e adequada de alguns elementos químicos. Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, Singh e Agrawal (2012) utilizaram EDXRF, AAS e difração de raios-X (XRD) para determinar a análise mineral de solos e obteve equivalência entre os resultados de EDXRF e AAS para os elementos químicos quantificados em seu estudo, entretanto, não especificaram o tipo de atomização da AAS utilizada.

De acordo com os resultados obtidos pela avaliação da qualidade do procedimento analítico, optou-se por resultados analíticos menos tendenciosos, ou seja, aqueles obtidos por FAAS para Mn. Para a discussão dos resultados de Zn, optou-se pelos resultados de EDXRF, por possibilitar menores incertezas expandidas em nível de 95% de confiança.

Figura 13 – Resultados obtidos das frações de massa de Zn superiores a 1.000 mg kg⁻¹ em moluscos analisados por EDXRF e FAAS.



Barras de erro horizontais e verticais equivalem, respectivamente, às incertezas analíticas expandidas para EDXRF e FAAS em nível de 95% de confiança.

4.3. Variabilidade dos dados de fração de massa para a espécie *Littoraria angulifera* em Rio Formoso

A estatística descritiva das frações de massa dos elementos químicos determinados para esta espécie nas unidades amostrais 1A, 1B e 1C, localizadas no município de Rio Formoso, pode ser observada na Tabela 7. Os resultados foram individualizados de acordo com o local de coleta com o intuito de mostrar as diferenças químicas entre as três unidades amostrais estudadas.

Tabela 8 – Estatística descritiva para as médias das frações de massa dos elementos químicos (mg kg^{-1}), desvio padrão (DP), valores mínimos e máximos obtidos nas unidades amostrais do município de Rio Formoso (unidades amostrais 1A, 1B e 1C).

Unidade amostral		Cl	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Sr	Zn
1A	Média	18040	35,8	4300	10603	13060	137	5830	169	192
	DP	1900	6,0	1560	853	2300	34	380	31	40
	Max	21600	50,7	6560	12048	17200	203	6300	215	271
	Min	16100	30,2	2130	9691	10700	101	5200	125	150
1B	Média	19250	36,8	2774	9646	13000	101	6300	212	323
	DP	3510	5,9	1370	733	2600	27	573	76	91
	Max	25200	49,4	4820	10613	16200	142	7100	319	428
	Min	13700	30,1	1200	8495	8800	64	5200	102	160
1C	Média	18360	48,3	2822	9869	10320	154	6240	177	400
	DP	2030	8,8	794	320	2620	31	654	44	98
	Max	21000	60,2	3650	10396	14900	179	7400	242	534
	Min	15600	39,2	1530	9625	8600	109	5900	144	306

O delineamento amostral no manguezal de Rio Formoso (Figura 8) permitiu testar a variabilidade das frações de massa de *L. Angulifera* com relação às unidades amostrais provenientes de Rio Formoso (pontos 1A, 1B e 1C). Com este propósito, foi realizada a análise de variância – ANOVA (Tabela 8). Para hipótese nula considerou-se a igualdade das médias dos elementos químicos para os locais de coleta. Para atender aos requisitos da análise, alguns dados foram transformados para garantir homocedasticidade de variâncias e normalidade dos resíduos (Tabela 8). Também são apresentados os resultados do teste de comparações múltiplas de Tukey para os resultados significativos em nível de 95% de confiança da ANOVA. Há indícios estatísticos de que as médias diferiram estatisticamente em nível de 95% de confiança para Cu, P, Sr e Zn, demonstrando a variabilidade ambiental para esses elementos químicos. Os locais de coleta encontram-se afastados, contudo foi observada certa homogeneidade da distribuição de elementos químicos com exceção do local com atividades de recreação (1B). A existência de pontos de recreação (turismo) na unidade amostral 1B e a proximidade da rodovia da unidade amostral 1C podem justificar a diferença entre as médias destes locais. Para Zn, a variabilidade ambiental foi considerada significativa, uma vez que todas as médias foram diferentes em nível de 95% de confiança. Resultados semelhantes foram encontrados para Mn, em que caracóis de locais apresentando variações nas frações de massa deste elemento químico no solo acumularam consideráveis frações de massa de Mn nos seus tecidos (BORDEAN et al., 2014). Vale ressaltar que a transferência de Mn ocorreu diretamente do solo, ou seja, independentemente da ingestão de alimentos

contaminados com este elemento químico (BORDEAN et al., 2014). Com isso, reforçou-se, mais ainda, a utilização de caracóis em estudos de avaliação de qualidade ambiental devido à grande sensibilidade na detecção de impactos (LIU, 2013; PANG et al., 2013).

Tabela 9 – Análise de variância para os resultados de Rio Formoso.

Analito	C. V.	GL	Transformação dos dados	F	Pr>F	Local	Média*
Cl	Local	2	log	0,383	0,6838	1A	4,25 ^a
						1B	4,28 ^a
						1C	4,26 ^a
Cu	Local	2	log	6,434	0,0064	1A	1,55 ^a
						1B	1,56 ^a
						1C	1,68 ^b
Fe	Local	2	log	3,561	0,0458	1A	3,61 ^a
						1B	3,39 ^b
						1C	3,43 ^{ab}
K	Local	2	-	4,510	0,0228	1A	10600 ^a
						1B	9650 ^b
						1C	9870 ^b
Mg	Local	2	-	2,408	0,1133	1A	13060 ^a
						1B	13000 ^a
						1C	10320 ^a
Mn	Local	2	log	8,683	0,0017	1A	2,03 ^a
						1B	1,82 ^b
						1C	1,99 ^a
P	Local	2	-	2,260	0,1281	1A	5830 ^a
						1B	6300 ^a
						1C	6240 ^a
Sr	Local	2	log	0,900	0,4217	1A	2,23 ^a
						1B	2,30 ^a
						1C	2,24 ^a
Zn	Local	2	log	15,72	0,001	1A	2,28 ^a
						1B	2,49 ^b
						1C	2,59 ^c

C.V.: causas de variação; GL: grau de liberdade; F: valor da estatística F de Fisher; Pr>F: Probabilidade de obter valor maior que F. Letras diferentes indicam diferença entre as médias das localidades para cada elemento químico. *Médias foram apresentadas para os dados transformados.

4.4. Comparação entre espécies de moluscos terrestres de manguezais

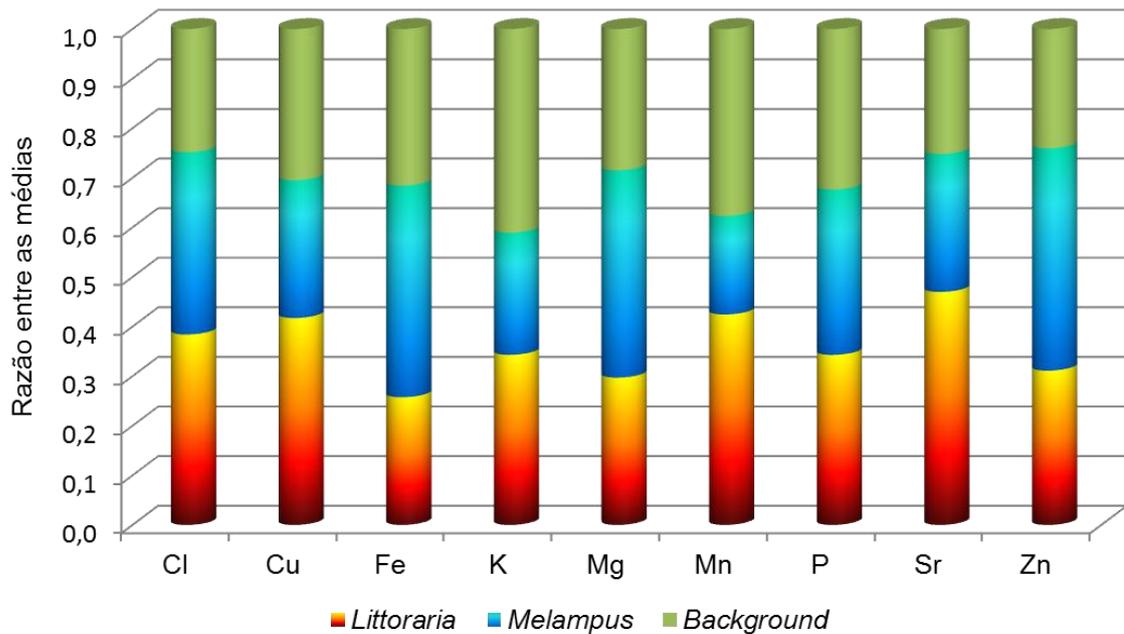
O estudo para a comparação entre as espécies *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* foi realizada em Maracaípe. Os dados de fração de massa dos elementos químicos apresentados na Tabela 9 comparam as frações de massa obtidas em amostras coletadas na mesma região para *L. angulifera* e *M. coffea*.

Tabela 10 – Comparação entre as frações de massa de elementos químicos (mg kg⁻¹) para *L. angulifera* e *M. coffea* de Maracaípe

Estadística descritiva	Cl	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Sr	Zn
<i>L. angulifera</i>									
Média	28740	53	2776	8400	13020	104	6460	351	370
Desvio padrão	1310	5	742	545	1520	36	513	64	78
Mínimo	26600	46	1670	7520	11400	64	5900	274	302
Máximo	30000	60	3590	8880	15100	163	7200	422	467
<i>M. coffea</i>									
Média	27500	35	4600	6050	18320	48	6280	208	533
Desvio padrão	3050	6	631	354	2220	5	427	31	61
Mínimo	24200	28	3780	5640	16900	42	5700	154	473
Máximo	32500	42	5500	6510	22200	53	6900	227	627

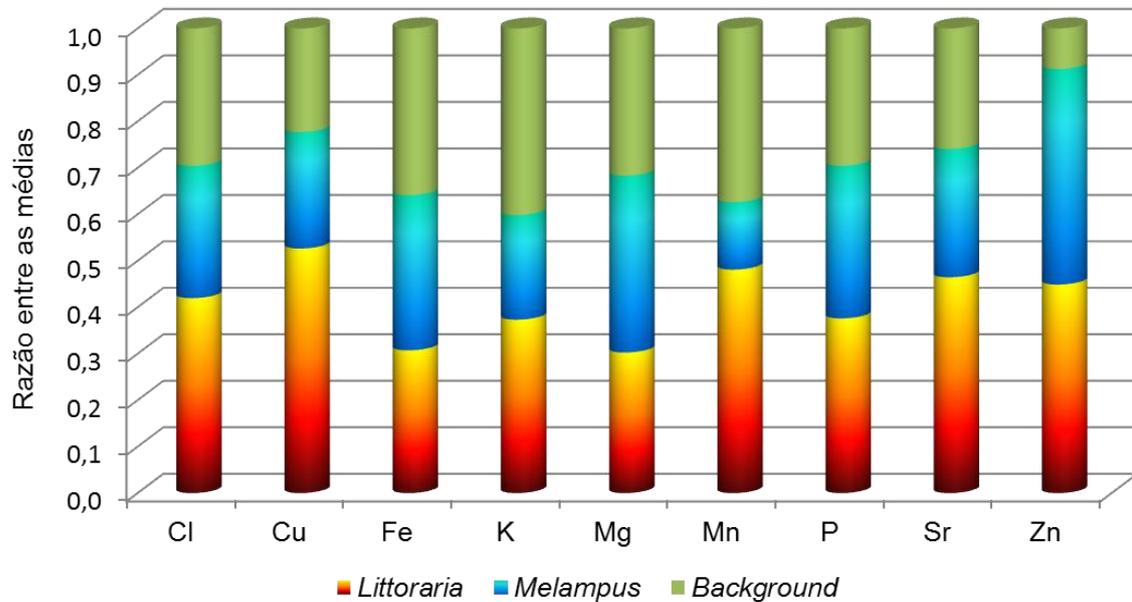
A Figura 14 mostra a distribuição dos resultados por meio de gráfico do tipo *fingerprint* para as frações de massa de elementos químicos nas espécies de moluscos *L. angulifera* e *M. coffea*. Em Maracaípe, a amostragem de ambas as espécies foi realizada sob as mesmas condições (unidade amostral 4G), o que possibilitou uma melhor comparação da capacidade de acumulação dos elementos químicos estudados para as espécies de moluscos *L. angulifera* e *M. coffea*. Com os resultados da Figura 14, foi observado que ambas as espécies acumularam igualmente Cl e P. A espécie *L. angulifera* apresentou maior capacidade de acumulação para Cu, K, Mn e Sr. Já a espécie *M. coffea* mostrou maior potencial de acumulação para Fe, Mg e Zn.

Figura 14 – Comparação da composição química elementar de *Melampus coffea* e *Littoraria angulifera* para os indivíduos de Maracaípe



A fim de complementar a análise dos dados expostos na Figura 14, outro gráfico do tipo *fingerprint* foi elaborado, em que foram consideradas as amostras provenientes de todas as unidades amostrais em que se realizou a amostragem das duas espécies de moluscos, ou seja, Parque Memorial Arcoverde, Itamaracá e Maracaípe (Figura 15). Corroborando os dados da Figura 14, pode-se afirmar que a espécie *L. angulifera* respondeu mais à disponibilidade de elementos químicos. Esta capacidade de acumulação de ambas as espécies são características relevantes na determinação de espécies biomonitoras da qualidade ambiental.

Figura 15 – Comparação da composição de elementos químicos de *Melampus coffea* e *Littoraria angulifera* em Maracaípe, Itamaracá e Parque Memorial Arcoverde.



Urbano de Araújo et al. (2010) determinaram as frações de massa de quinze elementos químicos de importância toxicológica em moluscos bivalves da espécie *Anadara notabilis* oriundos do Rio Grande do Norte. Entre os metais estudados, Cu, Mn, Sr e Zn, que também foram quantificados neste trabalho, apresentaram-se em frações de massa seca 27,45 mg kg⁻¹, 7,31 mg kg⁻¹, 19,91 mg kg⁻¹ e 59,16 mg kg⁻¹ respectivamente, valores inferiores aos obtidas pelas espécies *L. angulifera* e *M. coffea*. Já Emereciano et al. (2009) determinaram elementos químicos no molusco *Anomalocardia brasiliiana* e obtiveram frações de massa de 8,5 mg kg⁻¹ de Cu e 7,28 mg kg⁻¹ de Zn, resultados consideravelmente inferiores às frações de massa obtidas nas espécies *L. angulifera* e *M. coffea*.

Com base nos dados analisados, pode-se afirmar que, de modo geral, os moluscos da espécie *L. angulifera* apresentaram maior capacidade de acumulação de diversos elementos químicos, simultaneamente. Sendo assim, foi conveniente estudar as correlações entre os elementos químicos nos tecidos dos moluscos.

4.5. Correlação entre elementos químicos

A fim de avaliar as correlações entre os elementos químicos determinados nos tecidos dos moluscos terrestres, foram obtidas matrizes de correlação de Pearson para *L. angulifera* (Tabela 10) e para *M. coffea* (Tabela 11). A análise bivariada demonstrou correlações

significativas, destacadas em vermelho. Altas correlações ($r > 0,8$) foram observadas para Cl, Mg e Mn em *M. coffea*, enquanto Fe, Cu, P e Zn foram altamente correlacionados em *L. angulifera*. Os resultados ressaltam, em nível de 95% de confiança, a composição de elementos químicos obtidos anteriormente nas Figuras 14 e 15, em que as espécies claramente são diferenciadas quanto à acumulação dos elementos químicos avaliados.

Tabela 11 – Matriz de correlação* de Pearson das frações de massa de elementos químicos determinados em *Littoraria angulifera* de todos os locais.

	Cl	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Sr	Zn
Cl	1,00								
Cu	-0,60	1,00							
Fe	0,65	-0,16	1,00						
K	0,34	-0,37	0,07	1,00					
Mg	0,84	-0,31	0,65	0,61	1,00				
Mn	0,90	-0,44	0,79	0,25	0,77	1,00			
P	-0,58	0,67	-0,30	0,26	-0,15	-0,45	1,00		
Sr	-0,02	0,19	0,21	-0,19	-0,09	0,08	-0,25	1,00	
Zn	-0,91	0,79	-0,51	-0,29	-0,68	-0,75	0,78	-0,03	1,00

*Valores destacados indicam correlações significativas em nível de 95% de confiança.

Há evidências da correlação significativas em nível de 95% de confiança entre os elementos químicos em todos os locais. Para a espécie *Littoraria angulifera* (Tabela 10) as correlações mais relevantes foram entre Cu e Zn (com valor $P = 0,79$), Mn e Fe ($P = 0,79$), Mg e Cl ($P = 0,84$), Mn e Cl ($P = 0,90$) e Zn e Cl ($P = -0,91$). Para a espécie *Melampus coffea* (Tabela 11), as correlações significantes em nível de 95% de confiança ocorreram para Cl e Cu ($P = -0,85$), Cl e Fe ($P = -0,8$), P e Cl ($P = -0,82$), Cu e P ($P = 0,89$), Zn e Cu ($P = 0,90$), K e Mn ($P = 0,89$) e P e Zn ($P = 0,97$).

Tabela 12 - Matriz de correlação de Pearson das frações de massa de elementos químicos determinados em *Melampus coffea* do Parque Memorial Arcoverde, Forte Orange e Maracaípe (unidades amostrais 2D, 3E e 4G).

	Cl	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Sr	Zn
Cl	1,00								
Cu	-0,85	1,00							
Fe	-0,80	0,81	1,00						
K	0,13	0,16	-0,02	1,00					
Mg	0,75	-0,68	-0,49	0,34	1,00				
Mn	0,48	-0,22	-0,37	0,89	0,60	1,00			
P	-0,82	0,89	0,70	0,09	-0,63	-0,25	1,00		
Sr	0,52	-0,41	-0,48	-0,21	0,40	0,11	-0,43	1,00	
Zn	-0,79	0,90	0,76	0,05	-0,67	-0,28	0,97	-0,46	1,00

*Valores destacados indicam correlações significativas em nível de 95% de confiança.

A avaliação da correlação entre os elementos químicos possibilitou a escolha da espécie utilizada na biomonitoração dos manguezais estudados. Como *L. angulifera* apresentou maior acumulação de elementos químicos e as correlações significativas foram mais facilmente interpretadas, foi a espécie utilizada no estudo de biomonitoração passiva da Costa Pernambucana.

4.6. Biomonitoração de elementos químicos essenciais e traço associado

As médias das frações de massa dos elementos químicos nas amostras de *Littoraria angulifera* para todos os manguezais estudados estão apresentados na Tabela 12. Com os resultados, destacaram-se os valores de Cl, cuja menor fração de massa deste elemento químico foi obtida nas amostras da área 2D (14.650 mg kg⁻¹) e o nível mais elevado encontrado na área 4F (30.900 mg kg⁻¹). Já os elementos químicos Mg e Mn tiveram as menores frações de massa médias na área 2D (Mg: 8.050 mg kg⁻¹, Mn: 50 mg kg⁻¹) e níveis mais elevados detectados na área 4F (Mg: 15.250 mg kg⁻¹, Mn: 225 mg kg⁻¹).

Foram encontradas as menores frações de massa de Fe nas amostras coletadas em Itamaracá, cuja fração de massa média foi aproximadamente 1.020 mg kg⁻¹. A maior fração de massa de P obtida foi 12.950 mg kg⁻¹ no Parque Memorial Arcoverde e a menor foi 5.830 mg kg⁻¹ em Rio Formoso. A acumulação de Zn e Cu foi tão expressiva que foi discutida separadamente no item 4.7.

Uma unidade amostral apresentou valores muito discrepantes das demais unidades amostrais, com redução das frações de massa de Cl, Mg e Mn e elevação dos valores obtidos para Cu, Fe, P e Zn. Essa unidade amostral representou o Parque Memorial Arcoverde, cuja

influência de impacto antrópico foi maior devido à sua localização na Região Metropolitana do Recife.

Tabela 13 – Frações de massa obtidas (mg kg⁻¹) por FAAS e EDXRF em moluscos da espécie *Littoraria angulifera* para todos os manguezais estudados.

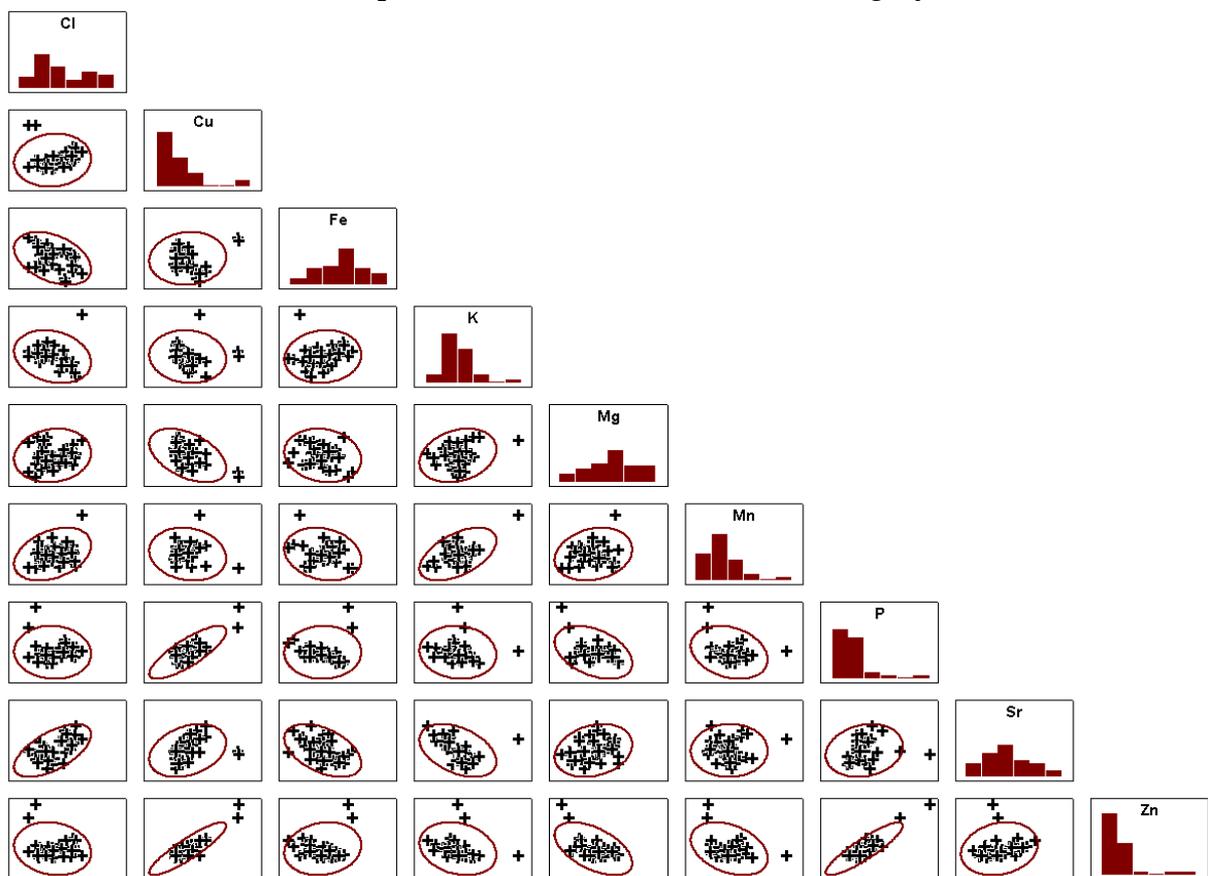
Área		Cl	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Sr	Zn
1A	Média	18040	35,8	4320	10603	13060	137	5830	169	192
	DP	1907	6,0	1560	853	2290	34	380	31	40
	Max	21600	50,7	6560	12048	17200	203	6300	215	271
	Min	16100	30,2	2130	9691	10700	101	5200	125	150
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
1B	Média	19250	36,8	2770	9646	13000	101	6300	212	323
	DP	3509	5,9	1370	733	2570	27	573	76	91
	Max	25200	49,4	4820	10613	16200	142	7100	319	428
	Min	13700	30,1	1200	8495	8800	64	5200	102	160
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
1C	Média	18360	48,3	2820	9870	10320	154	6240	177	400
	DP	2033	8,8	794	320	2620	31	654	44	98
	Max	21000	60,2	3650	10396	14900	179	7400	242	534
	Min	15600	39,2	1530	9625	8600	109	5900	144	306
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2D	Média	14650	256,5	8520	10089	8050	49	12950	200	7371
	DP	1344	2,9	1020	575	636	12	3320	21	4121
	Max	15600	258,6	9240	10495	8500	57	15300	214	10285
	Min	13700	254,5	7800	9682	7600	40	10600	185	4457
	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3E	Média	26940	77,8	1038	8480	11060	136	7460	395	728
	DP	2880	16,0	457	1030	1506	67	658	147	205
	Max	30500	94,8	1650	9365	12800	199	8400	590	988
	Min	23500	57,3	520	7053	9800	61	6700	202	481
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
4F	Média	30900	56,3	2340	13220	15250	224	6600	294	179
	DP	3960	27,4	1994	6310	1490	189	141	78	13
	Max	33700	75,7	3750	17686	16300	357	6700	349	188
	Min	28100	37,0	930	8760	14200	90	6500	238	169
	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4G	Média	28740	52,9	2776	8414	13020	127	6460	351	370
	DP	1310	5,1	742	545	1520	54	513	64	78
	Max	30000	60,1	3590	8882	15100	216	7200	422	467
	Min	26600	45,9	1670	7521	11400	71	5900	274	302
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

DP = desvio padrão. Max = máxima fração de massa. Min = mínima fração de massa.
N = número de amostras.

Para a análise estatística, os dados referentes à Tabela 12 foram transformados e padronizados para a construção da matriz de gráficos de dispersão para os dados de frações de massa de elementos químicos determinados em moluscos da espécie *L. angulifera* nos manguezais estudados (Figura 16). A Figura 16 permite ainda inferir a normalidade

multivariada devido à propriedade de distribuições marginais bivariadas, necessária para aplicação das análises multivariadas subsequentes. Pelas elipses de predição e nível de 95% de confiança dos gráficos de dispersão, a normalidade bivariada entre os elementos químicos pôde ser avaliada. Quanto mais achatadas e inclinadas as elipses, maiores são as correlações entre os elementos químicos. Nota-se claramente a presença de pontos fora de controle e a possível formação de grupos de dados como ocorre para o gráfico entre K e Cl, por exemplo, a ser comprovada posteriormente pela análise de agrupamentos. Confirmando-se a distribuição aproximada à normalidade para 60% dos elementos químicos, foi realizada análise fatorial por componentes principais a fim de estudar possíveis fontes de elementos químicos para os moluscos.

Figura 16 – Matriz de gráficos de dispersão para os dados padronizados de fração de massa de elementos químicos determinados em *Littoraria angulifera*.



A aplicação de análise fatorial permitiu estudar as fontes de elementos químicos com relação às correlações observadas nos tecidos de *L. angulifera*. Na Tabela 13 estão apresentados os resultados da aplicação de análise fatorial por componentes principais (AFCP) nas frações de massa dos elementos químicos determinados nos moluscos. A partir da

AFCP, foi possível reduzir as nove variáveis (elementos químicos) a apenas três fatores. As correlações das variáveis com os fatores permitiu a classificação de possíveis fontes de elementos químicos. A contribuição de cada elemento químico para a variação total está representada pela comunalidade (Tabela 13), em que as variáveis menores representadas pela AFCP foram Fe e Mg.

Nesta nova organização dos dados, os valores das cargas fatoriais em destaque indicaram que o elemento químico está correlacionado ao fator. Os elementos indicadores de impacto antrópico, Cu, Mg, P e Zn, passaram a constituir o fator 1; Cl, Fe e Sr formaram o fator 2, cuja classificação determinada foi influência marinha. O fator 3 foi denominado fator de elementos essenciais por estar correlacionado com K e Mn.

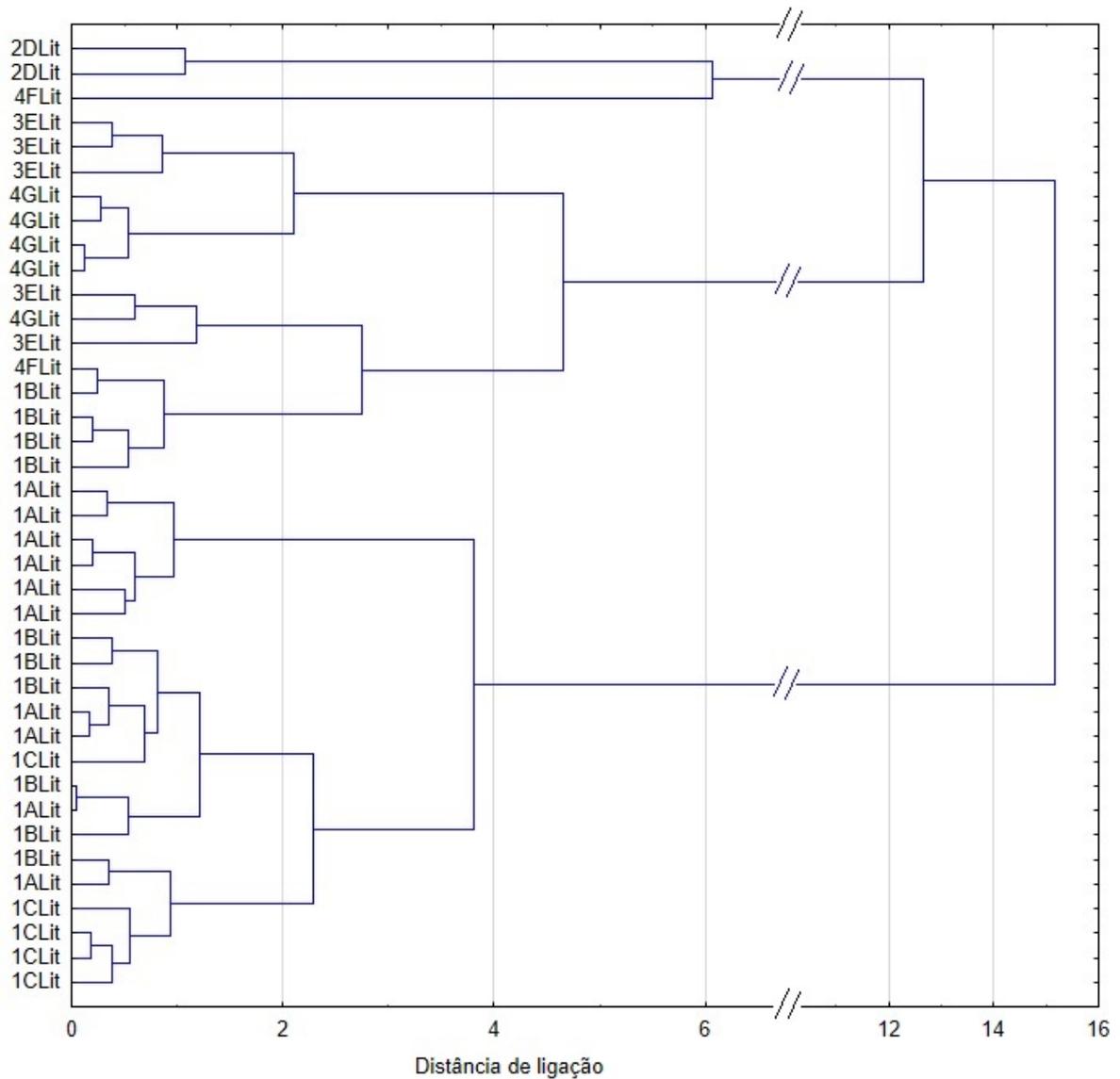
Tabela 14 – Análise fatorial por componentes principais (Rotação = Varimax) aplicada às frações de massa de elementos químicos de *L. angulifera*. Cargas fatoriais destacadas indicam as maiores correlações com as variáveis.

	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Comunalidade
Cl	-0,04	0,84	0,09	0,72
Cu	0,95	0,14	0,02	0,92
Fe	0,11	-0,70	-0,06	0,51
K	-0,07	-0,30	0,89	0,88
Mg	-0,59	0,26	0,20	0,46
Mn	-0,19	0,29	0,84	0,82
P	0,92	0,04	-0,04	0,85
Sr	0,16	0,88	-0,22	0,84
Zn	0,96	-0,04	-0,19	0,95

Comunalidade = contribuição de cada fator para a variação total observada para cada elemento químico.

Os valores dos fatores obtidos na AFCP permitiram a construção de um dendrograma (Figura 17) utilizando o método de ligação de Ward's e a medida de distância Chebychev. Ao analisar a Figura 17, observa-se mais um indicativo da aplicação de moluscos da espécie *L. angulifera* como biomonitor de qualidade ambiental. Também fica evidente a formação de grupos característicos das amostras de Rio Formoso (1A, 1B e 1C), de Maracáipe (4F e 4G), de Itamaracá (3E) e do Parque Memorial Arcoverde (2D).

Figura 17– Dendrograma baseado nos valores dos fatores de indivíduos de *Littoraria angulifera* coletados em diversos locais.



De acordo com a distribuição dos grupos estabelecidos no dendrograma (Figura 17), fica evidente a relevância do impacto ambiental na unidade amostral 2D, unidade situada na área urbana. Há também um agrupamento visível das unidades amostrais de Maracaípe, Itamaracá e Rio Formoso (1B), unidades de regiões turísticas que possuem pontos de recreação nas proximidades dos manguezais estudados. Estas ligações pelo dendrograma reforçam a utilização de *L. angulifera* para estudos de impactos ambientais.

4.7. Bioacumulação de cobre e zinco

Muito utilizados como moluscicidas (GRETILLAT, 1961; ASCH; DRESDEN, 1977; RAWI et al., 1996; RAWI et al., 2011), Cu e Zn foram os elementos químicos que apresentaram acumulação mais evidente nos tecidos dos animais avaliados. De acordo com os dados da Tabela 14, observou-se que as amostras com as maiores frações de massa de Cu e Zn nas duas espécies foram aquelas provenientes da área 2D, isto é, 260 mg kg⁻¹ de Cu e 10.600 mg kg⁻¹ de Zn para *L. angulifera* e 61 mg kg⁻¹ de Cu e 2.500 mg kg⁻¹ de Zn para *M. coffea*.

Tabela 14 – Comparação entre as frações de massa de Cu e Zn (mg kg⁻¹) determinadas em *L. angulifera* e *M. coffea* de diversos manguezais do Estado de Pernambuco.

Área*	Estatística descritiva	<i>L. angulifera</i>		<i>M. coffea</i>	
		Cu (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
2D	Média	-	-	61	2500
	DP	-	-	12	370
	Max	260	10600	73	2800
	Min	250	5000	46	1900
	N	2	2	5	5
3E	Média	59	640	28	1100
	DP	29	160	4	390
	Max	95	800	31	1500
	Min	24	470	24	720
	N	5	5	3	3
4G	Média	56	400	35	610
	DP	27	91	6	63
	Max	60	540	42	710
	Min	46	330	28	540
	n	5	5	5	5

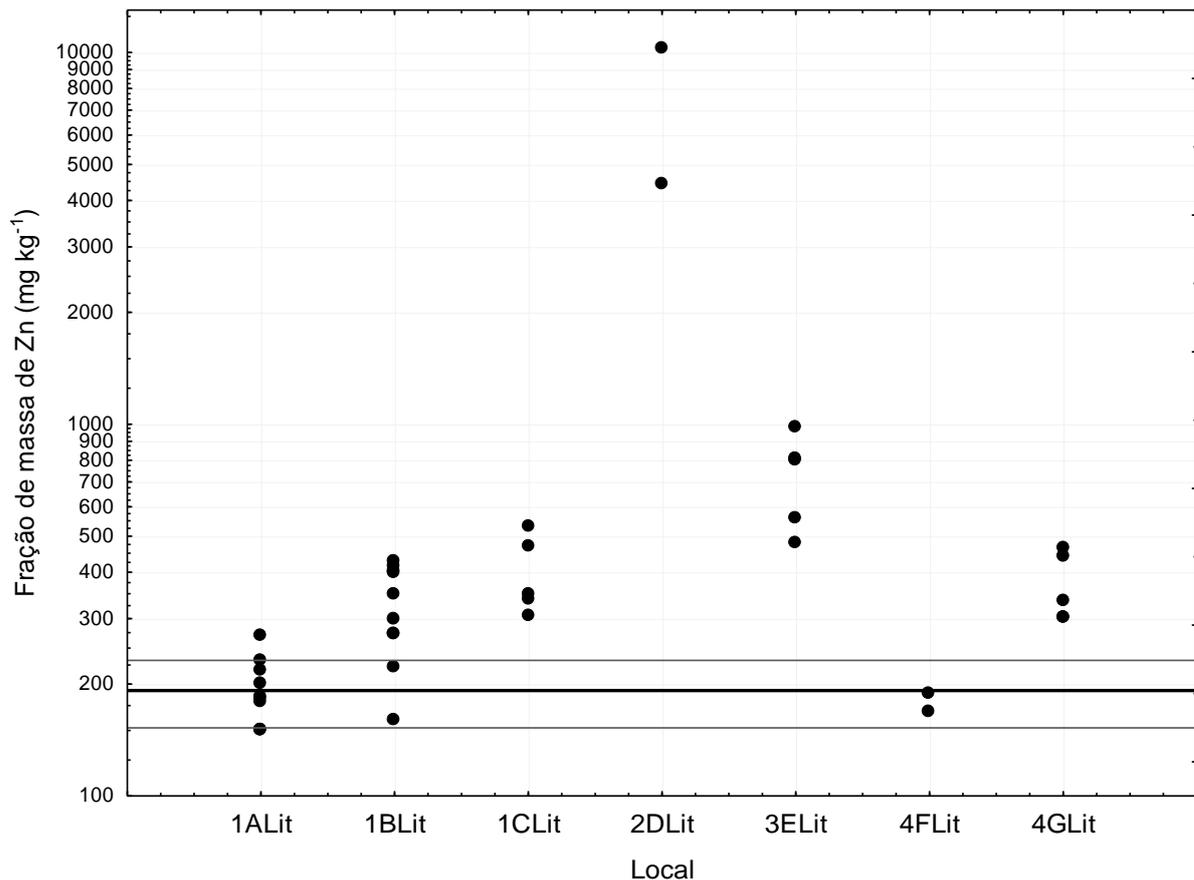
*2D = Memorial Arcoverde; 3E = Itamaracá; 4G = Maracaípe.

DP = desvio padrão; Max = máxima fração de massa; Min = mínima fração de massa.

As menores frações de massa de Cu (36 mg kg⁻¹) e Zn (167 mg kg⁻¹) para *L. angulifera* foram encontradas em Rio Formoso, enquanto que, para *M. coffea*, as frações de massa apresentaram-se menores na área 4G para Zn (610 mg kg⁻¹) e na área 3E para o Cu (28 mg kg⁻¹). Estes valores de fração de massa de Zn para a espécie *L. angulifera* são bastante superiores aos obtidos (média = 136 mg kg⁻¹) por Kang et al. (1999) para a espécie *Littorina brevicula*. Contudo, para Cu, a faixa de fração de massa obtida para *L. angulifera* foi semelhante aos resultados de *L. brevicula* utilizada como biomonitor na Baía Onsan, Coréia do Sul (KANG et al., 1999).

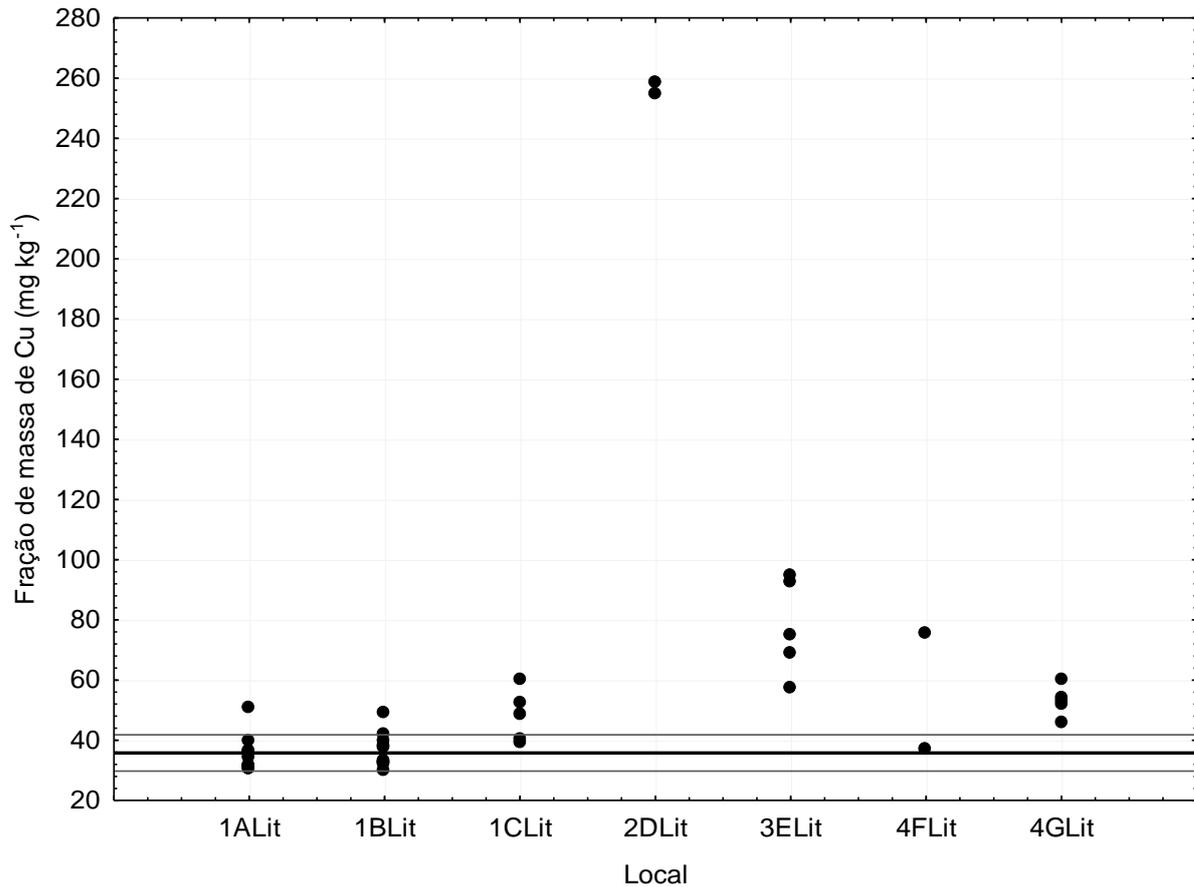
A acumulação foi tão intensa que alcançou aproximadamente 8.000% para Zn em *L. angulifera* (Figura 18) e cerca de 1.000% para Cu (Figura 19) nessa mesma espécie, comparando-se com as menores frações de massa encontradas nos manguezais. A faixa de valores indicada nos gráficos representa o intervalo de confiança em nível de 95% de confiança e a média para o local considerado como *background*, ou seja, a região de menor influência antrópica.

Figura 18 – Comparação entre as frações de massa de Zn (mg kg^{-1}) determinadas em todas as localidades estudadas* para moluscos da espécie *Littoraria angulifera*.



*1(A,B,C) = Rio Formoso; 2(D) = Memorial Arcoverde; 3(E) = Itamaracá; 4(F,G) = Maracaípe.
A faixa de valores indicadas nos gráficos representa o intervalo de confiança em nível de 95% de confiança e a média para o local considerado como *background*.

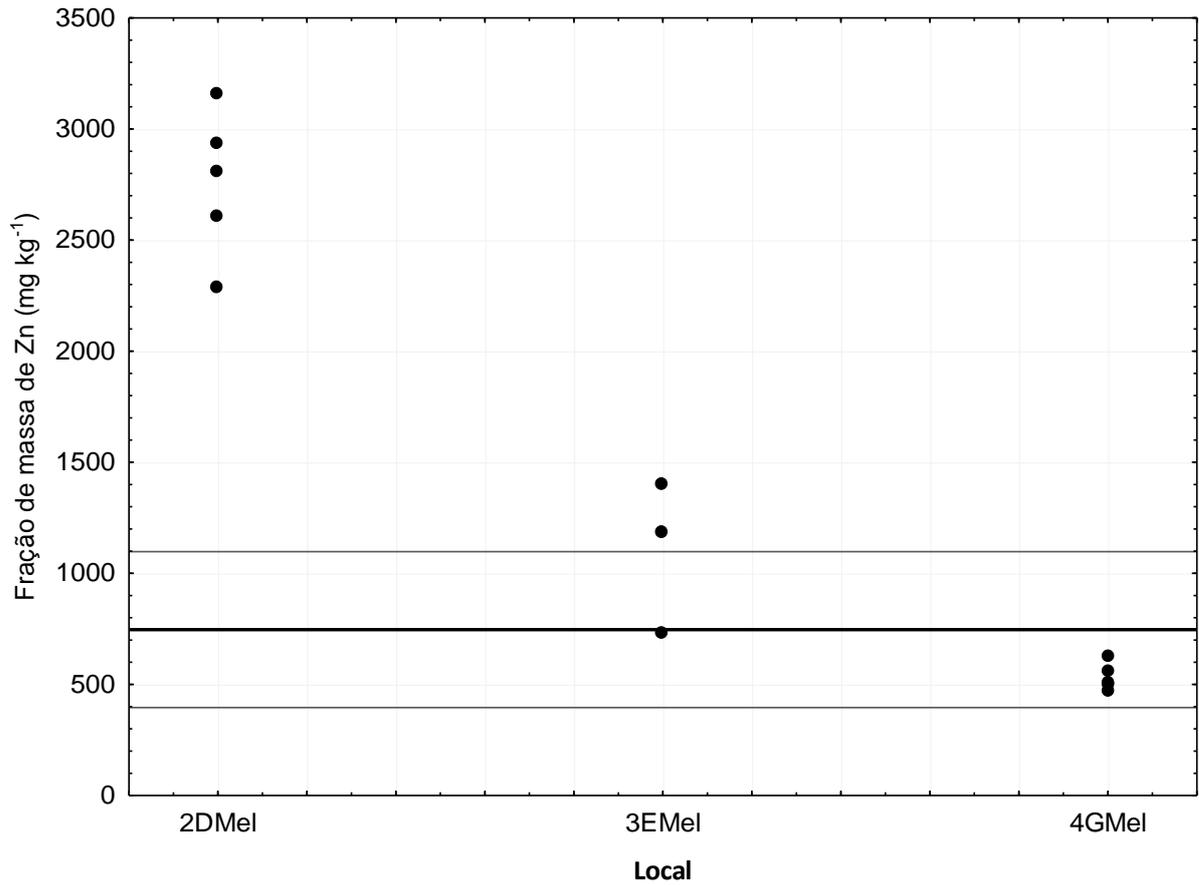
Figura 19 – Comparação entre as frações de massa de Cu (mg kg^{-1}) determinadas em todas as áreas estudadas* para moluscos da espécie *Littoraria angulifera*.



*1(A,B,C) = Rio Formoso; 2(D) = Memorial Arcoverde; 3(E) = Itamaracá; 4(F,G) = Maracaípe. A faixa de valores indicadas nos gráficos representa o intervalo de confiança em nível de 95% de confiança e a média para o local considerado como *background*.

Apesar de terem acumulado frações de massa inferiores à *L. angulifera*, moluscos da espécie *M. coffea* também tiveram aumento considerável das frações de massa de Zn (Figura 20) na área 2D. Do ponto de vista de biomonitoração, as faixas de valores indicadas nos gráficos de Zn das Figuras 20 e 21 também representam o intervalo de confiança em nível de 95% de confiança e a média para o local considerado como *background*, ou seja, a região de menor influência antrópica. Nesse caso, a melhor estimativa encontrada foi a média dos valores obtidos para *M. coffea* nos manguezais de Itamaracá e Maracaípe.

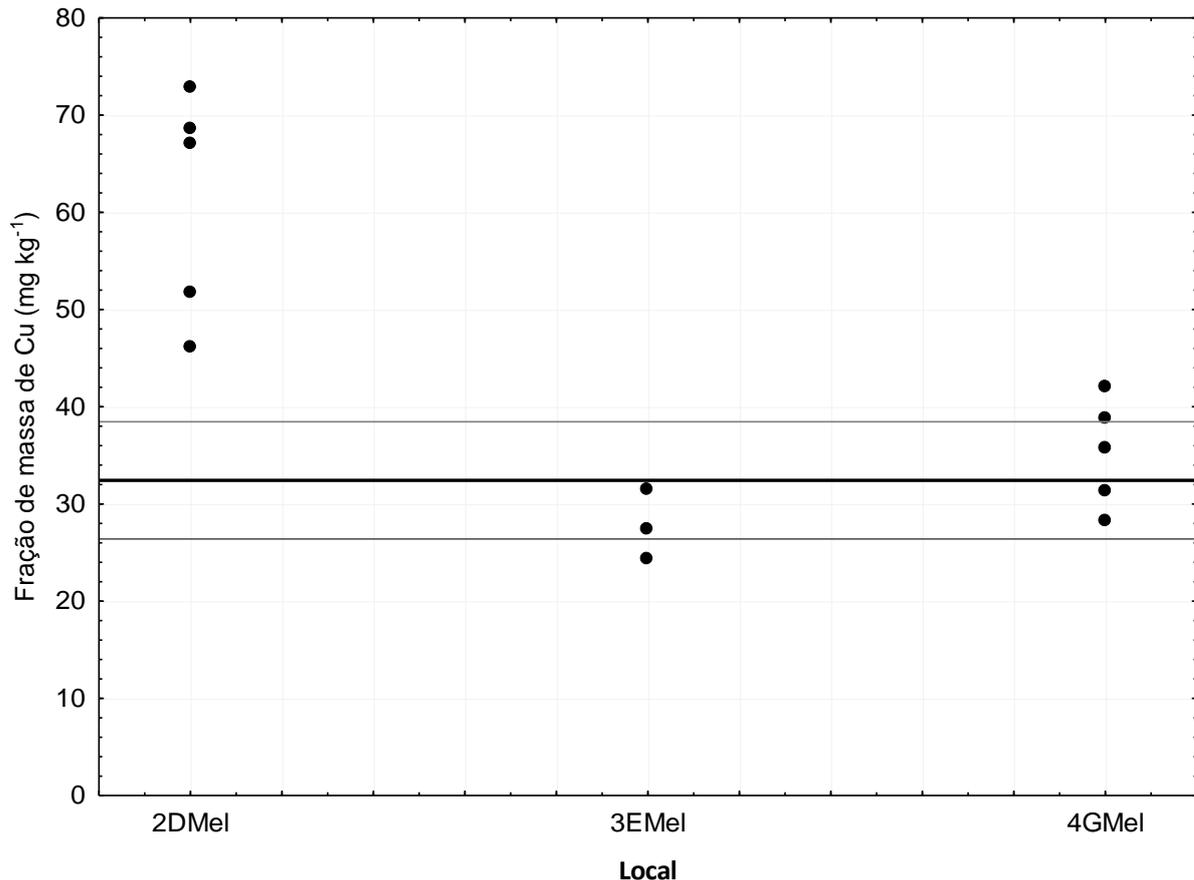
Figura 20 – Diferenças entre as frações de massa de Zn (mg kg^{-1}) obtidas para a espécie *Melampus coffea* nas áreas estudadas*.



*2(D) = Memorial Arco Verde; 3(E) = Itamaracá; 4(F,G) = Maracaípe.

A faixa de valores indicadas nos gráficos representa o intervalo de confiança em nível de 95% de confiança e a média para o local considerado como *background* (*Littoraria angulifera* no Manguezal de Rio Formoso)

Figura 21 – Diferenças entre as frações de massa de Cu (mg kg^{-1}) obtidas para a espécie *Melampus coffea* nas áreas estudadas*.



*2(D) = Memorial Arcoverde; 3(E) = Itamaracá; 4(F,G) = Maracaípe.

A faixa de valores indicadas nos gráficos representa o intervalo de confiança em nível de 95% de confiança e a média para o local considerado como *background*.

Na área de maior impacto antrópico, área 2D, ambas as espécies acumularam Cu em frações de massa exorbitantemente maiores que as consideradas letais para outras espécies de moluscos (VENTURINI et al. 2008; STEVENS et al., 1014; DAS; KHANGAROT, 2011). Ainda, na área mais impactada, foi possível observar resultados muito acima da média considerada para *M. coffea*. Ambas as espécies se comportaram de maneira semelhante para o Zn quanto à acumulação (Figuras 18 e 20), em que os valores desse elemento químico foram extremamente superiores aos encontrados na literatura e considerados como letais para moluscos aquáticos (RAND et al., 1995). Essas frações de massa são muito elevadas para Zn, principalmente quando comparadas a outros acumuladores como crustáceos e outros moluscos (CATHARINO et al., 2000; FRANCONI et al., 2004). Com estes resultados, *L. angulifera* pôde ser considerada uma hiperacumuladora de Zn nesse ecossistema. Vale ressaltar que essas frações de massa já devem ser reflexo da presença do elemento químico em outros compartimentos dos ecossistemas como vegetação, solo e água, averiguando a

necessidade de novos estudos a fim de avaliar a principal fonte de entrada de Zn e Cu nesse manguezal.

Comparando-se com dados obtidos em outros estudos com moluscos, Emereciano et al. (2008) obteve frações de massa de $0,085 \text{ mg kg}^{-1}$ para Cu e $0,728 \text{ mg kg}^{-1}$ para Zn em amostras de mexilhão da espécie *Anomalocardia brasiliiana* do Rio Grande do Norte, valores extremamente menores que aqueles obtidos na espécie *L. angulifera*. Tsu-Chang et al. (2001) determinaram as frações de massa de diversos elementos químicos de interesse ambiental em trinta espécies de moluscos da Costa de Taiwan e obtiveram resultados de Cu acima de 200 mg kg^{-1} e Zn acima de 700 mg kg^{-1} , resultados condizentes com os obtidos neste trabalho para os manguezais estudados, contudo, bastante inferiores àqueles encontrados na unidade amostral 2D, o manguezal do Parque Memorial Arcoverde. De acordo com Lacerda et al. (2009), as áreas próximas ao cultivo de camarão, normalmente clandestinas, podem contribuir para a presença de cobre nos estuários a partir da liberação do elemento químico durante o manejo dos viveiros. Avaliação da qualidade ambiental mais completa torna-se, então, necessária para entender os mecanismos de acumulação de Cu e Zn nas espécies estudadas. A contaminação do alimento e o contato direto com a água, solo ou atmosfera podem explicar as frações de massa encontradas nos tecidos. Além disso, a análise dos órgãos separadas dos animais pode auxiliar na identificação da principal rota de contaminação (BORDEAN et al., 2014).

5. CONCLUSÕES

A partir deste trabalho utilizando moluscos terrestres como biomonitores de qualidade ambiental de manguezais, conclui-se que:

- As técnicas analíticas EDXRF e FAAS foram satisfatoriamente empregadas para a caracterização química das espécies de moluscos *L. angulifera* e *M. coffea*.
- A quantificação química por FAAS foi mais adequada para a determinação de Cu, K e Mn do que por EDXRF devido às menores incertezas analíticas. Entretanto, a EDXRF foi adequada para a determinação de Cl, Fe, Mg, P, Sr e Zn nos tecidos das espécies.
- A variabilidade ambiental de elementos químicos foi considerada interessante para o emprego da espécie *L. angulifera* na detecção de impactos ambientais. Frações de massa naturais de elementos químicos foram propostas para o manguezal de Rio Formoso, local considerado *background*.
- Apesar do comportamento quimicamente semelhante das espécies nos locais estudados, a espécie *L. angulifera* apresentou maior capacidade de acumulação de elementos químicos tóxicos em potencial.
- Maior adaptabilidade das espécies *L. angulifera* e *M. coffea* foi notada para ambientes “contaminados” por Cu e Zn em comparação às demais espécies de moluscos empregados, até o momento, em estudos ambientais.
- *L. angulifera* pode ser considerada uma hiperacumuladora de Zn.
- Com base nos níveis de acumulação dos elementos químicos encontrados neste trabalho, pode-se afirmar que *L. angulifera* e *M. coffea* têm grande potencial de uso como biomonitores de qualidade ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEIXO, P. C.; NÓBREGA, J. A. Determinação direta de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 310-312, 2000.

ALVES, J. R. P. **Manguezais: educar para proteger**. Rio de Janeiro: FEMAR: SEMADS, 2001, 96 p.

ANJOS, M. J.; LOPES, R. T.; JESUSB, E. F. O.; ASSISC, J. T.; CESAREOD, R.; BARROSA, R. C.; BARRADASE, C. A. A. Elemental concentration analysis in soil contaminated with recyclable urban garbage by tube-excited energy-dispersive X-ray fluorescence. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 65, p. 495-500, 2002.

ANTWI, D. A.; AMEYAW-AKUMFI, C. Migrational orientation in two species of littoral gastropods (*Littoraria angulifera* and *Nerita senegalensis*). **Marine Biology**, v. 94, p. 259-263, 1987.

ASCH, H. L.; DRESDEN, M. H. *Schistosoma mansoni*: Effects of zinc on cercarial and schistosomule viability. **The Journal of Parasitology**, v. 63, n. 1, p. 80-86. 1977.

AZIZULLAH, A.; KHATTAK, M. N. K; RICHTERA, P.; HÄDER, D. Water pollution in Pakistan and its impact on public health — A review. **Environment International**, v. 37, p. 479-497, 2011.

BEEK, B.; BÖHLING, S.; BRUCKMANN, U.; FRANKE, C.; JÖNCK, U.; STUDINGER, G. The assessment of bioaccumulation. In: BEEK, B. (Ed.). **The Handbook of Environmental Chemistry**, v.2, pt. 1, p. 235-276, 2000.

BEIRAS, R; FERNANDEZ, N.; BELLAS, J.; BESADA, V.; GONZALEZ-QUIJANO, A.; NUNES, T. Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. **Chemosphere**, v.52, p. 1209-1224, 2003.

BERNINE, E.; REZENDE, C. E. Estrutura da vegetação em florestas de mangue do estuário do Rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n.3, p. 491-502, 2004.

BORDEAN, D. M.; NICA, D. V.; HARMANESCU, M.; BANATEAN-DUNEA, I.; GERGEN, I. I. Soil manganese enrichment from industrial inputs: a gastropod perspective. **PLOS ONE**, v.9, p. 1-8, 2014.

BOULDING, E. G.; ALSTYNE, K. L. V. Mechanisms of differential survival and growth of two species of *Littorina* on wave-exposed and on protected shores. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 169, p. 139-166, 1993.

BRASIL. Manual Técnico da Vegetação Brasileira. **Manuais Técnicos em Geociências**. 2ª ed. IBGE, 2012. 275p.

BRYAN, G. W. Bioaccumulation of marine pollutants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. v. 286, p. 483-505, 1979.

BUENO, T. P.; ÁLVAREZ, L. M.; ROGER, D. M. S.; PERDOMO, Y. R. Estudio de compatibilidad química del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. y diferentes excipientes farmacéuticos por análisis térmico. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 44, n. 4, 2010. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152010000400010&script=sci_arttext>. Acesso em: 14 nov. 2013.

CADORE, S.; MATOSO, E.; SANTOS, M. C. Espectrometria atômica e a determinação de elementos metálicos em material polimérico. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1533-1542, 2008.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 42, n. 3, p. 131-143, 2000.

CANTLE, J. E. **Atomic absorption spectrometry**. Elsevier, 1986. 448p.

CORREIA, M. D.; SOVIERZOSKI, H. H. **Ecosistemas marinhos: recifes, praias e manguezais**. Maceió: EDUFAL, 2005. 55p.

CARTER, S.; FISHER, A. S.; HINDS, M. W.; LANCASTER, S.; MARSHALL, J. Atomic spectrometry update. Review of advances in the analysis of metals, chemicals and materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, p. 1814-1869, 2013.

CHASE, M. E.; THOMAS, M. L. H. The effect of the rate and onset of temperature increase on spawning of the periwinkle, *Littorina littorea* (L.). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 186, p. 277-287, 1995.

CHRISTENSEN, J. T. Diet in *Littoraria*. **Hydrobiologia**, v. 378, p. 235-236, 1998.

CLEMENTS, R.; KOHB, L. P.; LEE, T. M.; MEIER, R.; LI, D. Importance of reservoirs for the conservation of freshwater mollusks in a tropical urban landscape. **Biological Conservation**, v. 128, p. 136-146, 2006.

COSTA, M. B.; ZAMPROGNO, G. C.; PEDRUZZI, F. C.; DALBEM, G. B.; TOGNETTA, 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 a biomarker. **International Journal of Oceanography**, v. 2013, 2013, 8p.

CUIZANO, N. A.; NAVARRO, A. E. Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. In: **Anales de la Real Sociedad Española**, p. 120-125, 2008.

CUNHA, A.; GUIMARÃES, A. S. Biologia reprodutiva dos teleósteos no manguezal Chico Science, Olinda-PE. In: **MANGROVE 2000**, Recife, p. 65, 2000.

DAS, S.; KHANGAROT, B. S. Bioaccumulation of copper and toxic effects on feeding, growth, fecundity and development of pond snail *Lymnaea luteola* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 1, p. 295-305, 2011.

DAVIDSON, C. M.; THOMAS, R. P.; MCVEY, S. E.; PERALA, R.; LITTLEJOHN, D.; URE, A. M. Evaluation of a sequential extraction procedure for speciation of heavy metals in sediments. **Analytica Chimica Acta**, v. 291, p. 277-286, 1994.

DUNCAN, R. S.; SZELISTOWSKI, W. A. Influence of puffer predation on vertical distribution of mangrove littorinids in the Gulf of Nicoya, Costa Rica. **Oecologia**, v. 117, p. 433-442, 1998.

EMERECIANO, D. P.; SILVA, H. F. O.; CARVALHO, G. C.; CRUZ, A. M. F., MOURA, M. F. V. Análise da ocorrência de metais: bário, cádmio, chumbo, cobre, cromo, níquel e zinco, em mexilhão (*Anomalocardia brasiliiana*) coletados no Estuário Potengi/Jundiaí - RN. **Publica**, v. 4, n. 2, p. 54-58, 2009.

ERLANDSSON, J.; JOHANNESSON, K. Sexual selection on female size in a marine snail, *Littorina littorea* (L.). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.181, p. 145-157, 1994.

FERREIRA, F. S.; SANTOS, S. C.; BARROS, T. F.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antibacteriana in vitro de extratos de *Rhizophora mangle* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 305-310, 2011.

FERREIRA, M. S.; MÁRSICO, E. T.; CONTE JUNIOR, C. A.; MARQUES JÚNIOR, A. N.; MANO, S. B.; SÃO CLEMENTE, S. C. Contaminação por metais traço em mexilhões *Perna perna* da costa brasileira. **Ciência Rural**, v.43, n.6, jun, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/2013nahead/a16213cr6591.pdf>> Acesso em 25 jun 2014.

FIELDS, J. H. A.; ELLINGTON, W. R. Effects of anoxia and quiescence on pyruvate kinase from the foot of the mangrove snail *Littorina scabra angulifera* Lamarck. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 163, p. 65-76, 1992.

FIGUEIREDO, C. S.; SILVA, C. B. V.; LUCENA, A. D. L. S.; COSTA, R. S.; FALTAY, P.; SILVA, V. L.; MOTTA, M. Manguezal Chico Science - Avaliação da composição hídrica. In: IX Congresso da Associação Brasileira de Estudos Quaternários, 2003, Recife. II Congresso do Quaternário de Países de Língua Ibérica e II Congresso sobre Planejamento e Gestão da Zona Costeira dos Países de Expressão Portuguesa, v.1, Recife: ABEQUA, 2003. **Resumos**, 1 CD-ROM.

FRANÇA, E. J. **A biomonitoração da Mata Atlântica na conservação da biodiversidade: Espécies arbóreas nativas acumuladoras de elementos químicos**. Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado). Ecologia Aplicada, 2006, 380p.

FRANCIONI, E.; WAGENER, A. L. R.; CALIXTO, R. C.; BASTOS, G. C. Evaluation of *Perna perna* (Linné, 1758) as a tool to monitoring trace metals contamination in estuarine and coastal waters of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 1, 2004.

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

GODOY, S. A.P.; MAYWORM, M. A. S.; LO, V. K.; SALATINO, A.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Teores de ligninas, nitrogênio e taninos em folhas de espécies típicas do mangue. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20, n. 1, p. 35-40, 1997.

GONZALVEZ, A.; CERVERA, M. L.; ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M. A review of non-chromatographic methods for speciation analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 636, p. 129-157, 2009.

GRETILLAT, S. A new molluscicide, the dimethyldithiocarbamate of zinc (Zirame). **Bulletin World Health Organ**, v. 25, p. 581-588. 1961.

HICKMANN, C. P. JR.; ROBERTS, L. S.; LARSON, L. **Princípios integrados de Zoologia**, 11^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 2004. 872p.

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

JOHANNESSON, K.; PANOVA, M.; KEMPPAINEN, P.; ANDRÉ, C.; ROLÁN-ALVAREZ, E.; BUTLIN, R. K. Repeated evolution of reproductive isolation in a marine snail: unveiling mechanisms of speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B - Biological Sciences**, v.365, p. 1735-1747, 2010.

JOSHI, G. C.; AGRAWAL, H. M.; MOHANTA, B.; SUDARSHAN, M.; SINHA; A. K. Elemental study of Nainital Lake water by EDXRF. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v.251, p. 223-226, 2006.

JÓZWIAK, M. A.; JÓZWIAK, M.; KOZŁOWSKI, R.; RABAJCZYK, A. The role of indicator malacofauna in pollution assessment of inland waters exposed to anthropopressure: the case of the Kielce Lake. **Ecological Chemistry and Engineering S**, v. 17, n. 4, p. 485-495, 2010.

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

KOHLMEYER, J.; BEBOUT, B. On the occurrence of marine fungi in the diet of *Littorina angulifera* and observations on the behavior of the periwinkle. **Marine Ecology**, v. 7, n.4, p. 333-343, 1986.

KOJIMA, I.; UCHIDA, T.; NANBU, M.; IIDA, C. Synergic extraction and atomic absorption spectrometric determination of vanadium in silicates. **Analytica Chimica Acta**, v. 93, p.69-75, 1977.

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

LACERDA, L. D.; CONDE, J. E.; ALARCON, C.; ALVAREZ-LEON, R.; BACON, P. R.; D'CROZ, L. P.; KJERFVE, B.; POLAINA, J.; VANNUCCI, M. Mangrove ecosystems of Latin America and the Caribbean: a summary. **Conservation and sustainable utilization of mangrove forests in Latin America and Africa Regions**. Part I. International Society for Mangrove Ecosystems, 1990, 42p.

LACERDA, L. D. Manguezais, ecossistemas-chave sob ameaça. **Scientific American Brasil**. Coleção Oceanos, v. 1, p. 76-82, 2009.

LECHNER, P.; ECKBAUERA, S.; HARTMANNA, R.; KRISCHB, S.; HAUFFA, D.; RICHTERA, R. SOLTAUB, H.; STRÜDERA, L.; Silicon drift detectors for high resolution room temperature X-ray spectroscopy. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 377, p. 346-351, 1996.

LEME, J. L. M. Sistemática e biogeografia: morfologia geral dos moluscos, em particular da classe gastropoda. In: BARBOSA, F. S. **Tópicos em malacologia médica** [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995, 314 p. Disponível em: <<http://books.scielo.org>> Acesso em: 20 jun. 2014.

LIMA, D. A. Estudos fitogeográficos de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 4, p.243-274, 2007.

LIU, T.; KOENE, J. M.; DONG, X.; FU, R. Sensitivity of isolated eggs of pond snails: a new method for toxicity assays and risk assessment. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 185, p. 4183-4190, 2013.

MAIA, R. C.; ROCHA-BARREIRA, C. A.; COUTINHO, R. Reproductive cycle and embryonic development of the gastropod *Melampus coffeus* (Linnaeus, 1758) (Ellobiidae) in the Brazilian Northeast. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 935-943, 2012.

MAIA, R. C.; TANAKA, M. O. Avaliação de efeitos locais de espécies de mangue na distribuição de *Melampus coffeus* (Gastropoda, Ellobiidae) no Ceará, Nordeste do Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 97, n.4, p. 379-382, 2007.

MALACONET. **Museu de Malacologia Rosa de Lima Silva Mello**. Departamento de Pesca – UFRPE. Disponível em: <http://malaconet.br.tripod.com/nova_pagina_3.htm>

MARENGONI, N. G.; KLOSOWSKI, E. S.; OLIVEIRA, K. P.; CHAMBO A. P. S.; GONÇALVES JUNIOR, A. C. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão

dourado do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 359-363, 2013.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; CARVALHO, M. L.; HIDALGO, M. Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. **Analytica Chimica Acta**, v. 549, p. 197-204, 2005.

MARTÍNEZ, S.; MAHIQUES, M. M.; BURONE, L. Mollusks as indicators of historical changes in an estuarine-lagoonal system (Cananéia-Iguape, SE, Brazil). **The Holocene**, v. 23, p. 888-897, 2013.

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

MATTHEWS, H. R. Moluscos marinhos do norte e nordeste do Brasil II – Moluscos do Arquipélago de Fernando de Noronha (com algumas referências ao Atol das Rocas). **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 10, p. 1-53, 1970.

MCMAHON, R. F.; RUSSELL-HUNTER, W. D. The effects of physical variables and acclimation on survival and oxygen consumption in the high littoral salt-marsh snail, *Melampus bidentatus* Say. **Biological Bulletin**, v. 161, n. 2, p. 246-269, 1981.

MEDEIROS, D. P. W.; LOPES, A. V.; ZICKEL, C. S. Phenology of woody species in tropical coastal vegetation, northeastern Brazil. **Flora**, v. 202, p. 513-520, 2007.

MERKET, R. E.; ELLISON, A. M. Geographic and habitat-specific morphological variation of *Littoraria (Littorinopsis) angulifera* (Lamarck, 1822). **Malacologia**, v. 40, p. 279-295, 1998.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**, 12 ed, São Paulo: Atheneu, 2011, 494 p.

NGUYEN, T. H.; BOMAN, J.; LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W. Mercury analysis in environmental samples by EDXRF and CV-AAS. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, p. 199-204, 1998.

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

PAEM P. A. **Manguezal. Projeto de educação ambiental em sistemas de manguezais**, Apostila. Recife, v. 1, p. 34, 1998.

PAIVA, J. D. S. **Plantas nativas na Costa Pernambucana: Bioacumuladores de radionuclídeos naturais e artificiais**. Dissertação (Mestrado). Tecnologias Energéticas e Nucleares, UFPE. Recife, 2014, 78p.

PANG, C.; SELCK, H.; BANTA, G. T.; MISRA, S. K.; BERHANU, D.; DYBOWSKA, A.; VALSAMI-JONES, E.; FORBES, V. E. Bioaccumulation, toxicokinetics and effects of copper from sediment spiked with aqueous Cu, nano-CuO or micro-Cuo in the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 32, n. 7, p. 1561-1573. 2013.

PASSOS-FILHO, P. B.; SILVA, L. B.; LYRA-NEVES, R. M. Avifauna do manguezal de Maracáípe, litoral sul de Pernambuco. **Revista Nordestina de Zoologia**, Recife, v. 4, n. 2, p. 57-69. 2009/2010.

PATACA, L. C. M.; BORTOLETO, G. G.; BUENO, M. I. M. S. Determinação de arsênio em águas contaminadas usando fluorescência de raios-X por energia dispersiva. **Química Nova**, v. 28, p. 579-582, 2005.

PATRÓN-PRADO, M.; ACOSTA-VARGAS, B.; SERVIERE-ZARAGOZA, E.; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L. C. Copper and cadmium biosorption by dried seaweed *Sargassum sinicola* in saline wastewater. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 210, p. 197-202, 2010.

PERIQUITO, M. C.; PEREIRA, G. A.; BRITO, M. T. Aves no manguezal do Espaço Ciência, Pernambuco. **Atualidades Ornitológicas On-line**, n. 145, p. 36-38. 2008. Disponível em: <www.ao.com.br> Acesso em 22 abr. 2014.

POUZAR, M.; CERNOHORSKY, T.; KREJCOVA, A. Determination of metals in lubricating oils by X-ray fluorescence spectrometry. **Talanta**, v. 54, p. 829-835, 2001.

PRATES, A. P.; GONÇALVES, M. A; ROSA, M. **Panorama da Conservação dos ecossistemas Costeiros e Marinhos no Brasil**. 2 ed. rev. ampliada - Ministério do Meio Ambiente. Brasília, MMA, 2010 .

PRICE, C. H. Water relations and physiological ecology of the salt marsh, *Melampus bidentatus* Say. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 45, n.1, p. 51-67, 1980.

PRINCZ, D. Notes on the status and distribution of *Littorina flava* (KING; BRODERIP, 1832). **Veliger**, v. 23, n. 4, p. 373, 1981.

PROFFITT, C. E.; DEVLIN, D. J. Grazing by the intertidal gastropod *Melampus coffeus* greatly increases mangrove leaf litter degradation rates. **Marine Ecology Progress Series**, v. 296, n. 1, p. 209-218, 2005.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. D. C. Taylor & Francis, 2 ed. p. 3-67, 1995.

RAINBOW, P. S. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 183-192, 1995.

RAWI, S. M.; EL-GINDY, H.; ABD-EL-KADER, A. New possible molluscicides from *Calendula micrantha officinalis* and *Ammi majus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 35, p. 261-267, 1996.

RAWI, S. M.; AL-HAZMI, M.; SEIF AL NASSR, F. Comparative study of the molluscicidal activity of some plant extracts on the snail vector of *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria alexandrina*. **International Journal of Zoological Research**, v. 7, p. 169-189, 2011.

REDUS, R.; PANTAZIS, T.; PANTAZIS, J.; HUBER, A.; CROSS, B. Benefits of improved resolution for EDXRF. **International Centre for Diffraction Data**, JCPDS, Pennsylvania, United States, p. 135-143, 2009.

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

REID, D. G. The comparative morphology, phylogeny and evolution of the gastropod family Littorinidae. **Phil. Trans. Soc. Lond.**, v. 324, p. 1-110, 1989.

RODRIGUES, L. L.; FARRAPEIRA, C. M. R. Percepção e educação ambiental sobre o ecossistema manguezal incrementando as disciplinas de ciências e biologia em escola pública do Recife-PE. **Investigações em Ensino de Ciências**, v.13, p. 79-93, 2008.

ROTHERY, E. **Analytical methods for graphite tube atomizers**. VARIAN, 1988. 193p.

RUPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**, 7 ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 353-484.

RUSSEL-HUNTER, W. D.; APLEY, M. L.; HUNTER, R. D. Early life-history of *Melampus* and the significance of semilunar synchrony. **Biological Bulletin**, Massachusetts, v. 143, n. 3, p. 625-656, 1972.

SANTOS, H. F.; CURY, J. C.; CARMO, F. L.; SANTOS, A. L.; TIEDJE, J.; ELSAS, J. D. V.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: Bacterial Proxies for Oil Pollution. **PLOS ONE**, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2011.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análise química em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química, 1974. 56p.

SEARLY, P. L.; DALY, B. K. The determination of aluminum, iron, manganese and silicon in acid oxalate soil extracts by flame emission and atomic absorption spectrometry. **Geoderma**, v. 19, p. 1-10, 1977.

SIJM, D. T. H. M.; HERMENS, J. L. M. Internal effect concentration: link between bioaccumulation and ecotoxicity for organic chemicals. In: BEEK, B. (Ed.). **The Handbook of Environmental Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2000. p. 167-199.

SIRIPROM, W.; CHUMNANVEJ, N.; CHOYESUPPAKET, A.; LIMSUWAN, P. A biomonitoring study: trace metal elements in *Perna viridis* shell. **Procedia Engineering**, v. 32, p. 1123-1126, 2012.

SKOOG, D. A. HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. **Análise instrumental**. 5 ed, Bookman, São Paulo, 2002. 836 p.

SMITH, A. C. Snailine: a possible diagnostic reagent from a common marine snail, the southern periwinkle, *Littorina angulifera*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 10, p. 489-496, 1986.

SMS – **Smithsonian Marine Station at Fort Pierce**, 2009a. Disponível em: <http://www.sms.si.edu/irlspec/Littor_anguli.htm> Acesso em: 3 dez. 2013.

SMS – **Smithsonian Marine Station at Fort Pierce**. 2009b. Disponível em: <www.sms.si.edu/irlspec/Melamp_coffeu.htm> Acesso em: 3 dez. 2013.

SOKOLOVA, I. M.; BERGER, V. J. Physiological variation related to shell color polymorphism in white sea *Littorina saxatilis*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n.245, p. 1-23, 2000.

SOUSA, E. E.; PAIVA, J. D. S.; FRANÇA, E. J.; ALMEIDA, M. E. S.; CANTINHA, R. S.; HAZIN, C. A. Qualidade nas análises químicas de matrizes biológicas pela fluorescência de raios-X por dispersão de energia. **In: 2013 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013**, Recife, 2013.1 DVD-ROM.

STEVENS, M. M.; DORAN, G.; MO, J. Efficacy and environmental fate of copper sulphate applied to Australian rice fields for control of the aquatic snail *Isidorella newcombi*. **Crop Protection**, v. 63, p. 48-56, 2014.

TAVARES, D. S.; MAIA, R. C.; ROCHA-BARREIRA, C. A. Contribuição de *Melampus coffeus* (Gastropoda, Ellobiidae) na degradação da serapilheira do médio estuário do rio Pacoti, Ceará, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v.101, n. 1-2, 2011.

THIENGO, S. C.; BARBOSA, A. F.; COELHO, P. M. FERNANDEZ, M. A. Moluscos exóticos com importância médica no Brasil. Brasília, DF: I Simpósio Brasileiro sobre Espécies Invasoras, Comunicação Oral: 1-14. 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/174/_arquivos/174_05122008104832.pdf> Acesso em: 30 jul. 2014.

TOKALIOGLU, S.; KARTAL, S.; ELÇI, L. Determination of heavy metals and their speciation in lake sediments by flame atomic absorption spectrometry after a four-stage sequential extraction procedure. **Analytica Chimica Acta**, v.413, p. 33-40, 2000.

TSU-CHANG, H.; PEI-JEI, M.; BOR-CHENG, H.; AILEEN, C.; CHE-CHUNG, H. Trace metals in different species of mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area. **Chemosphere**, v. 44, p. 833-841, 2001.

UGOLINI, A.; BORGHINI, F.; CALOSI, P.; BAZZICALUPO, M.; CHELAZZI, G.; FOCARDI, S. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 526-532, 2004.

UNGHERESE, G.; MENGONI, A.; SOMIGLI, S.; BARONI, D.; FOCARDI, S.; UGOLINI, A. Relationship between heavy metals pollution and genetic diversity in Mediterranean populations of the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1638-1643, 2010.

URBANO DE ARAÚJO, M. A.; VITÓRIA DE MOURA, M. F.; BORGES DE CARVALHO, G. Determinação de metais classificados como de importância toxicológica no molusco bivalve *Anadara notabilis* (Röding, 1978) encontrado em Galinhos, Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta Toxicologica Argentina**, v. 18, n. 2, p. 54-58, 2010.

VACCARO, S.; BRUN, E. J.; SCHUMACHER, M. V.; KÖNIG, F. G.; KLEINPAUL, I. S.; CECONI, D. E. Comparação entre três diferentes métodos de análise de tecido vegetal. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 48, p. 15-28, 2004.

VENTURINI, F. P.; CRUZ, C.; PITELLI, R. A. Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*Pomacea canaliculata*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, n. 2, p. 179-184, 2008.

WATSON, D. C.; NORTON, T. A. The habitat and feeding preferences of *Littorina obtusata* (L.) and *L. mariaae* Sacchi et Rastelli. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 112, p. 61-72 1987.