



UFRPE

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

ANDRÉ LUCAS CORRÊA DE ANDRADE

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INTERFERENTE ENDÓCRINO BISFENOL A
(BFA) EM ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA NA ESPÉCIE
POMACEA LINEATA E APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DO RIO
CAPIBARIBE – RECIFE – PE

RECIFE

2016

ANDRÉ LUCAS CORRÊA DE ANDRADE

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INTERFERENTE ENDÓCRINO BISFENOL A
(BFA) EM ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA NA ESPÉCIE
POMACEA LINEATA E APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DO RIO
CAPIBARIBE – RECIFE – PE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical
pela Universidade Federal Rural de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador:

Professor Doutor Pabyton Gonçalves Cadena

Coorientador:

Professor Doutor Pierre Castro Soares

RECIFE

2016

Ficha catalográfica

A553a Andrade, André Lucas Corrêa de
Avaliação do efeito do interferente endócrino bisfenol A (BFA) em ensaios de toxicidade aguda e crônica na espécie *Pomacea lineata* e aplicação em amostras de águas do rio Capibaribe – Recife – PE / André Lucas Corrêa de Andrade. – Recife, 2016.
64 f. : il.

Orientador: Pabyton Gonçalves Cadena.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.

Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Xenoestrogênio 2. BFA 3. Gastrópode 4. Comportamento animal 5. Perfil bioquímico I. Cadena, Pabyton Gonçalves, orientador II. Título

CDD 636.089

ANDRÉ LUCAS CORRÊA DE ANDRADE

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INTERFERENTE ENDÓCRINO BISFENOL A
(BFA) EM ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA NA ESPÉCIE
POMACEA LINEATA E APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DO RIO
CAPIBARIBE – RECIFE – PE

Data de defesa:

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Presidente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Prof. Dr. Marília Ribeiro Sales Cadena (1° Titular)
Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST)
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares (2° Titular)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico

*Este trabalho à minha querida família,
a base do meu viver.*

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por ter estado comigo e se fazer em Luz para guiar os caminhos da minha vida.

Eternamente serei grato aos meus pais Mauro e Rosane, por todo amor que me proporcionaram através dos ensinamentos, reclamações, incentivos e sermões, sobretudo pelo carinho, que foram e são partes importantes da minha formação.

Aos meus irmãos Igor e Arthur, que são tão importantes na minha vida, sendo às vezes mestres e outras vezes aprendizes, assim sempre cresceremos juntos.

A minha namorada Priscila, pelo constante carinho, dedicação, incentivo, paciência, ajuda e muita, em todas as fases deste trabalho. Especialmente pelo seu amor.

Ao Professor Pabyton, meu orientador sempre presente e disposto a tirar todas as dúvidas e perguntas.

Ao meu coorientador Professor Pierre pelo auxílio neste trabalho.

A toda turma do LECA, prof. Adélia, Amanda, Carla, Danilo, Erick, Ericka, Jadson, Juá, Jué, Marcelinho, Marília, Renata Ruana, Stephannie, Thamíris, Vitor.

A instituição Universidade Federal Rural de Pernambuco pelas experiências e gerando momentos importantes para minha profissional e pessoal.

Ao CNPq e FACEPE pelo auxílio financeiro.

Aos participantes da banca examinadora.

E finalmente a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram na superação de mais uma etapa da minha vida, eu agradeço!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

Os interferentes endócrinos, como o bisfenol A (BFA), representam um risco quando interagem com sistemas fisiológicos, causando alterações no desenvolvimento e reprodução dos organismos expostos a essas substâncias. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de BFA, através de testes de toxicidade aguda e crônica, a partir de parâmetros fisiológicos, reprodutivos, comportamentais e bioquímicos em neonatos e adultos de *Pomacea lineata*. Para determinação da concentração letal (CL₅₀ 96 h) de BFA, adultos e neonatos foram divididos em 6 grupos com 1, 5, 10, 15 e 20 mg/L de BFA, diluídos na água dos aquários, e um controle. Estas concentrações foram baseadas em trabalhos com gastrópodes e valores máximos encontrados em rios poluídos. A CL₅₀ 96 h nos adultos foi de 11,09 mg/L, adicionalmente foram visualizados efeitos subletais como comportamentos letárgicos, sem respostas a estímulos mecânicos, nos grupos com 15 e 20 mg/L, e aumento nos níveis da enzima aspartato aminotransferase em concentração de 10 mg/L. Referente aos neonatos, a CL₅₀ 96 h foi de 3,14 mg/L, também foram observadas reduções significativas ($p < 0,05$) nas frequências cardíacas dos grupos 15 e 20 mg/L. Para o teste de toxicidade crônica, adultos foram submetidos a concentrações de 1 mg/L de estradiol (E₂), 10% (1 mg/L) e 50% (5 mg/L) da CL₅₀ 96 h de BFA obtida no teste agudo, e um grupo controle. Durante os 4 meses do teste crônico, foram observados parâmetros reprodutivos, como o ato de cópula nos grupos 1 e 5 mg/L de BFA e desovas no grupo controle. Na análise comportamental, os grupos com 5 mg/L de BFA e 1 mg/L de estradiol exibiram alterações das frequências de atos no estado inativo com diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparação ao controle. Para os componentes do perfil bioquímico da hemolinfa, não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Diante dos resultados, o BFA se mostrou um potencial agente tóxico em relação aos parâmetros fisiológicos, reprodutivos, comportamentais e bioquímicos de *Pomacea lineata*. Não foram encontrados níveis de BFA em rios pernambucanos, mesmo o Rio Capibaribe sendo considerado muito poluído. Adicionalmente estes dados contribuem com o entendimento do modo de ação do BFA em invertebrados e alerta os órgãos públicos para a criação de normas sobre o despejo destes interferente endócrino em efluentes.

PALAVRAS-CHAVE: Xenoestrogênio, BFA, gastrópode, comportamento animal, perfil bioquímico.

ABSTRACT

The endocrine disruptors, such as bisphenol A (BPA) may be a risk when they interact with physiological systems, causing changes in the development and reproduction of organisms exposed to these substances. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of BPA, by acute and chronic toxicity tests from physiological, reproductive, behavioral and biochemical parameters in neonates and adults of *Pomacea lineata*. To determine the lethal concentration (LC₅₀ 96h) of BPA, adults and neonates were divided into 6 groups with 1, 5, 10, 15 and 20 mg/L of BPA, diluted in the water, and a control. These concentrations were based on work with gastropods and maximum values found in polluted rivers. The LC₅₀ 96h in adults was 11.09 mg/L, in addition sublethal effects were visualized as lethargic behavior without response to mechanical stimuli, in groups of 15 and 20 mg/L, and increased levels of the enzyme aspartate aminotransferase in the highest concentration of BPA. Referring to neonates, the LC₅₀ 96h was 3.14 mg/L, significant reductions ($p < 0.05$) were observed in the heart rates of the groups 15 e 20 mg/L. For the chronic toxicity test, adults were submitted to concentrations of 1 mg/L of estradiol, 10% (1 mg/L) and 50% (5 mg/L) of the LC₅₀ 96 h of BPA obtained in the acute test, and a control group. During the four months of chronic test were observed reproductive parameters, such as the act of copulation in groups 1 and 5 mg/L of BPA and spawns in the control group. In behavioral analysis, groups with 5 mg/L of BPA and 1 mg/L of estradiol exhibited changes in acts of frequencies in the inactive state with significant differences ($p < 0.05$) compared to control. For the components of the biochemical profile of hemolymph, there were no significant differences by Tukey test ($p > 0.05$). Based on the results, BPA has proved a potential toxic agent in relation to physiological parameters, reproductive, behavioral and biochemical of *Pomacea lineata*. BPA levels are not found in Pernambuco rivers, even the Rio Capibaribe being considered quite polluted. In addition, these data contribute to the understanding of the BFA's mode of action in invertebrates and alert the public agencies to law creations of the discharge of these endocrine disruptors in the wastewater.

KEYWORDS: Xenoestrogen, BPA, gastropod, animal behavior, biochemical profile.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Gastrópode prosobrânquio, *Pomacea lineata*. (Fonte: próprio autor).21

Capítulo 1.

Figura 1: Análise comportamental de *P. lineata*, submetidos a diferentes concentrações de Bisfenol A durante 96 h. Para os eventos são mostrados: RS = Raspar superfícies, RA = Raspar alimento, FF = Formar funil, RJ = Rastejar, BO = Boiar, DP = Desprender, VS = Ventilar com sifão, DE = Defecar, EC = Estender-se da concha, CO = Copular, SO = Subir em outro, CA = Canibalizar, RC = Retrair-se na concha, ES = Estender o sifão, PR = Permanecer retraído na concha, PI = Permanecer imóvel no substrato. * Resultado com diferenças significativas pelo Teste de Tukey em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).39

Figura 2: Análise comportamental de *P. lineata*, submetidos a diferentes concentrações de Bisfenol A durante 4 meses. Para os eventos são mostrados: RS = Raspar superfícies, RA = Raspar alimento, FF = Formar funil, RJ = Rastejar, BO = Boiar, DP = Desprender, VS = Ventilar com sifão, DE = Defecar, EC = Estender-se da concha, CO = Copular, SO = Subir em outro, CA = Canibalizar, RC = Retrair-se na concha, ES = Estender o sifão, PR = Permanecer retraído na concha, PI = Permanecer imóvel no substrato. * Resultado com diferenças significativas pelo Teste de Tukey em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades Físico-Químicas do Bisfenol A.16

Capítulo 1.

Tabela 1. Concentração letal para 48 e 96 horas em neonatos e adultos de *Pomacea lineata*.36

Tabela 2. Frequência cardíaca de neonatos expostos a BFA durante o teste agudo (96 horas).37

Tabela 3. Componentes bioquímicos da hemolinfa de *P. lineata* submetidos a diferentes concentrações (1, 5 e 10 mg/L e controle) de Bisfenol A após 96 h em ensaio toxicidade aguda.40

Tabela 4. Componentes bioquímicos da hemolinfa de *P. lineata* submetidos a diferentes concentrações de Bisfenol A (BFA) e Estradiol (E2) durante 4 meses de experimento em teste de toxicidade crônica.42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALB - Albumina;
AST - Aspartato aminotransferase;
BFA - Bisfenol A;
BO - Boiar;
CA - Canibalizar;
CENO – Concentração de efeito não observado;
CL50 – Concentração Letal Média;
CO - Copular;
COL – Colesterol;
CRE – Creatinina;
DE - Defecar;
DP - Desprender;
E2 - 17 β -estradiol;
EC - Estender-se da concha;
ES - Estender o sifão;
FAL - Fosfatase alcalina;
FF - Formar funil;
GT - γ -Glutamil Transferase;
PI - Permanecer imóvel no substrato
PR - Permanecer retraído na concha;
PRO - Proteínas totais;
RA - Raspar alimento;
RC - Retrair-se na concha;
RJ - Rastejar;
RS - Raspar superfícies;
SO - Subir em outro;
TRI – Triglicérides;
UR - Uréia;
VS - Ventilar com sifão.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO BILIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1. Interferentes endócrinos | 15 |
| 2.2. Bisfenol A | 16 |
| 2.2.1. Ação do Bisfenol A em Gastrópodes | 18 |
| 2.3. Família AMPULLARIIDAE (GRAY, 1824) | 19 |
| 2.4. Gênero <i>Pomacea</i> (PERRY, 1810) | 20 |
| 2.4.1. <i>Pomacea lineata</i> (SPIX, 1827) | 21 |
| 3. OBJETIVOS | 23 |
| 3.1 Geral | 23 |
| 3.2. Específico | 23 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 24 |
| Capítulo I – Artigo | 30 |
| 1. Introdução | 32 |
| 2. Material e Métodos | 33 |
| 3. Resultados | 36 |
| 4. Discussão | 43 |
| 5. Conclusão | 47 |
| 6. Agradecimentos | 48 |
| 7. Referências Bibliográficas | 48 |
| 5. CONCLUSÃO | 52 |
| 6. PERSPECTIVAS FUTURAS | 52 |
| 7. APÊNDICES | 53 |
| 8. ANEXOS | 58 |

1. INTRODUÇÃO

A presença de substâncias sintéticas ou naturais no ambiente, conhecidas como interferente endócrinos (IE), representam um grave risco quando interagem com sistemas fisiológicos, pois podem afetar diretamente a biossíntese hormonal e metabolismo, provocando alterações no desenvolvimento e reprodução dos organismos expostos a essas substâncias (HAMPL; KUBÁTOVÁ; STÁRKA, 2016). Segundo Bila e Dezotti (2007), essas substâncias são encontradas no meio ambiente em concentrações na ordem de $\mu\text{g/L}$ e ng/L e são suspeitas de causarem efeitos adversos à saúde humana e animal. Um dos principais interferentes endócrinos sintéticos, o bisfenol A (BFA), tem origem industrial com produção em larga escala e contínuo despejo no ambiente, sendo um componente de policarbonatos e outros plastificantes, incluindo resinas que revestem recipientes de alimentos e bebidas (DRAGOMIRESCU; ANDONI; CRAINA, 2015).

De acordo com Dragomirescu et al. (2015), o BFA é um xenoestrógeno que pode mimetizar a atividade do estradiol (E_2) através das ligações com receptores de estrógeno, mesmo possuindo poucas semelhanças estruturais. No entanto, o BFA exibe 1000 a 2000 vezes menos afinidade para os receptores que o E_2 , o estrogênio mais ativo, segundo Acconcia et al. (2015). Mesmo sendo considerado um estrógeno fraco no ambiente, foi confirmado que o BFA pode estimular respostas celulares semelhantes ao estradiol em baixas concentrações (RUBIN e SOTO, 2009). Diante do contínuo descarte e a presença deste interferente endócrino em corpos de água, mesmo em baixas concentrações, pode-se considerar o BFA um risco para populações de diferentes organismos.

A partir do exposto, pesquisas tem-se esforçado para entender o modo de ação e efeito tóxico do BFA em diferentes tipos de organismos. Entre elas são destacados os testes de toxicidade aguda e crônica com invertebrados, que determinam as concentrações letal média (CL_{50}) e efeitos subletais, como nos estudos de Mihaich et al. (2009) com espécies de gastrópode (*Marisa cornuarietis*) e mosquito (*Chironomus tentans*), Hirano et al. (2004) com um microcrustáceo (*Daphnia magna*), Pascoe et al. (2002) com cnidário (*Hydra vulgaris*) e Marcial et al. (2003) no copépode (*Tigriopus japonicus*). Os dados referentes a CL_{50} nas diferentes espécies são importantes para informações básicas para testes crônicos e realização de avaliações de riscos ecotoxicológicos. No teste crônico realizado por Oehlmann et al. (2000), o gastrópode de água doce *Marisa cornuarietis* foi submetido a concentrações entre 1 a 100 $\mu\text{g/L}$ de BFA durante 6 meses, dentre os efeitos observados incluíam um alargamento nas glândulas sexuais, malformações do oviduto palial, resultando na mortalidade em fêmeas, e estimulação a

ovulação. Com estes resultados demonstra que o BFA é capaz de interferir e provocar efeitos na reprodução dos moluscos, apesar de que o modo exato de ação do BFA em moluscos ainda não foi completamente esclarecido (OECD, 2010).

Os efeitos tóxicos do BFA têm sido relatados em algumas espécies de invertebrados, porém poucos dados são disponíveis sobre a toxicidade do BFA em outras espécies de gastrópodes (ZHOU; ZHU; CAI, 2011), mesmo as espécies de moluscos tendo grande importância ecológica e econômica, são conhecidas por apresentar uma alta sensibilidade a interferentes endócrinos e a outras substâncias tóxicas. Diante do exposto, a proposta de utilização da espécie *Pomacea lineata* como modelo animal para os testes de toxicidade aguda e crônica do BFA tem o intuito de expandir o conhecimento sobre o modo de ação deste interferente endócrino nos parâmetros reprodutivos, fisiológicos e comportamentais em moluscos, com a finalidade de propor testes baseados em gastrópodes como substitutos para testes de toxicidade que utilizam peixes ou outros vertebrados aquáticos. Visto que os gastrópodes do gênero *Pomacea*, possuem várias características vantajosas ao serem utilizados como organismo bioindicador, por ter grande porte, pouca mobilidade, alta distribuição nas regiões tropicais, fácil metodologia de coleta e amostragem, com custos relativamente baixos e sensíveis a diferentes concentrações de poluentes no meio. Diante disto, esses animais vêm sendo amplamente utilizados como possíveis organismos bioindicadores, e aqui no Brasil a espécie nativa *P. lineata* tem se destacado nessas pesquisas.

Adicionalmente, em estudos realizados em rios brasileiros (Rio Atibaia – SP; Rio das Velhas – MG; rios da bacia hidrográfica do Alto Iguaçu – PR) foram quantificadas concentrações de BFA que variaram entre 0,008 a 12,61 µg/L (FROEHNER et al., 2011; MONTAGNER e JARDIM, 2011; MOREIRA et al., 2011). A presença de BFA em águas naturais está relacionada ao despejo contínuo dos efluentes da produção das indústrias de material plástico, estações de tratamento de águas residuais e degradação natural dos plásticos já presentes no ambiente. No entanto, as maiores concentrações de BFA em efluentes foram mensuradas em águas derivadas da lixiviação de aterros sanitários, com 5,4 e 17,2 mg/L em estudos realizados no Japão (YAMADA et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2001). Devido a presença de vários aterros sanitários e atividades industriais próximas ao Rio Capibaribe, a presença de concentrações de interferentes endócrinos, como o BFA, pode ser possível, além de apresentar um fator de risco para a fauna local. A utilização de espécies nativas e sensíveis, como *P. lineata*, podem favorecer a avaliação da toxicidade e presença destes poluentes no ambiente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Interferentes endócrinos

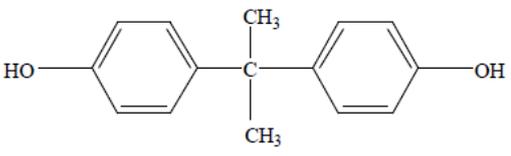
Ao longo das recentes décadas o mundo passou por diversas transformações e desenvolvimento de várias atividades humanas, como exemplo, na indústria, agricultura, urbanização, transporte e produção em larga escala. Consequentemente, aumentando o padrão de vida e elevando a demanda de consumo levando à amplificação da poluição no ar, como exemplo a emissão de CO₂ na atmosfera. Na água, com uma variedade de produtos químicos, nutrientes lixiviados, derrames de petróleo, e do solo, devido à eliminação de resíduos perigosos, a propagação de pesticidas, entre outros (GAVRILESCU, 2010). Desta forma, diversas substâncias xenobióticas que veem sendo produzidas recentemente estão se tornando ubíquas no ambiente aquático. Tais substâncias são referidas como “poluentes emergentes” e incluem uma vasta variedade de compostos diferentes e que podem ser detectados com metodologias analíticas altamente sensíveis, em níveis de partes por trilhão (ppt) (THOMAIDIS; ASIMAKOPOULOS; BLETSOU, 2012).

Entre os poluentes emergentes existe um grupo chamado de interferentes endócrinos (IE), que tem atraído bastante preocupação por representar um grave risco na interação com sistemas biológicos. Esses compostos podem causar alterações no desenvolvimento, crescimento e reprodução dos organismos expostos, interferindo no sistema endócrino por ligação e ativação de receptores hormonais (JOBILING et al., 2004). De acordo com Vandenberg et al (2013), o sistema endócrino é responsável pela libertação de hormônios, substâncias químicas que ajudam no controle e ligação entres os sistemas fisiológicos, e assim desempenha um papel importante na saúde de seres humanos e animais. Os IE podem ser encontrados na natureza e classificados como dois grupos de substâncias distintas, incluindo substâncias naturais e sintéticas, usadas ou produzidas para uma infinidade de finalidades (BILA e DEZOTTI, 2007). Substâncias sintéticas são utilizadas na agricultura, como pesticidas, e utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, como o bisfenol A, que chegam ao ambiente através de efluentes e resíduos agroindustriais; compostos farmacêuticos, como os estrogênios sintéticos e 17 α -etinilestradiol; e substâncias naturais como fitoestrogênios e estrogênios naturais, por exemplo o 17 β -estradiol, estrona e estriol, sendo estes excretados pelos humanos e entram no ambiente através de efluentes de estações de tratamento de águas residuais (FAN et al., 2011).

2.2. Bisfenol A

O bisfenol A (BFA) é um dos produtos químicos orgânico mais importantes a nível mundial, pertencente ao grupo dos derivados de difenilmetano e bisfenóis (HUANG et al., 2015). As propriedades físico-químicas do bisfenol A estão presentes na tabela 1. Tem origem industrial sendo um composto vastamente utilizado como plastificante, na produção de policarbonato (71%) e as resinas de epóxi (25%), tais como recipientes de comida e bebida, vidro acrílico e discos compactos, possuindo larga escala de produção e um contínuo despejo no ambiente, tendo destaque o aumento da produção de 700.000 toneladas em 1996-1999 para 1,15 milhões de toneladas nos anos 2005/2006, apenas na Europa (OEHLMANN; OETKEN; SCHULTE-OEHLMANN, 2008). O BFA pode vir a ser degradado biologicamente, com velocidades bastante diferenciadas, apresentando um tempo de meia-vida variando entre 1 a 180 dias em solos, bem como um tempo de meia-vida de 2,5 a 4 dias quando em água (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Tabela 1: Propriedades Físico-Químicas do Bisfenol A.

| | |
|----------------------|--|
| Nome comum | Bisfenol A (BFA) |
| Estrutura química |  |
| Fórmula molecular | $C_{15}H_{16}O_2$ |
| Nomenclatura (IUPAC) | 4-[2-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl]phenol |
| Peso molecular | 228 g/mol |
| pKa | 9,6 (Zeng et al. 2006) |
| Ponto de fusão | 150 - 155 °C (HSDB, 2001) |
| Ponto de ebulição | 220 °C (533 Pa) (HSDB, 2001) |
| Solubilidade | Água: 120-300 mg/L (HSDB, 2001); Solvente orgânico: acetona, etanol, éter e benzeno |

O BFA é considerado um composto químico ubíquo no ambiente, mesmo com um tempo de meia vida curto, devido ao contínuo despejo em corpos de água que ocorre através da descarga de efluentes de estações de tratamento de águas residuais, lixiviação de aterros sanitários, combustão de resíduos domésticos e a degradação natural dos plásticos já presentes no ambiente (CRAIN et al., 2007; OEHLMANN et al., 2009). Diante do exposto, várias pesquisas têm quantificado a concentração do BFA em diferentes corpos de água. Nos Estados Unidos, as concentrações quantificadas nas águas de rios foram de 0,147 a 12 µg/L (KOLPIN et al., 2002; ZHANG et al., 2007), em Portugal variaram entre 4 e 5,03 µg/L (AZEVEDO et al., 2001; QUIRÓS et al., 2005) e no Japão entre 0,33 e 19 µg/L (CRAIN et al., 2007; FUNAKOSHI e KASUYA, 2009). As maiores concentrações de BFA encontradas foram em águas lixiviadas de aterros sanitários no Japão com concentrações de 5,4 e 17,2 mg/L (YAMADA et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2001). Estudos sobre a presença de BFA em rios brasileiros quantificaram concentrações entre 0,13 e 0,204 µg/L no Rio Atibaia - SP (MONTAGNER e JARDIM, 2011), 0,008 e 0,168 µg/L no Rio das Velhas - MG (MOREIRA et al., 2011) e de 0,15 a 12,61 µg/L em rios da bacia hidrográfica do alto Iguaçu - PR (FROEHNER et al., 2011).

Não foram encontrados na literatura estudos de quantificação de BFA em rios pernambucanos. Todavia, a qualidade do Rio Capibaribe foi considerada muito poluída, em dois pontos do rio em Recife e em outros pontos de cidades diferentes o mesmo rio foi considerado entre poluído e muito poluído, de acordo com monitoramento realizado pela CPRH em abril de 2015. Este fato está relacionado com o grande aporte de efluentes domésticos, lixiviação do solo contaminado e atividades industriais próximas ao rio, inclusive com presença de indústrias de borrachas e de produtos de matéria plástica. Entre os contaminantes encontrados no Rio Capibaribe estão metais pesados, hidrocarbonetos e compostos orgânicos de estanho, que podem ser caracterizados como interferentes endócrinos (MACIEL et al., 2015).

Adicionalmente, o BFA tem sido definido como um interferente endócrino xenoestrógeno, pois pode mimetizar a atividade endógena de 17β-estradiol (E₂) *in vitro* e *in vivo* através da ligação do receptor de estrogênio (ER), e modular expressão do gene alvo (DRAGOMIRESCU; ANDONI; CRAINA, 2015). Alguns estudos envolvendo ensaios *in vitro* mostram que o bisfenol A possui um potencial de 4 a 6 ordens de magnitude menor que o 17β-estradiol e pode apresentar atividade anti-androgênica.

2.2.1. Ação do Bisfenol A em Gastrópodes

Na literatura foi encontrado alguns estudos que utilizaram gastrópodes de água doce como modelo animal, porém poucas espécies foram testadas sobre influência do bisfenol A. Entre eles se destacam o estudo de Mihaich et al. (2009), que realizou teste agudo em 96-h em indivíduos sub-adultos de *Marisa cornuarietus*, com 8 animais (4 machos e 4 fêmeas) por recipiente de 10 L, onde foram expostas as concentrações de 0,05; 0,25; 1,0; 5,0; 10 e 50 mg/L. Durante o experimento as observações foram feitas analisando a mortalidade e efeitos subletais. De acordo com os resultados, a CL₅₀ em 96 horas foi determinada para ser de 2,24 mg/L e os efeitos subletais como letargia e extensão anormal do manto foram observadas em todas as concentrações acima de 6,48 mg/L. A concentração de efeito não observado (CENO) em 96 horas foi determinada para ser de 1,18 mg/L, baseado na sobrevivência. Com a mesma espécie, *M. cornuarietus*, Oehlmann et al. (2006) realizou experimentos crônicos, onde grupos de 210 animais sexualmente maduros foram expostos a concentrações nominais de BFA de 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; e 1 µg/L por 6 meses. Como resultados obtidos, fêmeas com aumento dos ovários e malformações no oviduto foram observadas em todos os grupos, com exceção para o controle e a 0,1 µg/L. No entanto, no estudo de Forbes et al. (2007) não é encontrado resultado que mostra a influência negativa do bisfenol A sobre os animais. As concentrações do teste de BFA foram preparadas de acordo com as seguintes concentrações nominais: 0; 0,10; 1,0; 16; 160; e 640 µg BFA/L em *M. cornuarietus*. Como resultados do teste de fecundidade dos adultos houve 100% de sobrevivência durante as 12 semanas de experimento, não houve efeito da exposição ao BPA na percentagem de eclosão e não houve diferença significativa na percentagem de eclosão entre aquários com tratamentos. Em relação ao crescimento de juvenis dos 450 animais testados neste estudo (75 juvenis por tratamento), apenas dois não sobreviveram até ao fim do ensaio, ambos no tratamento de 640 µg BFA/L, dando uma sobrevivência de >97% em todos os tratamentos.

Embora, a espécie *M. cornuarietus* pertencer também a família Ampullariidae, não foram encontrados estudos com BFA que utilizem algum representante do gênero *Pomacea*, mesmo este gênero possuindo espécies importantes economicamente e ecologicamente, vastamente difundidas ao redor do mundo.

2.3. Família AMPULLARIIDAE (GRAY, 1824)

Os moluscos da família Ampullariidae pertencem a ordem Architaenioglossa, possuindo o maior e mais diverso grupo da classe Gastropoda, com aproximadamente 60% dos gastrópodes vivos (HAYES et al, 2009). Compreende moluscos operculados de água doce distribuídos em regiões tropicais úmidas e subtropicais da África, Ásia e América do Sul, onde alcança sua maior diversidade. Atualmente, são reconhecidos 9 gêneros com aproximadamente 120 espécies (COWIE e HÉROS, 2012), porém existe algumas divergências em relação ao número de gêneros e espécies, fato explicado pela família Ampullariidae apresentar uma taxonomia bastante confusa, pois a maioria das espécies foi descrita baseado apenas em análises morfológicas das conchas, que segundo Cazzaniga (2002) é um critério de caracterização subjetivo, pois o tipo de habitat tem influência direta no tamanho da concha de uma mesma espécie.

Como característica única, entre os gastrópodes, os ampularídeos possuem um pulmão bem desenvolvido com uma abertura de pneumóstoma em conjunto a um ctenídeo (STRONG, 2003), permitindo longos períodos fora da água. Adicionalmente, representantes dessa família são encontrados introduzidos em várias partes do mundo, devido sua importância econômica e na aquariofilia, pois várias espécies são utilizadas como fontes alternativas de alimento e para ornamentação. Além disso, algumas espécies vêm sendo empregadas no controle de doenças transmitidas por outros gastrópodes, por exemplo a esquistossomose. No entanto, quando esses animais são introduzidos, mal manejados e deixados livre no ambiente, podem se tornar facilmente uma espécie invasora e praga, como ocorre em culturas de arroz na Ásia, por vários motivos, entre eles a facilidade de adaptação as regiões tropicais, conseguirem suportar longos períodos de seca e águas pouco oxigenadas, além de serem onívoros (YUSA; WADA; TAKAHASHI, 2006), não possuírem predadores naturais, grande fecundidade, alta tolerância a temperaturas e poluição (LACH et al., 2000).

Entre os gastrópodes e outros invertebrados aquáticos, alguns gêneros da família Ampullariidae, possuem uma incomum estratégia de depositar seus ovos calcários acima da superfície da água, que provavelmente, foi desenvolvida contra a predação de peixes e outros organismos aquáticos (TURNER, 1998), porém deixando os ovos expostos ao sol e a dissecação. Devido a essas condições desfavoráveis, foram desenvolvidos alguns mecanismos bioquímicos onde pigmentos carotenoides formam complexos com proteínas desempenhando um papel fundamental no sucesso na sobrevivência dos ovos (HERAS et al., 2007).

2.4. Gênero *Pomacea* (PERRY, 1810)

Dentro da família Ampullariidae o gênero *Pomacea* possui o maior número de espécies, com cerca de 50 espécies (HORGAN; STUART; KUDAVIDANAGE, 2012). Seu habitat é caracterizado, geralmente, como sendo em zonas marginais mais rasas dos corpos hídricos, predominado nos ambientes lênticos, mas também é capaz de habitar sistemas lóticos e correntes rápidas por pouco período de tempo (KWONG et al., 2008). Nesses ambientes, frequentemente compõem a maior parte das faunas nativas de moluscos de água doce (COWIE, 2003).

As espécies do gênero *Pomacea* são encontradas em quase toda América do Sul, Central e no Caribe, onde está principalmente distribuída no Brasil, Argentina, Costa Rica, Guiana, Venezuela, Bolívia, Uruguai, Guatemala, Cuba e com apenas uma espécie no sudeste dos Estados Unidos (DARBY, 1999; TANAKA; SOUZA; MÓDENA, 2006). Entretanto, várias espécies são encontradas fora de suas regiões nativas por terem sido introduzidas em outros países, sobretudo no sudeste da Ásia, em ilhas do Pacífico e África. Isso se deu pelo comércio e tráfico de animais ornamentais, com as espécies *Pomacea bridgesi*, *P. diffusa*, *P. lineata*, *P. haustum* e *P. canaliculata*, pela aquicultura com a *P. latreii*, como alternativa alimentícia e comercial das espécies *P. canaliculata*, *P. maculatae*, *P. scalaris* e a espécie *P. glauca* como controle biológico de vetores de esquistossomose (HORGAN; STUART; KUDAVIDANAGE, 2012). Estas espécies se tornaram verdadeiras pragas em nações onde o arroz é o principal alimento básico e sua atividade agrícola é de fundamental importância, devido ao fato de que as espécies do gênero *Pomacea* se alimentam predominantemente de macrófitas frescas (ESTEBENET e MARTIN, 2002).

Os representantes do gênero são considerados gastrópodes grandes, com o tamanho do adulto variando aproximadamente de 15 mm a cerca de 155 mm, com a concha geralmente globular, opérculo não calcificado, córneo e flexível. São dioicos, com fertilização interna, ovíparos e depositam uma massa com aproximadamente 200 ovos rosados acima da superfície da água (BURELA e MARTÍN, 2007). São reconhecidos como animais anfíbios, comportamentalmente, pela capacidade de sobrevivência de longos períodos sem a presença de água, e fisiologicamente, por possuir tanto ctenídeos (brânquias primitivas), quanto uma porção modificada do manto como pulmão sacular (SEUFFERT e MARTÍN, 2009). Para realizar respiração aérea esses gastrópodes estendem o sifão, uma parte do manto que tem ligação direta ao pulmão, para a superfície

da água periodicamente, porém com maior frequência em condições com pouco oxigênio dissolvido na água.

Devido à grande importância como espécies invasoras, inúmeros trabalhos foram realizados acerca da biologia, ecologia e fisiologia visando ampliar os conhecimentos sobre esses animais e propor métodos eficazes para controle desses gastrópodes.

2.4.1. *Pomacea lineata* (SPIX, 1827)

A espécie *Pomacea lineata* (SPIX, 1827), figura 1, ocorre abundantemente na América do Sul e no Brasil, onde é nativa, principalmente na região da Mata Atlântica, de acordo com Hayes et al. (2009). Sua produção vem ganhando notoriedade e vem sendo utilizados como fonte de alimento, principalmente em regiões pobres, pois são ricos em proteínas, carboidratos, glicogênio e amino ácidos (JUNIOR et al., 2013). O gastrópode e sua desova são empregados na cura de doenças do “peito”, tais como tosse, asma e tuberculose nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (PESSÔA et al., 2007). Esses animais são geralmente encontrados em lagos, açudes, riachos e córregos intermitentes ou efêmeros, propensos a longos períodos de estiagem e depende de uma importante característica comum aos gastrópodes operculados, à estivação, estado de quiescência comportamental e parada metabólica que ocorre em resposta à seca e/ou a temperatura ambiente elevada, em vários vertebrados e invertebrados e pode estar associada a uma profunda depressão metabólica.

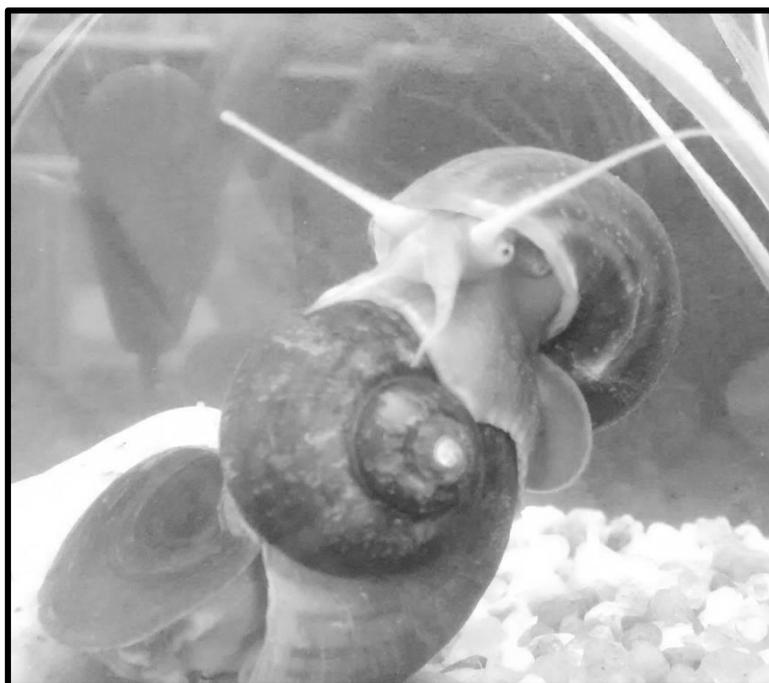


Figura 1 – Gastrópodes prosobrânquio, *Pomacea lineata*. (Fonte: próprio autor)

Os gastrópodes do gênero *Pomacea* possuem várias características comuns aos organismos bioindicadores: ciclo de vida longo, organismos grandes, de pouca mobilidade, fácil metodologia de coleta e amostragem, com custos relativamente baixos e sensíveis a diferentes concentrações de poluentes no meio. Diante disto, esses animais vêm sendo amplamente utilizados como possíveis organismos bioindicadores, e aqui no Brasil a espécie *P. lineata* tem se destacado nessas pesquisas. Portanto, trabalhos têm sido relatados na literatura, como os de Coler et al., (2005) e Melo et al., (2000).

Ressaltamos que Coler et al. (2005) propõe a utilização da espécie *P. lineata* como um valioso recurso para monitorar a qualidade água, como um organismo padrão para testes toxicológicos. Neste trabalho, apresentam dados que demonstram que o incremento de peso em moluscos neonatos é uma medida consistente que responde eficientemente ao estresse imposto por concentrações tóxicas subletais dos herbicidas Paraquate e Round-up. Ao término do estudo concluiu-se que para o Round-up todas concentrações após 192 horas de exposição apresentaram diminuição nas taxas de crescimento, enquanto para as mais baixas concentrações do Paraquate testadas houve um aumento no crescimento comparado ao controle. A utilização do *P. lineata* como agente para testes toxicológicos é igualmente proposta por Melo e colaboradores (2000), os autores destacam a importância dessa espécie por ser endêmica e abundante, principalmente na região Nordeste, que carece de recursos para quimicamente avaliar as ameaças representadas pelas ações antrópicas tanto na ecologia, quanto para a saúde pública em regiões rurais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do interferente endócrino bisfenol A nos parâmetros, reprodutivos, fisiológicos e comportamentais da espécie *Pomacea lineata* como organismo padrão para testes de toxicidade.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar ensaios toxicológicos agudos e crônicos em neonatos e adultos em várias concentrações de Bisfenol A;
- Determinar a CL₅₀ do BFA nos adultos e neonatos da espécie estudada;
- Estudar o efeito do BFA sobre a frequência cardíaca dos neonatos;
- Avaliar o efeito do BFA sobre o perfil bioquímico da hemolinfa dos animais adultos;
- Avaliar o efeito do interferente endócrino sobre características reprodutivas da espécie, como número cópulas e de desovas;
- Analisar os efeitos do BFA sobre parâmetros comportamentais e fisiológicos da espécie;
- Determinar se o BFA pode provocar alterações na taxa alimentar, massa corpórea e morfometria dos adultos;
- Avaliar a concentração de BFA em amostras de água do Rio Capibaribe;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCONCIA, F.; PALLOTTINI, V.; MARINO, M. Molecular Mechanisms of Action of BPA. **Dose-Response**, v. 13, n. 4, p. 1–9, 2015.

AZEVEDO, D. DE A. et al. Occurrence of nonylphenol and bisphenol-A in surface waters from Portugal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 532–537, 2001.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666. 2007.

BURELA, S.; MARTÍN, P. R. Nuptial feeding in the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). **Malacologia**, v. 49, n. 2, p. 465–470, 2007.

CAZZANIGA, N. J. Old species and new concepts in the taxonomy of *Pomacea* (Gastropoda: Ampullariidae). **Biocell**, v. 26, n. 1, p. 71–81, 2002.

COLER, R. A. et al. Applying weight gain in *Pomacea lineata* (SPIX 1824) (Mollusca: Prosobranchia) as a measure of herbicide toxicity. **Revista brasleira de biologia**, v. 65, n. 4, p. 617–623, 2005.

COWIE, R. H. E T. The Apple Snails of the Americas (Mollusca: Gastropa: Ampullariidae: *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa*, *Pomacea*, *Pomella*): A Nomeclatural and Type Catalog. **MALACOLOGIA**, v. 45, n. 1, p. 41–100, 2003.

COWIE, R. H.; HÉROS, V. Annotated catalogue of the types of Ampullariidae (Mollusca, Gastropoda) in the Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, with lectotype designations. **Zoosystema**, v. 34, n. 4, p. 793–824, 2012.

CPRH. Monitoramento da Bacia Hidrográfica do Capibaribe, abril de 2015. Disponível em: <http://www.cprh.pe.gov.br/monitoramento/bacias_hidrograficas/> Acesso em: 12/02/2016.

CRAIN, D. A., et al. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 225–239, 2007.

DARBY, P. C. A. Comparison of Sampling Techniques for Quantifying Abundance of the Florida Apple Snail (*Pomacea Paludosa* Say). **Journal Molluscan Studies**, v. 65, n. 2, p. 195–208, 1999.

DRAGOMIRESCU, A.; ANDONI, M.; CRAINA, M. Endocrine disrupting compounds in environment - A review. **Food, Agriculture and Environment**, v. 13, n. 1, p. 117–119, 2015.

ESTEBENET, A.L.; MARTIN, P. R. Workshop: “Biology of Ampullariidae” Minireview *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): Life-history. **BIOCELL**, v. 26, n. 1, p. 83–89, 2002.

FAN, Z. et al. Behaviors of glucocorticoids, androgens and progestogens in a municipal sewage treatment plant: Comparison to estrogens. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 7, p. 2725–2733, 2011.

FORBES, V. E. et al. Does bisphenol A induce superfeminization in *Marisa cornuarietis*? Part I: Intra- and inter-laboratory variability in test endpoints. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 3, p. 309–318, 2007.

FROEHNER, S. et al. Inputs of domestic and industrial sewage in upper Iguassu, Brazil identified by emerging compounds. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 215, n. 1-4, p. 251–259, 2011.

FUNAKOSHI, G.; KASUYA, S. Influence of an estuary dam on the dynamics of bisphenol A and alkylphenols. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 491–497, 2009.

GAVRILESCU, M. Environmental Biotechnology Research: Challenges and Opportunities in Latin America. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–36, 2010.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

HAMPL, R.; KUBÁTOVÁ, J.; STÁRKA, L. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, p. 217–223, 2016.

HAYES, K. A. et al. Molluscan models in evolutionary biology: apple snails (gastropoda: ampullariidae) as a system for addressing fundamental questions. **American Malacological Bulletin**, v. 27, p. 47–58, 2009.

HERAS, H. et al. Egg carotenoproteins in neotropical Ampullariidae (Gastropoda: Arquitaenioglossa). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and**

Pharmacology, v. 146, p. 158–167, 2007.

HIRANO, M. et al. Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. **Journal of Health Science**, v. 50, n. 1, p. 97–100, 2004.

HORGAN, F. G.; STUART, A. M.; KUDAVIDANAGE, E. P. Impact of invasive apple snails on the functioning and services of natural and managed wetlands. **Acta Oecologica**, v. 54, p. 90–100, 2012.

HSDB. Hazardous Substances Data Bank, U.S. National Library of Medicine, 2001. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~6Q0lvI:1>> Acesso em: 02/02/2016.

HUANG, H. et al. Detection of bisphenol A in food packaging based on fluorescent conjugated polymer PPESO₃ and enzyme system. **Food Chemistry**, v. 185, p. 233–238, 2015.

JOBLING, S. et al. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 66, n. 2, p. 207–222, 2004.

JUNIOR, E. S. et al. The effect of stocking density on the growth of apple snails native *Pomacea bridgesii* and exotic *Pomacea lineata* (Mollusca, Gastropoda). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, p. 753–760, 2013.

KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental science & technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.

KWONG, K. L. et al. Determinants of the distribution of apple snails in Hong Kong two decades after their initial invasion. **Malacologia**, v. 50, n. 1, p. 293–302, 2008.

LACH, L. et al. Food preference and reproductive plasticity in an invasive freshwater snail. **Biological Invasions**, v. 2, n. 4, p. 279–288, 2000.

MACIEL, D. C. et al. Avaliação da toxicidade dos sedimentos do sistema estuarino do rio capibaribe (Pernambuco, Brasil) utilizando o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* Volkmann Rocco (1973). **Tropical Oceanography**, v. 43, n 1, p. 26-37, 2015.

MARCIAL, H. S.; HAGIWARA, A.; SNELL, T. W. Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus Japonicus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 3025, 2003.

MELO, L. E. L. et al. Developing the gastropod *Pomacea lineata* (Spix, 1827) as a toxicity test organism. **Hydrobiologia**, v. 429, n. 1-3, p. 73–78, 2000.

MIHAICH, E. M. et al. Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 5, p. 1392–1399, 2009.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011.

MOREIRA, M. et al. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). **Environmental Technology**, v. 32, n. 12, p. 1409–1417, 2011.

OECD, 2010. Detailed Review Paper (DRP) on Molluscs Life-Cycle Toxicity Testing. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris (=Series on Testing and Assessment No. 121).

OEHLMANN, J. et al. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. **Ecotoxicology**, v. 9, n. 6, p. 383–97, 2000.

OEHLMANN, J. et al. Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n.1, p. 127–133, 2006.

OEHLMANN, J. et al. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2047–2062, 2009.

OEHLMANN, J.; OETKEN, M.; SCHULTE-OEHLMANN, U. A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. **Environmental Research**, v. 108, n. 2, p. 140–149, 2008.

PASCOE, D. et al. Toxicity of 17 α -Ethinylestradiol and Bisphenol A to the Freshwater Cnidarian *Hydra vulgaris*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 56–63, 2002.

PESSÔA, H. L. F. et al. Avaliação da toxicidade aguda, efeitos citotóxico e espasmolítico de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Caenogastropoda). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 76–84, 2007.

QUIRÓS, L. et al. Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water samples from portuguese rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 389, 2005.

RUBIN, B. S.; SOTO, A. M. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 304, n. 1-2, p. 55–62, 2009.

SEUFFERT, M. E.; MARTÍN, P. R. Dependence on aerial respiration and its influence on microdistribution in the invasive freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). **Biological Invasions**, v. 12, n. 6, p. 1695–1708, 17 set. 2009.

STRONG, E. E. Refining molluscan characters: Morphology, character coding and a phylogeny of the Caenogastropoda. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 137, n. 4, p. 447–554, 2003.

TANAKA, M. O.; SOUZA, A. L. T.; MÓDENA, É. S. Habitat structure effects on size selection of snail kites (*Rostrhamus sociabilis*) and limpkins (*Aramus guarauna*) when feeding on apple snails (*Pomacea spp.*). **Acta Oecologica**, v. 30, n. 1, p. 88–96, 2006.

THOMAIDIS, N. S.; ASIMAKOPOULOS, A. G.; BLETSSOU, A. A. Emerging contaminants: A tutorial mini-review. **Global Nest Journal**, v. 14, n. 1, p. 72–79, 2012.

TURNER, R. L. Effects of submergence on embryonic survival and developmental rate of the Florida Applesnail, *Pomacea paludosa*; implications for egg predation and marsh management. **Florida Scientist**, v. 61, p. 118 – 129, 1998.

VANDENBERG, L. N. et al. Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. **Reproductive Toxicology**, v. 38, p. 1–15, 2013.

YAMADA, K. et al. Constituents of organic pollutants in leachates from different types

of landfill sites and their fate in the treatment processes. **Journal of Japan Society on Water Environment**, v. 22, n. 1, p. 40–45, 1999.

YAMAMOTO, T. et al. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. **Chemosphere**, v. 42, n. 4, p. 415–418, 2001.

YUSA, Y.; WADA, T.; TAKAHASHI, S. Effects of dormant duration, body size, self-burial and water condition on the long-term survival of the apple snail, *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 41, n. 4, p. 627–632, 2006.

ZENG, G. et al. Adsorption behavior of bisphenol A on sediments in Xiangjiang River, Central-south China. **Chemosphere**, v. 65, n. 9, p. 1490–1499, 2006.

ZHANG, S. et al. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 1057–1069, 2007.

ZHOU, J.; ZHU, X. S.; CAI, Z. H. The impacts of bisphenol A (BPA) on abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) embryonic development. **Chemosphere**, v. 82, n. 3, p. 443–450, 2011.

1 **Artigo a ser submetido ao Período Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e**
2 **Zootecnia (Qualis A2)**

3
4 **Avaliação dos efeitos tóxicos do interferente endócrino Bisfenol A (BFA) em teste**
5 **de toxicidade aguda e crônica no gastrópode *Pomacea lineata***

6
7 **Toxic effect evaluation of endocrine disruptor Bisphenol A (BPA) in acute and**
8 **chronic toxicity tests in the *Pomacea lineata* gastropod**

9
10 André Lucas Correa de Andrade¹, Priscila Rafaela Leão Soares¹, Stephannie Caroline
11 Barros Lucas da Silva¹, Renata Barros Freitas¹, Thamiris Pinheiro Santos¹, Marília
12 Ribeiro Sales Cadena², Pierre Castro Soares³, Pabyton Gonçalves Cadena¹

13
14 ¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), Universidade Federal Rural
15 de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife - PE,
16 Brasil.

17 ²Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), Universidade Federal Rural de
18 Pernambuco. Fazenda Saco s/n, caixa postal 063, Serra Talhada – PE, Brasil.

19 ³Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal Rural de
20 Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife - PE,
21 Brasil.

22 * Autor para correspondência

23 Prof. Dr. Pabyton G. Cadena, Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal
24 (LECA), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros
25 s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil. Telefone: + 55 81 3320.6393, Fax:
26 +55 81 3320.6057. E-mail: pabyton.cadena@ufrpe.br

27 **Resumo**

28 Os interferentes endócrinos, como o bisfenol A (BFA), representam um risco quando
29 interagem com sistemas fisiológicos, causando alterações no desenvolvimento e
30 reprodução dos organismos expostos a essas substâncias. Diante do exposto, o presente
31 trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de BFA, através de testes de toxicidade
32 aguda e crônica, a partir de parâmetros fisiológicos, reprodutivos, comportamentais e
33 bioquímicos em neonatos e adultos de *Pomacea lineata*. Para determinação da
34 concentração letal (CL₅₀ 96 h) de BFA, adultos e neonatos foram divididos em 6 grupos

35 com 1, 5, 10, 15 e 20 mg/L de BFA e um controle, diluídos na água dos aquários. Após
36 96 horas a CL₅₀ nos adultos foi de 11,09 mg/L, adicionalmente foram visualizados efeitos
37 subletais como comportamentos letárgicos, sem respostas a estímulos mecânicos, nos
38 grupos com 15 e 20 mg/L, e aumento nos níveis da enzima aspartato aminotransferase
39 em concentração de 10 mg/L. Referente aos neonatos, a CL₅₀ 96 h foi de 3,14 mg/L,
40 adicionalmente foram observadas reduções significativas nas frequências cardíacas dos
41 grupos 15 e 20 mg/L. Para o teste de toxicidade crônica, com duração de 4 meses, animais
42 adultos foram submetidos a concentrações de 1 mg/L de estradiol (E₂), 10% (1 mg/L) e
43 50% (5 mg/L) da CL₅₀ 96 h de BFA obtida no teste agudo, e um grupo controle. Referente
44 aos resultados foram observados presença de comportamentos associados a reprodução,
45 como o ato de cópula nos grupos 1 e 5 mg/L de BFA e desovas no grupo controle. Na
46 análise comportamental, os grupos com 5 mg/L de BFA e 1 mg/L de estradiol exibiram
47 alterações das frequências de atos no estado inativo com diferenças significativas ($p <$
48 $0,05$) em comparação ao controle. Para os componentes do perfil bioquímico da
49 hemolinfa, não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
50 Diante dos resultados, o BFA se mostrou um potencial agente tóxico em relação aos
51 parâmetros fisiológicos, reprodutivos, comportamentais e bioquímicos de *Pomacea*
52 *lineata*, adicionalmente estes dados contribuem com o entendimento do modo de ação do
53 BFA em invertebrados.

54 *Palavras-Chaves:* Xenoestrogênio, BFA, gastrópode, comportamento animal, perfil
55 bioquímico.

56 **Abstract**

57 The endocrine disruptors, such as bisphenol A (BPA) may be a risk when they interact
58 with physiological systems, causing changes in the development and reproduction of
59 organisms exposed to these substances. Therefore, this study aimed to evaluate the effects
60 of BPA, by acute and chronic toxicity tests from physiological, reproductive, behavioral
61 and biochemical parameters in neonates and adults of *Pomacea lineata*. To determine the
62 lethal concentration (LC₅₀ 96h) of BPA, adults and neonates were divided into 6 groups
63 with 1, 5, 10, 15 and 20 mg/L of BPA and a control, diluted in the water. After 96 hours
64 the LC₅₀ in adults was 11.09 mg/L, in addition sublethal effects were visualized as
65 lethargic behavior without response to mechanical stimuli, in groups of 15 and 20 mg/L,
66 and increased levels of the enzyme aspartate aminotransferase in the highest
67 concentration of BPA. Referring to neonates, the LC₅₀ 96h was 3.14 mg/L, additionally
68 were observed significant reductions in cardiac frequency in groups 15 and 20 mg/L. For

69 the chronic toxicity test, which lasted 4 months, adults animals were submitted to
70 concentrations of 1 mg/L of estradiol (E₂), 10% (1 mg/L) and 50% (5 mg/L) of the LC₅₀
71 96 h of BPA obtained in the acute test, and a control group. Relative to results, were
72 observed presence of behaviors associated with reproduction, such the act of copulation
73 in the groups 1 and 5 mg/L of BFA and spawns in the control group. In behavioral
74 analysis, groups with 5 mg/L of BPA and 1 mg/L of E₂ exhibited changes in acts of
75 frequencies in the inactive state with significant differences ($p < 0.05$) compared to
76 control. For the components of the biochemical profile of hemolymph, there were no
77 significant differences by Tukey test ($p > 0.05$). Based on the results, BPA has proved a
78 toxic agent potential in relation to physiological parameters, reproductive, behavioral and
79 biochemical of *Pomacea lineata*, in addition these data contribute to the understanding of
80 BPA's mode of action in invertebrates.

81 *Keywords:* Xenoestrogen, BPA, gastropod, animal behavior, biochemical profile.

82 **1. Introdução**

83 A presença de substâncias sintéticas ou naturais no ambiente, conhecidas como
84 interferente endócrinos (IE), representam um grave risco quando interagem com sistemas
85 fisiológicos. Estes podem afetar diretamente a biossíntese hormonal e metabolismo,
86 provocando alterações no desenvolvimento e reprodução dos organismos expostos a essas
87 substâncias (Hampl *et al.*, 2016). Dentre os IE, o bisfenol A (BFA) é considerado uma
88 substância sintética capaz de provocar interferência em receptores hormonais em diversos
89 organismos. Este é um componente de policarbonatos e outros plastificantes, incluindo
90 resinas que revestem recipientes de alimentos e bebidas, podendo ser liberado por estes e
91 facilmente ingerido (Dragomirescu *et al.*, 2015). Além disso, sua produção industrial é
92 em larga escala e o consumo global excedeu 5,5 milhões de toneladas métricas em 2011
93 (Flint *et al.* 2012).

94 Diante da abundante produção e contínuo descarte, o BFA é considerado ubíquo
95 no ambiente e conseqüentemente pode ser um risco para biota aquática. De acordo com
96 Dragomirescu *et al.*, (2015), o BFA é um xenoestrógeno que pode mimetizar a atividade
97 do estradiol (E₂) através das ligações com receptores de estrógeno, mesmo possuindo
98 poucas semelhanças estruturais. Contudo, o BFA exhibe 1000 a 2000 vezes menos
99 afinidade para os receptores que o E₂, o estrogênio mais ativo (Acconcia *et al.*, 2015).
100 Mesmo sendo considerado um estrógeno fraco no ambiente, foi confirmado que o BFA

101 pode estimular respostas celulares semelhantes ao estradiol em baixas concentrações
102 (Rubin e Soto, 2009).

103 A partir do exposto, pesquisas tem-se esforçado para entender o modo de ação e
104 efeito tóxico do BFA em diferentes tipos de organismos. Entre as pesquisas, em testes
105 realizados com gastrópode de água doce (*Marisa cornuarietis*), foi verificado o efeito do
106 BFA como IE, causando alterações e malformações nos órgãos reprodutores femininos
107 desta espécie (Oehlmann *et al.* 2006). Este resultado demonstra que o BFA é capaz de
108 interferir e provocar efeitos adversos na reprodução de gastrópodes, apesar que o modo
109 exato da ação do BFA ainda não foi completamente esclarecido (OECD, 2010).

110 O efeito da toxicidade aguda do BFA tem sido relatado em algumas espécies de
111 invertebrados, como *Chironomus tentans*, *Daphnia magna*, *Tigriopus japonicus* e *Hydra*
112 *vulgaris* (Pascoe *et al.*, 2002; Marcial *et al.*, 2003; Hirano *et al.*, 2004). No entanto, poucos
113 dados estão disponíveis sobre a toxicidade do BFA em outras espécies de gastrópodes
114 (Zhou *et al.*, 2011), por exemplo o gênero *Pomacea*, que possui grande importância
115 ecológica e econômica. Os gastrópodes deste gênero, são considerados bons organismos
116 bioindicadores, por dispor de várias características vantajosas como: grande porte, pouca
117 mobilidade, alta distribuição em regiões tropicais, fácil metodologia de coleta e
118 amostragem, custos relativamente baixos de manutenção e são sensíveis a diferentes
119 concentrações de poluentes no meio.

120 Diante do apresentado, pesquisas que analisam os efeitos do BFA como IE em
121 invertebrados, são necessárias para elucidar e compreender melhor as formas de atuação
122 deste composto em organismos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os
123 efeitos da toxicidade aguda e crônica do BFA em parâmetros biológicos de *P. lineata* e
124 propor a utilização desta espécie como modelo animal para testes com IE.

2. Materiais e Métodos

125 Os animais utilizados nos experimentos foram coletados nos tanques
126 experimentais da Estação de Aquicultura Continental Professor Johei Koike –
127 Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e
128 posteriormente transferidos para aquários no Laboratório de Ecofisiologia e
129 Comportamento Animal - LECA do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
130 (DMFA) da mesma instituição, onde passaram por um período de aclimação.

131 Todas as metodologias realizadas neste trabalho foram aprovadas pela Comissão
132 de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA –
133 UFRPE) com o número da licença 094/2014. Para todos os testes, os espécimes adultos

134 foram mantidos em aquários de 10 litros e os neonatos em reservatórios contendo 1 L,
135 com densidade ideal de animais por litro, para os testes agudo e crônico. Os recipientes
136 possuíam aeração artificial (11 mg/L de OD), apenas nos aquários dos indivíduos adultos,
137 e foram mantidos em temperatura ambiente constante (26 ± 1 °C). Uma vez por semana
138 foi realizada a lavagem e renovação completa da água dos aquários, mantendo as mesmas
139 condições experimentais. Os experimentos foram realizados com fotoperíodo
140 claro/escuro igual (12:12 h), a água foi tratada com tiosulfato de sódio para a redução
141 dos níveis de cloro e hidróxido de sódio para a manutenção do pH em 7.0.

142 Para os ensaios de toxicidade aguda, foram realizados testes preliminares para
143 determinação das concentrações escolhidas. Animais neonatos, após a eclosão, e adultos
144 da espécie foram selecionados aleatoriamente. Todos os animais utilizados no
145 experimento foram aclimatados por quatro dias, sem alimentação nesse período e durante
146 o teste, pois respondem com maior sensibilidade aos experimentos (Melo *et al.*, 2000).
147 Após o período de aclimação, 120 animais adultos (com peso: $6,86 \pm 2,7$ g,
148 comprimento total (CT): $3,10 \pm 0,41$ cm e largura total (LT): $2,15 \pm 0,25$) foram divididos
149 em seis grupos (n = 10 por tratamento), um controle e cinco concentrações entre 1, 5, 10,
150 15 e 20 mg/L de BFA, realizado em duplicata, em sistema estático. Adicionalmente, com
151 intuito de observar possíveis alterações subletais causadas pelo BFA, o comportamento
152 dos adultos foi analisado (veja abaixo para mais detalhes) através de um etograma
153 previamente construído (Anexo 1) e ao final do teste, a hemolinfa dos animais
154 sobreviventes foi coletada para análises bioquímicas (veja abaixo para mais detalhes).

155 Referente ao teste agudo nos neonatos, foi utilizado o mesmo delineamento
156 experimental do teste nos adultos, em relação a quantidade de animais, grupos,
157 concentrações de BFA, repetições e sistema. Para avaliar possíveis efeitos subletais, a
158 frequência cardíaca dos neonatos foi analisada em triplicata, com intervalos de um minuto
159 por observação, sendo mensurado a média de batimentos por minutos (bpm). Com auxílio
160 de um estereomicroscópio com luz clara foi possível a visualização do coração através da
161 concha de forma não invasiva.

162 A taxa de sobrevivência dos animais adultos e neonatos foram avaliadas
163 diariamente durante 96 horas para determinar a concentração letal em 50% dos indivíduos
164 (CL₅₀). Os dados coletados foram analisados utilizando o método de análise de probit
165 com ajuda do Software Biostat Pro versão 5.9.8, para o cálculo da CL₅₀. Baseado dos
166 resultados obtidos para os efeitos subletais, como comportamento e análise da hemolinfa
167 nos adultos e frequência cardíaca nos neonatos, foi possível determinar a concentrações

168 de efeito não observado (CENO), ou seja, a maior concentração de BFA que não
169 provocou alterações nos animais estudados.

170 A toxicidade crônica de BFA em animais adultos de *P. lineata* foi avaliada
171 durante quatro meses em um sistema semi-estático, com lavagem completa dos aquários
172 uma vez por semana e reposição das respectivas concentrações de BFA dissolvidas na
173 água. Foram selecionados 60 animais (com peso: $7,05 \pm 2,18$ g, comprimento total (CT):
174 $3,17 \pm 0,30$ cm e largura total (LT): $2,25 \pm 0,25$) divididos em 4 grupos (n = 15 para cada
175 tratamento), um grupo controle, um controle positivo com 1 mg/L de estradiol (E₂), e
176 grupos com 1 mg/L e 5 mg/L de BFA, de acordo com 10% e 50% do resultado da CL₅₀
177 obtida no teste agudo. Os animais foram alimentados diariamente com 0,5 g de alface
178 (*Lactuca sativa*) por indivíduo presente no aquário.

179 Os parâmetros avaliados durante o teste crônico foram a contagem do número
180 de desovas, média de ovos por desova, avaliação comportamental, massa corpórea e
181 morfometria, consumo alimentar e perfil bioquímico da hemolinfa.

182 Para as observações comportamentais, foi utilizado um etograma construído
183 previamente (Anexo 1), subdividido entre atos comportamentais do estado Ativo (com as
184 categorias *Alimentação*, *Locomoção*, *Manutenção*, *Social e Defesa*) e Inativo (com a
185 categoria *Repouso*). As observações comportamentais foram realizadas através do
186 método de varredura instantânea - *scan sampling* (Altmann 1974). Adicionalmente, os
187 aquários foram divididos em dois quadrantes (superior e inferior), para o cálculo da
188 preferência de distribuição no aquário. As observações tiveram duração de 40 minutos no
189 teste agudo e 30 minutos no teste crônico, com um minuto de observação comportamental
190 e um minuto de intervalo. Para reduzir a possibilidade de alteração comportamental nos
191 animais, não foram realizados procedimentos antes das observações, incluindo a retirada
192 do alimento colocado no dia anterior e animais mortos.

193 Para análise da morfometria das conchas dos gastrópodes foi utilizado um
194 paquímetro analítico medindo os seguintes parâmetros da concha: comprimento total
195 (CT), largura total (LT), comprimento da abertura (CA) e largura da abertura (LA), uma
196 vez por mês. A determinação da massa corpórea dos animais foi realizada uma vez por
197 semana, após a manutenção dos aquários, em uma balança analítica, após as conchas
198 serem completamente secas com papel filtro. O consumo alimentar foi calculado
199 diariamente a partir da diferença do peso inicial (0,5 g de alface por animal) pelo peso
200 final no dia seguinte.

201 Para coleta da hemolinfa, foi realizado uma pequena abertura na região acima da

202 cavidade pericardial e com auxílio de uma seringa de 1 mL, a hemolinfa foi obtida através
 203 de pulsação cardíaca. Em seguida, as amostras de hemolinfa foram centrifugadas em 1500
 204 g por 10 minutos e retirado o plasma. No teste agudo, foi realizado um pool, em triplicata,
 205 com a hemolinfa de todos animais sobreviventes por cada grupo, para obter maiores
 206 volumes. No teste crônico, cada amostra de hemolinfa por animal foi analisada
 207 individualmente. As análises bioquímicas foram realizadas em um analisador automático
 208 para testes bioquímicos (Labmax 240) seguindo instruções do fabricante, para
 209 determinação dos níveis de Aspartato aminotransferase (Ref. 109), Gama GT (Ref. 105),
 210 Fosfatase alcalina (Ref. 79), Albumina (Ref. 19), Creatinina (Ref. 96), Proteínas totais
 211 (Ref. 99), Colesterol (Ref. 76), Triglicérides (Ref. 87), Uréia (Ref. 104) e Ácido úrico
 212 (Ref. 73).

213 Os resultados foram comparados por *One way* ANOVA. Quando a diferença foi
 214 significativa, as médias foram comparadas utilizando o Teste de Tukey com $p < 0,05$
 215 através do software Origin Pro 2015 Academic (Origin Lab Corporation, EUA).

216 3. Resultados

217 No teste agudo dos neonatos, as taxas de mortalidade foram 0%, 10%, 85%, 100%,
 218 100%, 100% no final das 96 horas, para os animais do grupo controle e nos tratamentos
 219 com 1, 5, 10, 15, 20 mg/L de bisfenol A, respectivamente. Baseado nesses resultados, a
 220 CL_{50} em 96 horas para os neonatos expostos ao BFA foi determinada em 3,14 mg/L (-
 221 1,08 – 7,35 mg/L) com 95% de intervalo de confiança (Tabela 1A).

222

223 Tabela 1. Concentração letal para 48 e 96 horas em neonatos e adultos de *Pomacea lineata*.

| CL ₅₀ para neonatos (A) | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------------------|------|------------------------|---------------------------|---------------------------|------|----------|
| 48 Horas | | | | 96 Horas | | | |
| CL ₅₀ (CI 95%) | CL ₉₀ (CI 95%) | G.L. | χ^2 | CL ₅₀ (IC 95%) | CL ₉₀ (CI 95%) | G.L. | χ^2 |
| 7,36 (2,46 – 12,27) | 12,48 | 3 | 8,14x10 ³⁰ | 3,14 (-1,08 – 7,35) | 9,93 | 3 | 0,046 |
| CL ₅₀ para adultos (B) | | | | | | | |
| 48 Horas | | | | 96 Horas | | | |
| CL ₅₀ (CI 95%) | CL ₉₀ (CI 95%) | G.L. | χ^2 | CL ₅₀ (IC 95%) | CL ₉₀ (CI 95%) | G.L. | χ^2 |
| 22,75 (18,71 – 26,80) | 34,21 | 3 | 2,00x10 ¹⁶⁰ | 11,09 (8,75 – 13,43) | 15,63 | 3 | 15,63 |

CL₅₀ ou CL₉₀ (CI95%) – Concentração letal e intervalo de confiança em 95%.

D.F. – Grau de liberdade. χ^2 – Chi-quadrado. N = 100 por teste.

224

225 Em relação a frequência cardíaca dos neonatos durante o intervalo do teste agudo,
 226 os resultados são apresentados na Tabela 2. No grupo com 10 mg/L, a frequência cardíaca
 227 em 0 h ($80,5 \pm 7,47$ bpm) foi estatisticamente semelhante ao controle, no entanto em 24
 228 h houve uma redução ($49,83 \pm 21,43$ bpm) apresentando diferença significativa ($p < 0,05$)
 229 em relação ao controle. Para os grupos com 15 e 20 mg/L, só foi possível realizar a
 230 observação da frequência cardíaca em 0 h ($21,17 \pm 14,36$ e $22,42 \pm 17,85$ bpm,
 231 respectivamente) ambas apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao
 232 controle. Após as 24 h os grupos 15 e 20 mg/L apresentaram 100% de mortalidade.

233 Diante dos resultados obtidos, em relação aos efeitos letais e subletais do BFA nos
 234 neonatos, a concentração de efeito não observado (CENO) no presente teste foi estimada
 235 em 1 mg/L de BFA. Devido a mortalidade de apenas 10% no grupo com essa
 236 concentração e não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na frequência
 237 cardíaca deste grupo em relação ao grupo controle.

238

239 Tabela 2. Frequência cardíaca de neonatos expostos a BFA durante o teste agudo (96 horas)

| | Frequência Cardíaca (bpm) | | | | | |
|------|---------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Controle | 1 mg/L | 5 mg/L | 10 mg/L | 15 mg/L | 20 mg/L |
| 4 h | $82,08 \pm 15,2$ | $83,25 \pm 6$ | $72,17 \pm 5,86$ | $80,5 \pm 7,47$ | $21,17 \pm 14,36^*$ | $22,42 \pm 17,85^*$ |
| 24 h | $84,92 \pm 10,19$ | $73,08 \pm 6,16$ | $73,17 \pm 10,50$ | $49,83 \pm 21,43^*$ | - | - |
| 48 h | $75,58 \pm 10,69$ | $79,58 \pm 6,56$ | $72,17 \pm 8,98$ | - | - | - |
| 72 h | $59,42 \pm 6,64$ | $69,83 \pm 6,6^*$ | $47,78 \pm 14,68^*$ | - | - | - |
| 96 h | $53,17 \pm 5,06$ | $60,42 \pm 11,8$ | $59,11 \pm 4,08$ | - | - | - |

240 * Resultado com diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

241

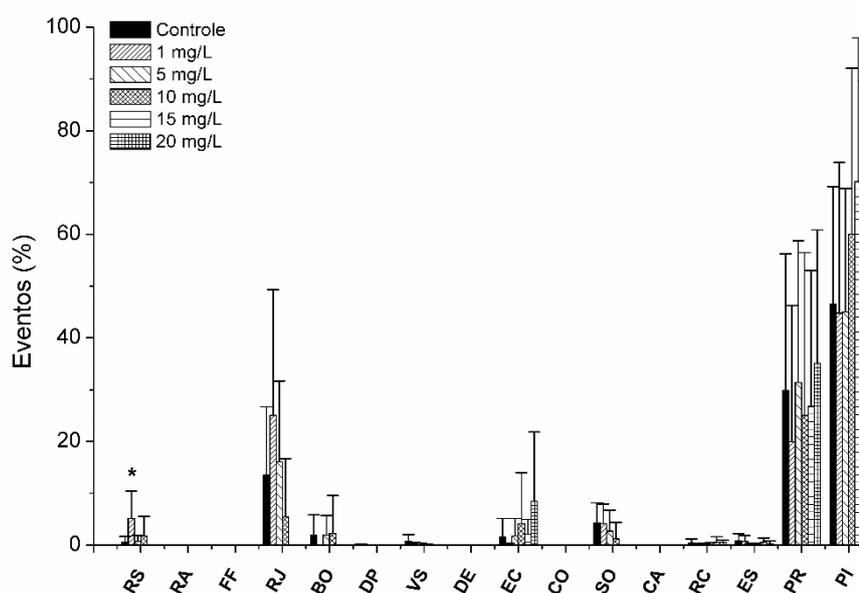
242 No teste agudo dos animais adultos, a mortalidade em 96 horas foi 10%, 0%, 50%,
 243 30%, 100%, 100% nos grupos controle, 1, 5, 10, 15, 20 mg/L de bisfenol A,
 244 respectivamente. De acordo com esses resultados a CL_{50} 96 h para os adultos foi 11,09
 245 mg/L ($8,75 - 13,43$) com 95% de intervalo de confiança (Tabela 1B).

246 Os resultados relativos as observações comportamentais são apresentadas no
 247 gráfico da Figura 1. Durante as 96 horas, o total de tempo gasto pelos animais no estado
 248 Inativo foi predominante em todos os grupos comparado ao estado Ativo, com uma
 249 frequência de 76,3%, 64,7%, 76,5%, 85%, 96,9% e 90,8%, nos grupos controle, 1, 5,
 250 10, 15 e 20 mg/L, respectivamente. Por conseguinte, todos os grupos exibiram os dois
 251 atos da categoria Repouso (*permanecer retraído* e *permanecer imóvel*) que representam

252 o estado Inativo, no entanto não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nestes atos
253 em relação aos grupos submetidos ao BFA e o controle. O ato *permanecer imóvel* foi
254 mais presente no controle e nos grupos experimentais (com $44,8 \pm 29,1\%$ até $70,2 \pm$
255 $27,8\%$), todavia diferenças significativas não foram encontradas ($p > 0,05$).

256 Em relação aos atos do estado Ativo, os grupos com 15 e 20 mg/L de BFA
257 apresentaram atos apenas nas categorias Manutenção (*estender da concha*) e Defesa
258 (*retrair na concha e estender apenas o sifão*), enquanto os grupos controle, 1, 5 e 10
259 mg/L exibiram atos em todas categorias. O ato mais observado do estado Ativo foi *rastejar*,
260 da categoria Movimento (variou de $5,4 \pm 11,3\%$ até $25,1 \pm 24,2\%$) porém não houve
261 diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos controle e experimentais. Na categoria
262 Alimentação, apenas o ato *raspar superfícies* foi observado e o grupo com 1 mg/L de
263 BFA ($5,1 \pm 5,3\%$), quando comparado ao controle ($0,5 \pm 1,1\%$), apresentou diferença
264 significativa ($p < 0,05$). Nas demais categorias não foram encontradas diferenças
265 significativas dos grupos com BFA e controle. Adicionalmente os atos *raspar alimento*,
266 *formar funil*, *defecar*, *copular* e *canibalizar* não foram exibidos durante a análise
267 comportamental.

268 No quesito da preferência de distribuição espacial no aquário, todos os grupos
269 exibiram a maior parte dos atos comportamentais no quadrante inferior. Todavia, houve
270 um aumento do tempo gasto nesta área nas maiores concentrações de BFA. O tempo
271 gasto no quadrante inferior variou entre $61,7 \pm 23,7\%$ (grupo controle) até 100%
272 (grupos com 15 e 20 mg/L de BFA), apresentando diferença significativa ($p < 0,05$)
273 destes grupos quando comparado ao controle.



274

275 Figura 1: Análise comportamental de *P. lineata*, submetidos a diferentes concentrações de Bisfenol A
 276 durante 96 h. Para os eventos são mostrados: RS = Raspar superfícies, RA = Raspar alimento, FF = Formar
 277 funil, RJ = Rastejar, BO = Boiar, DP = Desprender, VS = Ventilar com sifão, DE = Defecar, EC =
 278 Estender-se da concha, CO = Copular, SO = Subir em outro, CA = Canibalizar, RC = Retrair-se na
 279 concha, ES = Estender o sifão, PR = Permanecer retraído na concha, PI = Permanecer imóvel no substrato.
 280 * Resultado com diferenças significativas pelo Teste de Tukey em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

281

282 Os resultados da análise bioquímica da hemolinfa, após as 96 horas de exposição
 283 ao BFA, são apresentados na Tabela 3. Entre todos os grupos o componente analisado
 284 mais presente na hemolinfa foram as proteínas totais, porém não foi observado diferenças
 285 significativas entre os grupos. Em relação aos demais componentes da hemolinfa, apenas
 286 o aspartato aminotransferase apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com um
 287 aumento no nível desta enzima no grupo com 10 mg/L de BFA ($80,3 \pm 12,6$ u/L) quando
 288 comparado ao grupo controle ($45,2 \pm 1,2$ u/L).

289

290 A partir dos resultados descritos acima, nos animais adultos a concentração de
 291 efeito não observado (CENO) foi estimada em 1 mg/L de BFA. Baseado na ausência de
 292 mortalidade e diferenças significativas ($p > 0,05$) nos níveis dos componentes
 293 bioquímicos da hemolinfa, no grupo submetido a esta concentração.

293

294 Tabela 3. Componentes bioquímicos da hemolinfa de *P. lineata* submetidos a diferentes concentrações (1,
295 5 e 10 mg/L e controle) de Bisfenol A após 96 h em ensaio toxicidade aguda.

| | Controle | 1 mg/L | 5 mg/L | 10 mg/L |
|----------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Aspartato aminotransferase (u/L) | 45,21 ± 1,19 | 51,40 ± 5,29 | 31,52 ± 8,79 | 80,30 ± 12,45* |
| γ-glutamil trasferase (u/L) | 21,39 ± 3,93 | 16,48 ± 1,51 | 16,96 ± 5,58 | 16,45 ± 2,57 |
| Fosfatase alcalina (u/L) | 4,42 ± 3,05 | 5,54 ± 0,08 | 1,11 ± 0,99 | 4,37 ± 1,96 |
| Albumina (mg/L) | 836 ± 25,17 | 453 ± 70,24 | 256 ± 250,27 | 800 ± 713,58 |
| Creatinina (mg/L) | 2,03 ± 0,16 | 1,85 ± 0,31 | 1,64 ± 0,15 | 1,76 ± 0,02 |
| Proteínas totais (mg/L) | 7250 ± 759,4 | 3150 ± 1270,47 | 2993 ± 3692,82 | 4630 ± 3308,35 |
| Colesterol (mg/L) | 166,26 ± 4,01 | 163,35 ± 19,26 | 165,24 ± 19,01 | 159,77 ± 6,22 |
| Triglicérides (mg/L) | 21,07 ± 6,47 | 20,21 ± 11,62 | 16,01 ± 13,96 | 10,80 ± 8,55 |
| Uréia (mg/L) | 247,1 ± 46,74 | 200,56 ± 12,36 | 198,89 ± 59,02 | 182,55 ± 5,73 |
| Ácido úrico (mg/L) | 0,60 ± 0,32 | 0,32 ± 0,11 | 25,06 ± 28,47 | 5,06 ± 3,31 |

* Resultado com diferenças significativas pelo Teste de Tukey em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

296
297

298 Durante os quatro meses do teste crônico, as características reprodutivas foram
299 observadas diariamente. Em relação ao ato comportamental de cópula, foi contado o
300 número de vezes que eram visualizados este ato, tanto no período das observações
301 comportamentais quanto fora deste período. Assim, o ato de cópula foi visualizado 11 e
302 12 vezes apenas nos grupos com 1 e 5 mg/L de BFA, respectivamente. Contudo, somente
303 no grupo controle houve desovas após o início do teste, com um total de 4. Destas desovas
304 foram mensurados a média de ovos por desovas ($129,7 \pm 6,4$) e o número médio de
305 nascimento por desovas ($93,8 \pm 5,1$).

306 Referente as análises comportamentais, os dados estão presentes no gráfico da
307 Figura 2. A maior parte do tempo gasto pelos animais de todos os grupos foi em atos no
308 estado Inativo, com uma frequência de 75,9%, 69%, 79,2% e 72,5% nos grupos controle,
309 1 mg/L de E₂, 1 e 5 mg/L de BFA. O ato *permanecer retraído* foi o mais exibido em
310 todos os grupos, porém no grupo com 1 mg/L de E₂ ($39,5 \pm 18\%$) e o grupo 5 mg/L de
311 BFA ($43,5 \pm 15,1\%$), ambas frequências menores e significativamente ($p < 0,05$)
312 diferentes, quando comparado ao grupo controle ($57,3 \pm 14,8\%$). Por outro lado, no ato
313 *permanecer imóvel* os grupos 1 mg/L de E₂ ($29,5 \pm 14,3\%$) e 5 mg/L de BFA ($29 \pm 18\%$,
314 apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) relacionado ao controle ($18,6 \pm$
315 $12,8\%$).

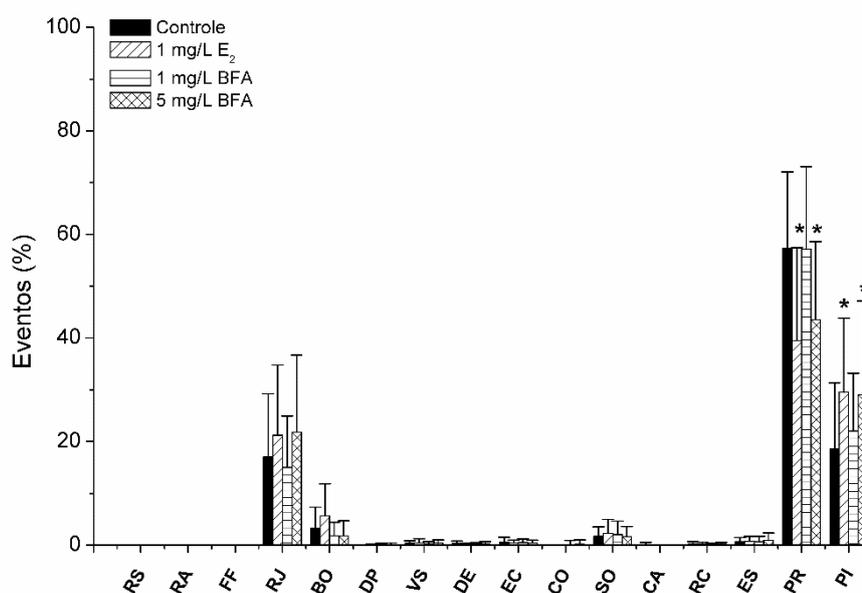
316 Relacionado aos atos comportamentais do estado Ativo, a categoria Alimentação
317 foi a única que não foi exibida pelos animais em todos os grupos, durante o período das

318 observações. Os atos da categoria Locomoção, *rastejar* e *boiar* foram os mais
319 apresentados por todos grupos no estado Ativo. Contudo, diferenças significativas não
320 foram encontradas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais e o controle. Na categoria
321 Social o ato *subir em outro* foi o ato mais exibido (variou de $1,7 \pm 1,8\%$ a $2,2 \pm 2,7\%$) e
322 o ato *copular* foi observado apenas nos grupos de 1 mg/L ($0,1 \pm 0,8\%$) e 5 mg/L ($0,2 \pm$
323 $0,8\%$) de BFA. O ato *canibalizar* foi exibido somente uma vez durante todo
324 experimento no grupo controle, devido a presença de um animal morto no período das
325 observações. Nenhum ato da categoria Social apresentou diferenças significativas ($p >$
326 $0,05$). Os atos das categorias Manutenção e Defesa foram pouco exibidos por todos os
327 grupos, não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$).

328 Em relação a distribuição espacial nos aquários, todos os grupos exibiram
329 preferência ao quadrante inferior. Foi apresentado uma frequência de $73,8 \pm 14,3\%$, 60
330 $\pm 21,3\%$, $77,4 \pm 12,1\%$ e $66,8 \pm 18,6\%$ nos grupos controle, 1 mg/L de E₂, 1 e 5 mg/L
331 de BFA, respectivamente. O grupo com 1 mg/L de E₂, que teve a menor frequência de
332 atos no quadrante inferior, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao
333 controle.

334 Ao término do teste crônico a variação da massa corpórea e as medidas
335 morfométricas inicial e final, para todos os grupos, não demonstraram diferenças
336 significativas ($p > 0,05$). Adicionalmente, durante todo experimento não houve diferenças
337 significativa ($p > 0,05$) em relação ao consumo alimentar entre os grupos. Toda
338 alimentação fornecida diariamente foi consumida em menos de 24 horas.

339



340

341 Figura 2: Análise comportamental de *P. lineata*, submetidos a diferentes concentrações de Bisfenol A
 342 durante 4 meses. Para os eventos são mostrados: RS = Raspar superfícies, RA = Raspar alimento, FF =
 343 Formar funil, RJ = Rastejar, BO = Boiar, DP = Desprender, VS = Ventilar com sifão, DE = Defecar, EC
 344 = Estender=se da concha, CO = Copular, SO = Subir em outro, CA = Canibalizar, RC = Retrair=se na
 345 concha, ES = Estender o sifão, PR = Permanecer retraído na concha, PI = Permanecer imóvel no substrato.
 346 * Resultado com diferenças significativas pelo Teste de Tukey em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

347

348 Após os quatros meses de experimento, os resultados referentes ao perfil
 349 bioquímico da hemolinfa são apresentados na Tabela 4. Não foram encontradas
 350 diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os componentes da hemolinfa entre os grupos
 351 experimentais e controle. As proteínas totais foram o componente mais abundante na
 352 hemolinfa em todos os grupos, seguido de albumina, ureia, colesterol e ácido úrico.

353

354 Tabela 4. Componentes bioquímicos da hemolinfa de *P. lineata* submetidos a diferentes concentrações de
 355 Bisfenol A (BFA) e Estradiol (E₂) durante 4 meses de experimento em teste de toxicidade crônica.

| | Controle | 1 mg/L de E ₂ | 1 mg/L de BFA | 5 mg/L de BFA |
|----------------------------------|----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| Aspartato aminotransferase (u/L) | 198,53 ± 86,84 | 306,8 ± 217,72 | 278,43 ± 143,13 | 213,49 ± 140,96 |
| γ-glutamil trasferase (u/L) | 15,85 ± 9,07 | 17,42 ± 7,68 | 14,16 ± 7,42 | 12,46 ± 10,84 |
| Fosfatase alcalina (u/L) | 1,30 ± 2,9 | 26,28 ± 65,26 | 3,89 ± 4,61 | 1,04 ± 1,80 |
| Albumina (mg/L) | 816 ± 673,74 | 591,25 ± 474,2 | 692,85 ± 709,43 | 746,67 ± 804,14 |
| Creatinina (mg/L) | 1,84 ± 0,64 | 1,79 ± 0,52 | 2,13 ± 0,20 | 1,88 ± 0,24 |

| | | | | |
|-------------------------|----------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Proteínas totais (mg/L) | 7512 ± 6641,07 | 5088,75 ± 4787,07 | 6478,57 ± 6247,68 | 7930 ± 6677,87 |
| Colesterol (mg/L) | 183,73 ± 23,20 | 183,90 ± 18,06 | 178,69 ± 15,35 | 175,63 ± 21,5 |
| Triglicérides (mg/L) | 6,02 ± 6,5 | 26,82 ± 42,88 | 13,90 ± 14,96 | 20,89 ± 12,43 |
| Uréia (mg/L) | 204,38 ± 48,85 | 221,42 ± 52,57 | 214,29 ± 41,66 | 155,30 ± 63,62 |
| Ácido úrico (mg/L) | 155,13 ± 96,26 | 110,08 ± 115,46 | 106,89 ± 68,28 | 63,23 ± 42,75 |

* Resultado com diferenças significativas pelo Teste de Tukey em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

356

357

358 4. Discussão

359 De acordo com os resultados obtidos a partir dos testes agudos e crônicos, a ação
 360 do bisfenol A na espécie *Pomacea lineata* provocou alterações nos parâmetros avaliados.
 361 Apresentaram efeitos letais e subletais, como modificações comportamentais, redução da
 362 frequência cardíaca, alterações na reprodução e nos níveis bioquímicos de enzimas
 363 metabólicas. Adicionalmente, outros estudos relataram efeitos adversos provocados pelo
 364 BFA, principalmente relacionados ao desenvolvimento e reprodução em invertebrados e
 365 vertebrados. Dentre estes, concentrações de BFA em gastrópodes (*Marisa cornuarietis*)
 366 induziram formação de órgãos femininos adicionais, aumento de glândulas sexuais e
 367 malformação no oviduto (Oehlmann et al., 2006).

368 Neste mesmo sentido, a exposição ao BFA em microcrustáceo (*Daphnia magna*)
 369 provocou redução na fecundidade das fêmeas (Mu et al., 2005). Já em neonatos de
 370 zebrafish foi observado a feminização após o consumo de ração contendo BFA durante
 371 45 dias (Drastichová et al., 2005). Entretanto, Flint et al. (2012) afirmam que existem
 372 relativamente poucos estudos que analisaram o efeito do BFA na fauna e especificamente
 373 poucos dados estão disponíveis sobre seus efeitos em gastrópodes (Zhou et al., 2011).

374 No presente teste de toxicidade aguda em neonatos a CL₅₀ 48 e 96 h foi 7,4 e 3,1
 375 mg/L e em adultos CL₅₀ 48 e 96 h foi 22,8 e 11,1 mg/L, respectivamente. Nossos
 376 resultados, principalmente dos neonatos, estão de acordo com os encontrados em testes
 377 com outras espécies de invertebrados. Como os valores encontrados por Mihaich et al.
 378 (2009), para CL₅₀ 96 h foi 2,25 e 2,7 mg/L de BFA, em gastrópode prosobrânquio (*Marisa*
 379 *cornuarietus*) e em larva de mosquito (*Chironomus tentans*), respectivamente. Em
 380 microcrustáceos a CL₅₀ 96 h foi 1,03 mg/L na espécie *Americamysis bahia* (Hirano et al.,
 381 2004), na espécie *Daphnia magna* a CL₅₀ 48 h variou entre 10 a 16 mg/L (Alexander et
 382 al., 1988; Ike et al. 2002; Mu et al., 2005) e 4,32 mg/L na espécie *Tigriopus japonicus*
 383 (Marcial et al., 2003). Na espécie de cnidário de água doce (*Hydra vulgaris*) a CL₅₀ 96 h
 384 foi 6,9 mg/L (Pascoe et al. 2002). Diante do exposto, os neonatos de *P. lineata*

385 apresentaram maior sensibilidade ao BFA em relação aos animais adultos e foram
386 similares quando comparados as espécies padrões para testes toxicológicos citadas. Desta
387 forma, a utilização de neonatos de *P. lineata* em estudos de toxicidade com BFA pode ser
388 adequada e viável devido a fácil obtenção e baixo custo de manejo.

389 Além dos efeitos letais causados pelo BFA, em neonatos também foram
390 verificados reduções significativas ($p < 0,05$) na frequência cardíaca em concentrações \geq
391 10 mg/L de BFA, quando comparados ao grupo controle. Tais resultados corroboram o
392 exposto por Schirling *et al.* (2006), onde também verificaram reduções na frequência
393 cardíaca de neonatos de *M. cornuarietis* submetidos aos interferentes endócrinos BFA e
394 17α -etinilestradiol (EE2). De acordo com estes autores, as reduções podem ser devido a
395 alterações no metabolismo energético. Adicionalmente, Batista *et al.*, (2012) observaram
396 em ratos expostos ao BFA reduções na velocidade de todo o metabolismo energético e
397 relaciona a ação do BFA na alteração de receptores de estrogênio, que são moléculas
398 essenciais no balanço energético.

399 Neste sentido, em relação a observações comportamentais dos animais adultos, os
400 grupos com concentrações de 10, 15 e 20 mg/L demonstraram aumentos na frequência de
401 atos no estado Inativo (*permanecer retraído e permanecer imóvel*) e na preferência do
402 quadrante inferior do aquário. Tais comportamentos podem estar relacionados com a
403 redução no metabolismo energético (Batista *et al.*, 2012), provocado por altas
404 concentrações de BFA. Visto que os grupos com menores concentrações e o controle
405 exibiram menores frequências de atos no estado Inativo. Adicionalmente, nos grupos com
406 maiores concentrações de BFA (15 e 20 mg/L) também foram observados animais
407 letárgicos com o opérculo virado para cima e parcialmente abertos, sem responder a
408 estímulos físicos. Na literatura (Mihaich *et al.*, 2009), este estado letárgico também foi
409 observado na exposição aguda ao BFA (em 5, 10 e 50 mg/L) em *M. cornuarietis*.

410 Os grupos com menores concentrações de BFA (1 e 5 mg/L) e controle exibiram
411 menores frequências de atos no estado Inativo. Foi observado nestes grupos a presença
412 de atos em todas as categorias do estado Ativo, enquanto os grupos com altas
413 concentração de BFA apresentaram apenas atos do estado Ativo nas categorias
414 Manutenção e Defesa. Os atos do estado Ativo que mais visualizados foram o *rastejar*,
415 que caracteriza a movimentação dos animais pelo aquário e *raspar superfícies*, que
416 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo com 1 mg/L em relação ao controle.
417 A presença do ato *raspar superfícies* é explicada devido ao tempo de jejum durante o teste
418 e a procura de fontes alimentares alternativas. No entanto, mesmo no grupo controle

419 houve predominância da frequência de atos no estado Inativo. Tal fato pode ser explicado
420 pelo hábito dos gastrópodes do gênero *Pomacea* que passam menos tempo se
421 movimentando durante a fase luminosa do dia (Bae e Park 2015).

422 Na análise do perfil bioquímico da hemolínfa, realizado após o termino do teste
423 agudo, foi exibido aumento significativo ($p < 0,05$) do nível da enzima aspartato
424 aminotransferase (AST) no grupo com 10 mg/L comparado ao grupo controle. De acordo
425 com Chiu *et al.* (2014), o AST é uma importante enzima hepática usada no diagnóstico
426 para determinação de efeitos tóxicos de vários poluentes, pois lesões ou destruição das
427 células hepáticas liberam estas enzimas para a circulação. Estes autores compararam os
428 níveis de AST no hepatopâncreas de *P. canaliculata* criados em laboratório e em
429 espécimes coletadas em áreas de cultivo, que geralmente estão presentes pesticidas que
430 também agem como interferentes endócrinos. Em seus resultados, foi visualizado um
431 aumento do nível do AST na hemolinfa dos animais coletados em relação aos criados em
432 laboratórios, indicando que os pesticidas provocaram efeitos tóxicos. Diante deste fato,
433 os resultados do presente trabalho estão de acordo com a literatura citada, sugerindo que
434 concentrações elevadas de BFA podem ter causado danos no tecido hepático e
435 consequentemente, aumentando o nível de AST na hemolinfa.

436 Os valores das CENO apresentados no presente teste agudo com neonatos e
437 adultos, se mostraram em concordância com valores obtidos por estudos similares com
438 invertebrados. Estes valores variaram entre 1,18 a 4,1 mg/L de BFA (Alexander *et al.*,
439 1988; Ike *et al.* 2002; Mu *et al.*, 2005; Mihaich *et al.*, 2009). A ampliação da base de
440 dados para CENO em organismos aquáticos é vantajosa, pois pode ser usada para o
441 desenvolvimento de novas espécies sensíveis para uso em avaliações de riscos ambientais
442 (Staples *et al.*, 2008). Diante do exposto, a espécie *P. lineata* se mostra uma boa
443 alternativa para aplicação em estudos biomonitoramento, devido ao baixo custo e alta
444 sensibilidade. Principalmente em regiões com poucos recursos financeiros disponíveis,
445 como a região Nordeste do Brasil, onde esta espécie é nativa e ambulantemente
446 encontrada.

447 Em relação ao teste crônico realizado nos animais adultos, foram observados
448 resultados que indicam a ação do bisfenol A e do estradiol nos parâmetros avaliados e
449 características reprodutivas. A exibição de cópula foi apenas visualizada entre animais
450 dos grupos 1 e 5 mg/L de BFA, durante manhã e tarde, tanto nos períodos das observações
451 comportamentais quanto fora deste período. Segundo Albrecht *et al.* (1996), as espécies
452 do gênero *Pomacea* realizam cópula frequentemente no período da manhã e tarde, e no

453 período noturno geralmente as fêmeas depositam seus ovos fora da água. Desta forma,
454 não foi possível observar no presente trabalho, a cópula no grupo controle e 1 mg/L de
455 E₂.

456 Em relação a postura de ovos durante o teste, somente o grupo controle desovou
457 quatro vezes na parede do aquário, mesmo não sendo observado cópula durante o teste.
458 Este fato pode ser explicado devido ao tempo que as fêmeas do gênero podem passar com
459 esperma guardado, por exemplo em *P. canaliculata* passa até 140 dias após a cópula e
460 ainda desovar. Em regiões tropicais, a reprodução destes animais é contínua (Estebenet e
461 Martín, 2002). Albrecht *et al.* (1996) mantiveram pares de machos e fêmeas de *P.*
462 *canaliculata* separados em compartimentos de um aquário para observar aspectos
463 reprodutivos. Em seus resultados foram visualizados que a frequência de copulação era
464 duas vezes maior que a desova e muitas das desovas não precederam diretamente das
465 copulações observadas.

466 Oehlmann *et al.* (2000), realizaram um estudo submetendo gastrópodes adultos da
467 espécie *Marisa cornuarietis* em concentrações de 1, 5, 25 e 100 µg/L de BFA. Durante o
468 período de 5 meses foram mensurados o número cumulativo de ovos e desovas. Nos
469 resultados encontrados, foi observado aumento dependente da concentração de BFA no
470 número de ovos e desovas produzidos a 1-25 µg/L e uma redução no grupo com 100 µg/L
471 de BFA. De acordo com Fruzzetti e Bitzer (2010), contraceptivos orais combinados
472 (COC) que possuem E₂ em sua composição, são eficientes na inibição da ovulação e
473 contracepção. Adicionalmente, como o BFA é um xenoestrogênio não-esteroidal que
474 exhibe aproximadamente 2000 vezes menos a atividade do estradiol (Acconcia *et al.*,
475 2015), possivelmente o efeito contraceptivo do estradiol tanto no grupo com 1 mg/L do
476 hormônio e nos grupos expostos ao BFA alteraram os parâmetros reprodutivos e desova
477 nos animais expostos. Entretanto, presença destes efeitos provavelmente foi menos
478 acentuada nos grupos com BFA em razão da exibição de cópula entre os animais.

479 Em relação as análises comportamentais, foi observado maior frequência de atos
480 realizados no estado Inativo em todos os grupos, de forma semelhante ao encontrado nas
481 análises do teste agudo. No entanto, no teste crônico as frequências totais do estado
482 Inativo (69 a 79,2%) não variaram tal como no teste agudo (64,7% a 96,9%), nas maiores
483 concentrações de BFA. Altas frequências na exibição de atos do estado Inativo podem
484 ser consideradas normais a espécie, devido ao baixo metabolismo natural em gastrópodes
485 e a preferência por hábitos noturnos (Bae e Park 2015). Em referência aos atos do estado
486 Ativo, os atos da categoria Locomoção (*rastejar e boiar*) foram mais exibidos em todos

487 os grupos, no entanto as frequências entre os grupos não diferiram significativamente. A
488 baixa frequência de atos da categoria Manutenção, principalmente *ventilar com sifão* e
489 *estender-se da concha*, que podem ser utilizados para indicar ambientes com pouco
490 oxigênio dissolvido ou poluídos que reduzem a eficiência das brânquias (Seuffert e
491 Martín, 2009). Neste sentido, a presença de BFA e E₂ não alterou o padrão respiratório
492 ou causou estresse adicional aos animais.

493 No estudo crônico de Ahmed *et al.*, (2015), foi analisado o perfil bioquímico de
494 ratos submetidos concentrações diárias de 150 mg/Kg de BFA via oral durante 70 dias.
495 Ao término do experimento, os níveis de aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina,
496 colesterol, ureia e creatina apresentaram um aumento no grupo com BFA. De acordo com
497 os autores, os aumentos dos níveis dos componentes analisados indicaram que o BFA
498 provocou efeito adverso na função hepática e renal. Entretanto, no teste crônico do
499 presente trabalho, não foram observadas alterações com diferenças significativas nos
500 componentes bioquímicos da hemolinfa analisados, possivelmente indicando que as
501 concentrações utilizadas não foram suficientes para causar tais alterações, visto que no
502 teste agudo apenas na concentração de 10 mg/L de BFA foi apresentado aumento
503 significativo ($p < 0,05$) em relação a enzima hepática AST.

504 Em relação a alimentação no período do teste crônico, os quatro grupos
505 experimentais não exibiram alterações no consumo alimentar, pois os animais
506 consumiram todo o alimento disponibilizado em 24 horas. Adicionalmente não foram
507 observadas mudanças comportamentais, como presença do ato raspar superfícies (RS),
508 que foram exibidas no teste agudo, devido ao período de jejum. Em seu experimento,
509 Batista *et al.*, (2012), igualmente não observou diferenças significativas em relação ao
510 consumo alimentar de ratos submetidos a concentrações de BFA até 100 mg/kg.

511 **5. Conclusão**

512 A partir das análises realizadas no presente trabalho, concluiu-se que o bisfenol A
513 provocou efeitos tóxicos nos parâmetros reprodutivos, comportamentais, fisiológicos e
514 bioquímicos em *Pomacea lineata*. Visto que, as respostas observadas nos testes agudo e
515 crônico, tais como a redução da frequência cardíaca nos neonatos, aumento do nível de
516 aspartato aminotransferase na hemolinfa, alterações comportamentais nos adultos, em
517 ambos os testes e redução de desova nos grupos expostos. O BFA também apresentou
518 efeitos tóxicos semelhantes ao E₂ no ensaio crônico. Isto indica que a presença de altos
519 níveis de interferentes endócrinos em ambientes aquáticos como o BFA podem ser tornar
520 um risco para a população de organismos de vários táxons. Adicionalmente, pesquisas

521 que visam avaliar os efeitos de interferentes endócrinos em espécies de invertebrados,
522 que possuem potencial para atuar como bioindicadores, são necessárias para ampliar as
523 informações sobre como os organismos reagem aos diferentes compostos químicos
524 liberados na natureza e sensibilizar órgãos fiscalizadores para a criação de leis que
525 restrinjam o uso de tais substâncias.

526 **6. Agradecimentos**

527 À Universidade Federal Rural de Pernambuco por permitir o desenvolvimento
528 desse projeto. A FACEPE pelo apoio financeiro (Processo IBPG-0863-2.08/13). Ao
529 CNPq pelo apoio financeiro (Processo 477215/2013-0).

530 **7. Referências Bibliográficas**

531 ACCONCIA, F.; PALLOTTINI, V.; MARINO, M. Molecular Mechanisms of Action of
532 BPA. *Dose-Response*, v. 13, n. 4, p. 1–9, 2015.

533

534

535 AHMED, W. M. S.; MOSELHY, W. A.; NABIL, T. M. Bisphenol A toxicity in adult
536 male rats: hematological, biochemical and histopathological approach. *Global*
537 *Veterinaria*, v. 14, n. 2, p. 228–238, 2015.

538

539

540 ALBRECHT, E. A.; CARRENO, N. B.; CASTRO VAZQUEZ, A. A quantitative study
541 of copulation and spawning in the South American apple-snail, *Pomacea canaliculata*
542 (Prosobranchia: Ampullariidae). *Veliger*, v. 39, n. 2, p. 142–147, 1996.

543

544

545 ALEXANDER, H. C.; DILL, D. C.; SMITH, L. W. et al. Bisphenol A: Acute aquatic
546 toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 7, n. 1, p. 19–26, 1988.

547

548

549 ALTMANN, J. Observational Study of Behavior: Sampling Methods. *Behaviour*, v. 49,
550 n. 3, p. 227–266, 1974.

551

552

553 BAE, M. J.; PARK, Y. S. Characterizing the effects of temperature on behavioral
554 periodicity in golden apple snails (*Pomacea canaliculata*). *Ecol. Inform.*, v. 29, n. 2, p.
555 130–138, 2015.

556

557

558 BATISTA, T. M.; ALONSO-MAGDALENA, P.; VIEIRA, E. et al. Short-term treatment
559 with Bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *PLoS ONE*, v. 7,
560 n. 3, p. 1–10, 2012.

561

562

563 CHIU, Y. W.; WU, J. P.; HSIEH, T. C. et al. Alterations of biochemical indicators in
564 hepatopancreas of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata*, from paddy fields in
565 Taiwan. *J. Environ. Biol.*, v. 35, n. 4, p. 667–73, 2014.

- 566
567
568 DRAGOMIRESCU, A.; ANDONI, M.; CRAINA, M. Endocrine disrupting compounds
569 in environment - A review. *J. Food, Agri. Environ.*, v. 13, n. 1, p. 117–119, 2015.
570
571
572 ESTEBENET, A.L. AND MARTIN, P. R. Workshop: “Biology of Ampullariidae”
573 Minireview *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): Life-history.
574 *BIOCELL*, v. 26, n. 1, p. 83–89, 2002.
575
576
577 FLINT, S.; MARKLE, T.; THOMPSON, S. et al. Bisphenol A exposure, effects, and
578 policy: A wildlife perspective. *J. Environ. Manage.*, v. 104, p. 19–34, 2012.
579
580
581 FRUZZETTI, F.; BITZER, J. Review of clinical experience with estradiol in combined
582 oral contraceptives. *Contraception*, v. 81, n. 1, p. 8–15, 2010.
583
584
585 HAMPL, R.; KUBÁTOVÁ, J.; STÁRKA, L. Steroids and endocrine disruptors—
586 History, recent state of art and open questions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 155, p.
587 217–223, 2016.
588
589
590 HIRANO, M.; ISHIBASHI, H.; MATSUMURA, N. et al. Acute toxicity responses of
591 two crustaceans, *americamysis bahia* and *daphnia magna*, to endocrine disrupters. *J.*
592 *Health. Sci.*, v. 50, n. 1, p. 97–100, 2004.
593
594
595 HIROI, H.; TSUTSUMI, O.; MOMOEDA, M. et al. Differential Interactions of
596 Bisphenol A and 17 β -estradiol with Estrogen Receptor α (ER α) and ER β . *Endocr. J.*, v.
597 46, n. 6, p. 773–778, 1999.
598
599
600 HIRVONEN, E.; ALLONEN, H.; ANTTILA, M. et al. Oral contraceptive containing
601 natural estradiol for premenopausal women. *Maturitas*, v. 21, n. 1, p. 27–32, 1995.
602
603
604 IKE, M.; CHEN, M.; JIN, C. et al. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of
605 biodegradation products of bisphenol-A. *Environ. Toxicol.*, v. 17, n. 5, p. 457–461, 2002.
606
607
608 LIU, W. H.; CHIU, Y. W.; HUANG, D. J. et al. Imposex in the golden apple snail
609 *Pomacea canaliculata* in Taiwan. *Sci. Total Environ.*, v. 371, n. 1-3, p. 138–143, 2006.
610
611
612 MARCIAL, H. S.; HAGIWARA, A.; SNELL, T. W. Estrogenic compounds affect
613 development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.
614 22, n. 12, p. 3025, 2003.
615

- 616
617 MELO, L. E. L.; COLER, R. A.; WATANABE, T. et al. Developing the gastropod
618 *Pomacea lineata* (Spix, 1827) as a toxicity test organism. *Hydrobiologia*, v. 429, n. 1-3,
619 p. 73–78, 2000.
620
621
622 MIHAICH, E. M.; FRIEDERICH, U.; CASPERS, N. et al. Acute and chronic toxicity
623 testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.
624 72, n. 5, p. 1392–9, 2009.
625
626
627 MU, X.; RIDER, C. V.; HWANG, G. S. et al. Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal
628 activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways. *Environ. Toxicol.*
629 *Chem.*, v. 24, n. 1, p. 146, 2005.
630
631
632 OECD, 2010. Detailed Review Paper (DRP) on Molluscs Life-Cycle Toxicity Testing.
633 Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris (=Series on Testing
634 and Assessment No. 121).
635
636
637 OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; TILLMANN, M. et al. Effects of
638 endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part
639 I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*, v. 9, n. 6, p. 383–97,
640 2000.
641
642
643 PASCOE, D.; CARROLL, K.; KARNTANUT, W. et al. Toxicity of 17 α -Ethinylestradiol
644 and Bisphenol A to the Freshwater Cnidarian *Hydra vulgaris*. *Arch. Environ. Contam.*
645 *Toxicol.*, v. 43, n. 1, p. 56–63, 2002.
646
647
648 RUBIN, B. S.; SOTO, A. M. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol.*
649 *Cell. Endocrinol.*, v. 304, n. 1-2, p. 55–62, 2009.
650
651
652 SEUFFERT, M. E.; MARTÍN, P. R. Dependence on aerial respiration and its influence
653 on microdistribution in the invasive freshwater snail *Pomacea canaliculata*
654 (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biol. Invasions*, v. 12, n. 6, p. 1695–1708, 2009.
655
656
657 WANG, J.; WANG, X.; XIONG, C. et al. Chronic bisphenol A exposure alters behaviors
658 of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Pollut.*, v. 206, p. 275–281, 2015.
659
660
661 YAN, S.; CHEN, Y.; DONG, M. et al. Bisphenol A and 17 β -estradiol promote arrhythmia
662 in the female heart via alteration of calcium handling. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, 2011.
663
664
665 ZHOU, J.; ZHU, X. S.; CAI, Z. H. The impacts of bisphenol A (BPA) on abalone

666 (*Haliotis diversicolor supertexta*) embryonic development. *Chemosphere*, v. 82, n. 3, p.
667 443–450, 2011.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou a influência do interferente endócrino bisfenol A nos parâmetros, reprodutivos, histológicos, fisiológicos e comportamentais da espécie *Pomacea lineata*, diante resultados obtidos foi possível concluir:

- Foi determinado da CL₅₀ 96 h para neonatos e adultos de *P. lineata* com valores 3,14 e 11,09 mg/L, respectivamente;
- No teste de toxicidade aguda, a taxa de mortalidade foi maior nos grupos 10, 15 e 20 mg/L para neonatos e nos adultos nos grupos 15 e 20 mg/L;
- Os efeitos subletais no teste agudo em neonatos foram observados em relação a redução da frequência cardíaca, nos grupos 15 e 20 mg/L;
- No teste agudo dos adultos foram observados efeitos subletais no aumento do nível de AST no grupo 10 mg/L e comportamentos letárgicos nos grupos 15 e 20 mg/L;
- Durante o teste crônico foram observadas desovas no grupo controle, mesmo sem a visualização de cópulas. Os grupos com 1 e 5 mg/L de BFA apresentaram o ato da cópula, porém não foram observadas desovas. Enquanto o grupo com 1 mg/L de E₂ não exibiram comportamentos relacionados com a reprodução;
- No teste de toxicidade crônica, não foram observadas diferenças para a análise do perfil bioquímico na hemolinfa, taxa alimentar dos animais expostos ao BFA;
- Os parâmetros avaliados nos testes de toxicidade aguda e crônica em *P. lineata*, podem servir como indicadores de possíveis efeitos de interferentes endócrinos, em razão da identificação de efeitos causados pelo BFA e E₂ nas funções biológica analisadas;
- Estes dados contribuem com o entendimento do modo de ação do BFA em invertebrados e alerta os órgãos públicos para a criação de normas sobre o despejo destes interferente endócrino em efluentes.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir do apresentado no presente trabalho, espera-se que sejam desenvolvidas mais pesquisas sobre os efeitos tóxicos do interferente endócrino BFA com espécies nativas do Brasil, faz necessário entender como o BFA afeta os tecidos de órgãos respiratórios, como brânquias e reprodutores. Com o aumento da quantidade de trabalhos publicados alertando sobre os possíveis efeitos desta substância no ambiente poderemos

alertar os órgãos reguladores sobre o risco da presença dessas substâncias no ambiente aquático. Adicionalmente, acredita-se que as metodologias utilizadas neste estudo serão empregadas em outros estudos toxicológicos, pois apresentaram sensibilidade em indicar alterações adversas na exposição de BFA, além de serem pouco invasivas, como as análises comportamentais e de frequência cardíaca em neonatos de *Pomacea lineata*.

7. APÊNDICES

Apêndice 1 – Análise dos níveis de bisfenol A em águas do Rio Capibaribe por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para esta análise, foi coletado no Rio Capibaribe na Avenida 17 de Agosto, próximo ao Pier da Jaqueira (Figura 1) - Coordenadas 8°02'19.6S 34°54'18.1W, amostras de água no período de janeiro de 2016 (Verão). Estas amostras foram mantidas sob refrigeração (4 °C) e encaminhadas ao Laboratório da Qualidade da Água e Ambiental - LEAQ da Universidade Federal de Pernambuco para as análises cromatográficas.



Figura 1: Local de Coleta da água do Rio Capibaribe Coordenadas 8°02'19.6S 34°54'18.1W. Fonte: Google Maps e Google Street View.

Para a análise da água foi utilizado um sistema HPLC, Shimadzu, modelo Prominence com coluna de C18 (4,6 x 250 mm, 5 micr) de Fase Reversa com sistema UV/Vis acoplado. A água foi filtrada em filtro millipore (0,45 micro) antes das análises. A análise foi realizada com fase móvel acetonitrila:água 70:30%, velocidade de fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 50 µL, pressão de 105 Kgf, Temperatura de 35 °C e Comprimento de onda de 228 nm.

Os resultados da análise por HPLC são observados na Figura 2. Os cromatogramas demonstram que não foi encontrado Bisfenol A na água do Rio Capibaribe no Local e Período de Coleta.

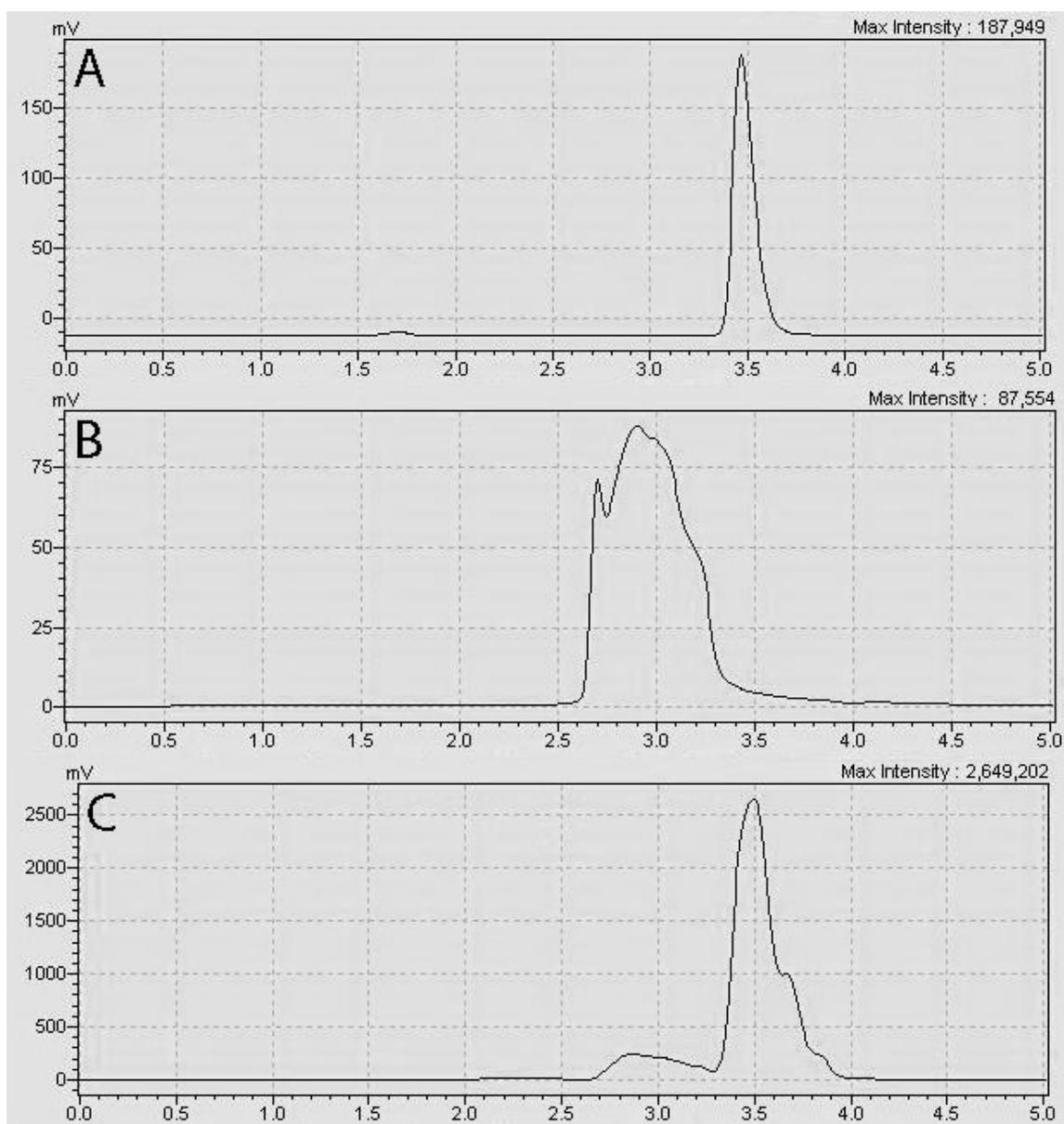


Figura 2: Cromatogramas de A. Bisfenol A, B. Amostra de água do Rio Capibaribe e C. Amostra de água do Rio Capibaribe e Padrão de Bisfenol A.

Apêndice 2 - Etograma para a espécie *Pomacea lineata*.

| Estado | Categorias | Ato | Descrição | Abreviação |
|--------------------------------|---|-------------------------|--|--|
| Ativo | <i>Alimentação</i> | Raspar superfícies | Utiliza a rádula para raspar as superfícies do aquário ou da concha de outros indivíduos em procura de alimento. | RS |
| | | Raspar o alimento | Utiliza a rádula para raspar e retirar pedaços do alimento, nesse caso da alface (<i>Lactuca sativa</i>). | RA |
| | | Formar funil | O músculo pedal forma um funil próximo a boca e realiza movimentos para sugar as partículas de alimentos flutuantes. | FF |
| | <i>Locomoção</i> | Rastejar | Com o músculo pedal o animal movimenta-se lentamente. | RJ |
| | | Boiar | Flutuar na superfície da água, estando retraído na concha ou não. | BO |
| | | Desprender | O músculo pedal solta-se da superfície que estava preso e o animal cai ou começa a flutuar. | DP |
| | <i>Manutenção</i> | Ventilar com sifão | Utiliza o sifão respiratório para alcançar a superfície d'água e realizar uma série de sucções de ar. | VS |
| | | Defecar | Através de uma abertura do manto o animal expele as fezes. | DE |
| | | Estender da concha | Abrir o opérculo e estender a cabeça e o pé, após um período de inatividade. | EC |
| | <i>Social</i> | Copular | O macho fica na frente da fêmea e estende seu pênis para a abertura do manto da fêmea. | CO |
| | | Subir em outro | Rastejar sobre outro indivíduo, com intuito de raspar sua concha, canibalizar ou copular. | SO |
| | | Canibalizar | Utiliza a rádula para raspar o tecido mole de outros indivíduos. | CA |
| | <i>Defesa</i> | Retrair na concha | Puxar a cabeça e o pé para concha, lenta ou rapidamente, e fechar o opérculo. | RC |
| | | Estender apenas o sifão | Estando retraído na concha o animal abre uma fenda no opérculo e estende o sifão. | ES |
| | Inativo | <i>Repouso</i> | Permanecer retraído na concha | Ficar completamente ou parcialmente dentro da concha e imóvel. |
| Permanecer imóvel no substrato | | | Ficar preso com o músculo pedal em superfícies, mas sem realizar nenhum movimento. | PI |
| Morto | O animal será considerado morto quando estiver com o opérculo aberto, imóvel e não responder ao contato físico. | | | |

Apêndice 3 – Trabalhos publicados

ANDRADE, A. L. C.; SILVA, S. C. B. L.; SOARES, P. R. L.; SILVA, M. C. G.; SANTOS, T. P.; CADENA, P. G. Effect of salinity on heart rate of *Pomacea lineata* neonates as a noninvasive method for animal physiology study. In: 50th Annual Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBFis), Águas de Lindóia. SBFIS 2015.

OLIVEIRA, D. M. F.; SOARES, P. R. L.; ANDRADE, A. L. C.; WANDERLEY-TEXEIRA, V.; NOGUEIRA, A. J.; CUNHA, F. M.; CADENA, P. G. Temperature effect on behavioral analysis and histochemistry of the gills and liver of *Astronotus ocellatus*. In: 1st PanAmerican Congress of Physiological Science, Cataratas do Iguassu, 2014.

OLIVEIRA, M. A. B.; CADENA, P. G.; SOARES, P. R. L.; ANDRADE, A. L. C. Quem dita a cor da tilápia: o mundo físico ou o social? In: Encontro da Rede Nacional de Educação e Ciência: Novos Talentos da Rede Pública, Natal. Rede Nacional de Educação e Ciência, 2015.

SANTOS, T. P.; OLIVEIRA, E. G. S.; SOARES, P. R. L.; SILVA, S. C. B. L.; ANDRADE, A. L. C.; SILVA, M. C. G.; CADENA, M. R. S.; CADENA, P. G. Thyroxine effect as endocrine disruptor in behavior of tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: 50th Annual Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBFis), Águas de Lindóia, 2015.

SILVA, S. C. B. L.; ANDRADE, A. L. C.; SOARES, P. R. L.; SANTOS, T. P.; SILVA, M. C. G.; CADENA, P. G. Avaliação do efeito de interferentes endócrinos sob a fisiologia de *Pomacea bridgesi* e sua utilização como organismo-teste em ecotoxicologia. In: XV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife 2015.

SOARES, P. R. L.; SOUZA, E. H. L. S.; ANDRADE, A. L. C.; SANTOS, T. P.; SILVA, S. C. B. L.; SA, F. B.; CADENA, P. G. . Electoretinograms full field by light flashes in *Colossoma macropomum* in vivo. In: 50th Annual Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBFis), Águas de Lindóia. SBFIS 2015.

SOARES, P. R. L.; ANDRADE, A. L. C.; OLIVEIRA, D. M. F.; SILVA, M. C. G.; WANDERLEY-TEXEIRA, V.; CUNHA, F. M.; CADENA, P. G. Hypoxia effect on behavior and morphology of gills in *corydoras schwartzi*. In: 1st PanAmerican Congress of Physiological Science, Cataratas do Iguassu, 2014.

SOUZA, E. Q.; OLIVEIRA, E. G. S.; ANDRADE, A. L. C.; SILVA, S. C. B. L.; SANTOS, T. P.; SOARES, P. R. L.; SILVA, M. C. G.; CADENA, M. R. S.; CADENA, P. G. Effects of estradiol and bisphenol as endocrine disruptors on the aggressive behavior of *Betta splendens*. In: 50th Annual Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBFis), Águas de Lindóia, 2015.

SOUZA, E. Q.; OLIVEIRA, E. G. S.; ANDRADE, A. L. C.; SILVA, S. C. B. L.; SANTOS, T. P.; SOARES, P. R. L.; CADENA, P. G. Bisfenol A como interferente endócrino e seus efeitos em *Betta splendens*. In: XV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife 2015.

8. ANEXO

Anexo 1 – Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais para a realização desta dissertação.



Universidade Federal Rural de Pernambuco
 Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
 Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

| | |
|--|--|
| Número da licença | 094/2014 |
| Número do processo | 23082.014891/2014 |
| Data de emissão da licença | 11 de Agosto de 2014 |
| Título do Projeto | Avaliação do efeito do interferente endócrino Bisfenol A (BFA) em ensaios de toxicidade aguda e crônica na espécie <i>Pomacea lineata</i> e aplicação em águas do Rio Capibaribe-Recife-PE.. |
| Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão) | Pesquisa |
| Responsável pela execução do projeto | Pabyton Gonçalves Cadena |
| Colaboradores | André Lucas Corrêa de Andrade; Priscila Rafaela Leão Soares; Stephannie Caroline Barros Lucas da Silva. |
| Tipo de animal e quantidade total autorizada | Gastropode; total 100 animais (machos e fêmeas). |

Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
 (Coordenadora da CEUA-UFRPE)

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.

- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia do Certificado de aprovação do projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. Esclarecemos que o referido documento deve constar como sendo a primeira página do texto em Word (não incluir no texto em pdf), além da menção, em Material e Métodos, do número do Certificado de aprovação do projeto.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

- **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

- **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

- **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
2. o texto do artigo em pdf **NÃO** deve conter o nome dos autores e filiação.

- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
- **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.
- **Introdução.** Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
- **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados.

Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do Certificado de aprovação do CEUA. (verificar o Item Comitê de Ética).

- **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
 - ✓ **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.
 - ✓ **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

- ✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).
- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
 - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
 - ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
 - ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

- *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

- **Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.
Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$150,00, por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.