

Avaliação da resposta celular do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na Baía do Espírito Santo por meio do tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN)

Evaluation of the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cellular response in Espírito Santo Bay by neutral red retention time (NRRT)

Iara C Souza^{1,3}, Pedro J Santana Jr^{1,4}, Bruno VP Almada^{1,5}, Letícia P Zaroni^{2,6} e Sílvia T Matsumoto^{1,7}

1. Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Av. Fernando Ferrari, 514 - Campus de Goiabeiras, 29075-910, Vitória, ES, Brasil. 2. Departamento de Oceanografia Biológica, Universidade de São Paulo (USP), Pça do Oceanográfico, 191 Cidade Universitária 05508-900, São Paulo, SP; Brasil. 3. iara.csouza@gmail.com; 4. pedrosantanaj@yahoo.com.br; 5. bpimenta@gmail.com; 6. leticiaz@usp.br; 7. siltamie@gmail.com

Resumo A análise de biomarcadores em níveis tróficos inferiores é de grande utilidade, pois alerta para conseqüências nos níveis tróficos mais elevados antes que o impacto seja notado por estudos convencionais ou pela população. A investigação da condição da Baía do Espírito Santo foi realizada com o bivalve *Perna perna* (Linnaeus, 1758) pela metodologia de desestabilização da membrana lisossômica por meio do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro (TRVN). Foram analisados mexilhões de três diferentes costões da Baía do Espírito Santo (Ilha do Boi, Ilha do Frade e na Terceira Ponte), e de um ponto referência em Setiba, Guarapari-ES. Este estudo indicou que a contaminação nesses pontos (exceto em Setiba) causou dano oxidativo que resultam na desestabilização lisossômica. O menor tempo médio de retenção foi observado na população de mexilhões da Terceira Ponte (35,25 minutos), seguido da Ilha do Boi (54 minutos) e Ilha do Frade (70,5 minutos) em relação ao ponto de referência (115,5 minutos). Houve significância estatística entre os tempos médios de retenção nos pontos considerados poluídos em relação ao ponto referência. Tempos de retenção inferiores a 60 minutos indicam danos severos nos compartimentos lisossômicos dos hemócitos, sugerindo uma contaminação por poluentes na Terceira Ponte e na Ilha do Boi.

Palavras-chave: Biomarcadores, Vermelho Neutro, Integridade lisossômica, *Perna perna*, Baía do Espírito Santo.

Abstract The biomarkers analysis in low tropic levels it's so important because this is an alert in high tropic levels previously the impact be noted for conventional studies or by the population. The investigation of Espírito Santo Bay condition was realized with the bivalve *Perna perna* (Linnaeus, 1758) by Neutral Red Retention Time (NRRT). Was analyzed mussels of three different points of Espírito Santo Bay (Boi Island, Frade Island and Third Bridge), and

one reference point in Setiba, Guarapari –ES. This study reveal that the contamination in this points (save Setiba) originate oxidative damage that resulted in lisossomal damage. The lower mean time of retention was observable in mussels population of Third Bridge (35,25 minutes), followed by Boi Island (54 minutes) and Frade Island (70,5 minutes) in relation of the reference point (115,5 minutes). Had statically significant between in the mean times of retention points considerate polluted in relation of reference point. Retention times inferior a 60 minutes reveal severe damage in the lisossomal compartment, propose contamination of Third Bridge and Boi Island.

Keywords: Biomarkers, Neutral Red, lisossomal integrity, *Perna perna*, Espírito Santo Bay.

Introdução

O sistema estuarino da Ilha de Vitória tem sofrido ao longo de várias décadas uma degradação ambiental, por ocupação populacional de seu entorno, aterros, implantação de indústrias, atividades portuárias e, principalmente, devido ao lançamento de esgoto doméstico e industrial, a maioria deles (aproximadamente 70%) *in natura* (Jesus *et al.* 2004). Trata-se de uma cidade de grande destaque econômico no cenário estadual e nacional, possuindo um importante sistema portuário que é responsável pelo escoamento da produção regional, abriga indústrias siderúrgicas e mineradoras de grande porte (Gaze 2005). Sendo uma ilha próxima ao continente (aproximadamente 200m) esta apresenta edificações e residências que segundo Krohling (2004) provavelmente lançam esgotos e despejo de águas pluviais no costão de forma direta,

ou indiretamente pela rede coletora sem tratamento adequado. Deste modo é necessário um monitoramento do estresse que tal atividade antrópica causa neste ecossistema.

Dentre a grande variedade de organismos aquáticos, os invertebrados têm sido preferencialmente utilizados na avaliação ambiental, pois constituem 95% de todas as espécies de animais (Barnes 2006). Sua população é, geralmente, numerosa, de modo que as amostras podem ser coletadas para análise sem a ocorrência de alterações consideráveis na dinâmica populacional (Depledge e Fossi 1994; Fossi *et al.* 2000).

Diversos estudos comprovam a eficiência dos moluscos bivalves, dentre as inúmeras espécies de invertebrados, como organismos-sentinelas em monitoramentos marinhos (Francioni *et al.* 2005), sendo amplamente utilizados para monitorar os impactos e a presença de contaminantes (Santos 2004). O modo de alimentação por filtração de partículas em suspensão da coluna d'água expõe esses animais em período integral à substâncias tóxicas associadas a partículas em suspensão (Vasconcellos 2004). Estes animais conseguem acumular, em seus tecidos, concentrações de metais em torno de 10^3 a 10^6 acima das concentrações encontradas no ambiente (Souza 2002).

No Brasil, o mexilhão *Perna perna* tem sido uma das espécies mais utilizadas como biomonitor, devido à sua ampla distribuição na costa e apresentação dos atributos necessários aos bioindicadores, como acumular o poluente, possuir hábito sésil e ser abundante no ambiente estudado (Furley 1993).

O diagnóstico ambiental pode ser realizado por meio da análise do estresse, nos organismos teste, detectado pela alteração em nível bioquímico e celular (Nascimento 2002). A vantagem da avaliação ambiental é dada pela quantificação de poluentes biologicamente disponíveis, diferentes episódios de exposição no tempo e no espaço, interações toxicológicas nos organismos, e o efeito sinérgico de várias substâncias (Huggett *et al.* 1992). Além disso, oferecem informações sobre a ação tóxica dos compostos parentais e dos metabólitos tóxicos (Mccarthy e Shugart 1990).

A análise de biomarcadores em níveis tróficos inferiores é de grande utilidade, pois alerta para conseqüências nos níveis mais altos da organização biológica, por meio da magnificação trófica, antes que o impacto seja notado nos estudos convencionais ou pela população (Cheung *et al.* 1998).

A avaliação da integridade lisossômica, descrita por Lowe *et al.* (1995), é o teste aplicado nos estudos de biomonitoramento, que dispõe do uso do corante vermelho neutro que é um composto lipofílico que se difunde passivamente através das membranas celulares. Quando uma molécula de vermelho neutro penetra no interior do lisossomo, esta recebe um próton, devido ao baixo pH da organela (Lowe *et al.* 1992). A direção do gradiente de difusão do vermelho neutro é do citoplasma adjacente para a membrana lisossômica, de forma que o vermelho neutro torna-se cada vez mais concentrado e visível, com coloração avermelhada, no interior da organela ao decorrer do tempo. A eficiência da retenção do corante depende do pH do lisossomo e

consequentemente da bomba de prótons H^+ -ATPase encontrada na membrana lisossômica (Svendsen e Weeks 1995).

Em células saudáveis, a bomba de prótons pode manter o influxo (cada molécula de vermelho neutro retém prótons do interior lisossomal) e o gradiente de prótons é mantido. Entretanto, na presença de um xenobiótico a eficiência da bomba de prótons pode ser reduzida, resultando na diminuição do gradiente de prótons e no aumento do pH no interior dos lisossomos, que resulta na desprotonização do corante, que não é mais retido pelos lisossomos. Assim, o vermelho neutro concentrado no lisossomo difunde-se para o citoplasma, espalhando-se rapidamente e resultando em uma célula de coloração rubro. Portanto, há uma correlação direta entre alterações deletérias ao sistema de bomba de prótons e o tempo de retenção do vermelho neutro, ocorrendo redução no tempo de retenção concomitantemente ao prejuízo à bomba de prótons (Francioni 2005).

O presente trabalho teve como objetivo diagnosticar as condições ambientais em três áreas da Baía do Espírito Santo por meio do biomarcador de análise da integridade lisossômica.

Métodos

Área de estudo

As coletas foram realizadas em três pontos na Baía do ES, Ilha do Frade ($20^{\circ}17'54''S$, $40^{\circ}16'32''O$), ponto 1; Ilha do Boi ($20^{\circ}18'32''S$, $40^{\circ}16'33''O$), ponto 2, Terceira Ponte ($20^{\circ}19'02''S$, $40^{\circ}17'10''O$), ponto 3 e em um ponto de referência localizado em Setiba, Guarapari-ES. ($20^{\circ}38'13''S$, $40^{\circ}25'31''O$). Nesses pontos são coletados rotineiramente mexilhões para o consumo humano (Figura 1). Para efeito de comparação o ponto referência (Setiba) foi escolhido por estar distante de ações antrópicas. As amostras do mexilhão *Perna perna* foram coletadas nos dias 28/08/2007 e 21/10/2007.

Metodologia de campo

Os mexilhões foram coletados na zona infralitoral, onde ficam permanentemente submersos. O cacho de mexilhões foi

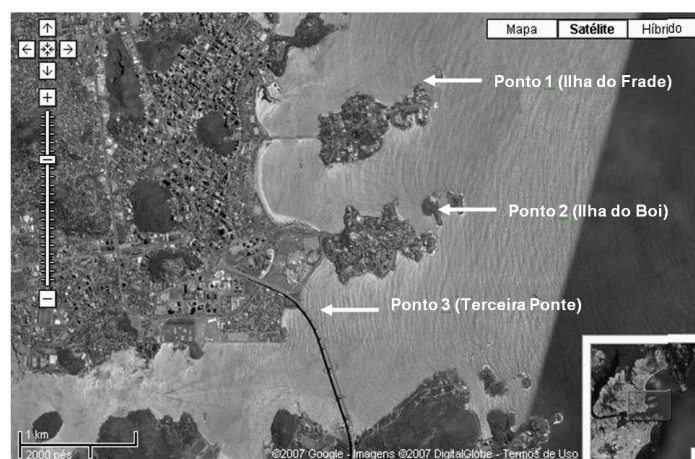


Figura 1 Pontos de coleta na Baía do Espírito Santo: Ponto 1 – Ilha do Frade, Ponto 2 – Ilha do Boi; Ponto 3 – Terceira ponte. (Fonte: Google Earth)

mantido com água do local da coleta em uma caixa de isopor durante o transporte até o laboratório.

Metodologia de laboratório

A extração da hemolinfa foi realizada segundo metodologia descrita por Lowe *et al.* em 1995.

As células foram examinadas em relação às anormalidades estruturais apresentadas e o tempo de retenção do vermelho neutro, a cada intervalo de tempo. O tempo de retenção do corante pelos compartimentos lisossômicos foi registrado para estimar a proporção de células que apresentaram o corante no citoplasma, e/ou exibiram anormalidades na forma, tamanho e cor dos compartimentos lisossômicos.

O teste foi finalizado quando 50% ou mais das células exibiram rompimento dos lisossomos ou mostraram anormalidades (TE50 – tempo necessário para que se observe efeito adverso em 50% das células-teste) (Nascimento 2002). Os dados foram analisados quanto a sua distribuição, usando a análise de variância (ANOVA) e o Teste de Tukey para analisar a diferença estatística entre os dados.

Tabela 1 Tempo de retenção (minutos) do corante vermelho neutro de mexilhão *Perna perna* coletados em diferentes pontos da Baía do Espírito Santo. Ponto 1 – Ilha do Frade; Ponto 2 – Ilha do Boi; 3 – Terceira Ponte.

Tempo (minutos) de Retenção do Vermelho Neutro														
LÂMINA	Agosto/2008						Outubro/2008							
	TEMPO DE RETENÇÃO						TEMPO DE RETENÇÃO							
	15	30	45	60	90	120	15	30	45	60	90	120	180	
Referência	1	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+/-
	2	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+/-	-	-
	3	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+/-
	4	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+/-
	5	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-
	6	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-
	7	+	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-
	8	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+/-	-	-	-
	9	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+/-	-	-	-
	10	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+/-
TEMPO MÉDIO						108	123							
Ponto 1	1	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+	+/-	-	-	
	2	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	
	3	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	-	
	4	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	-	
	5	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	-	
	6	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	
	7	+	+	+/-	+/-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	
	8	+	+	+/-	+/-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	
	9	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	
	10	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	
TEMPO MÉDIO						69	72							
Ponto 2	1	+	+/-	+/-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	
	2	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	-	-	
	3	+	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	
	4	+	+/-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	5	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	6	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	7	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	8	+	+	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	
	9	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	10	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
TEMPO MÉDIO						61,5	46,5							
Ponto 3	1	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	4	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	5	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
	7	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	8	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	9	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
	10	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	
TEMPO MÉDIO						24	46,5							

Resultados e discussão

A análise de integridade lisossômica por meio do teste de retenção do corante vermelho neutro realizado nos três pontos de coleta (Ponto 1, 2 e 3) e no ponto referência, revelou uma variação no tempo de retenção entre todos os pontos e também entre os períodos do estudo.

O tempo de retenção do corante vermelho neutro para o ponto referência (108 min em Agosto e 123 min em Outubro) foi significativamente superior aos demais pontos avaliados nas duas campanhas.

Os resultados indicaram grande variação no tempo de retenção do ensaio de vermelho neutro tanto entre os pontos, como entre os meses de coleta, em agosto e outubro de 2007.

Para a coleta de agosto (2007) o tempo de retenção variou entre 15-120 minutos. Os organismos do ponto referência (Setiba) apresentaram os maiores tempos de retenção (60-120 minutos), indicando maior estabilidade lisossômica. Nas demais áreas, os valores foram de 15-90 minutos, sendo que dentre eles os organismos do Ponto 3 (Terceira Ponte) foram os que apresentaram o menor tempo (15 minutos), sugerindo ser o ponto de contaminação por compostos orgânicos que segundo Francioni *et al.* (2007), a integridade lisossômica é comprometida principalmente por esta classe de poluentes.

No mês de Outubro (2007) o tempo de retenção do vermelho neutro variou de 45 a 180 minutos. O Ponto Referência (Setiba) apresentou os maiores tempos de retenção (108-123 minutos). Já para os Pontos 2 (Ilha do Boi) e 3 (Terceira Ponte) o tempo médio de retenção foi de 46,5 minutos.

O Ponto Referência (Setiba) apresentou a maior estabilidade lisossômica nas duas coletas (agosto e outubro/2007), com tempo médio de retenção de 108 minutos na primeira campanha e 123 minutos na segunda campanha.

Para o Ponto 1 (Ilha do Frade) o tempo de retenção do corante, não variou significativamente entre as duas campanhas. Já para o Ponto 2 (Ilha do Boi), foi observada uma redução no tempo de retenção do vermelho neutro para a campanha de outubro (2007) em relação a campanha de agosto/2007. O Ponto 3 (Terceira Ponte) apresentou um aumento no tempo médio de retenção do corante para a segunda campanha (Tabela 1 e Figura 2).

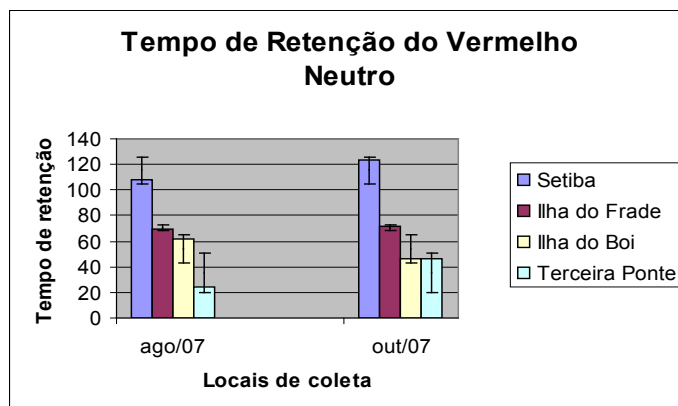


Figura 2 Tempo médio de retenção do vermelho neutro em cada ponto de coleta nas campanhas de agosto e outubro com desvio padrão.

Segundo Jesus (2004) a região da Baía de Vitória sofre influência do esgoto lançado in natura na região, o que pode estar ocasionando a instabilidade lisossômica, quando exposta ao corante vermelho neutro.

No ponto de referencia o tempo de retenção do corante vermelho neutro foi significativamente superior aos demais pontos avaliados nas duas campanhas.

Esses resultados indicam uma possível contaminação dos pontos de coleta (1, 2 e 3), por poluentes, que, quando no interior das células, podem gerar radicais livres que comprometem o funcionamento da proteína H⁺-ATPase lisossômica (Svendsen e Weeks 1995), resultando em baixa concentração de próton H⁺ no interior do lisossomo, e um extravasamento do corante vermelho neutro na região do citoplasma em curto período de tempo.

Na primeira campanha (agosto/2007), o ponto 3 (Terceira Ponte), apresentou tempo de retenção do corante vermelho neutro significativamente inferior aos demais pontos. Para a segunda campanha (outubro/2007) a diferença no tempo de retenção do corante vermelho neutro nos três pontos de coleta (Ponto 1, 2 e 3) não foi estatisticamente significativo.

Dados de balneabilidade da Baía do ES consideram todos os de coleta como “próprio”. Porém, os resultados sugerem uma contaminação desses ambientes por compostos que causam danos celulares aos bioindicadores.

Estudos realizados na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro (Brasil) com o biomarcador Vermelho Neutro em *Perna perna*, após o derramamento de petróleo, mostraram um tempo médio de retenção 30 minutos em todas as campanhas realizadas em 1999, sendo os menores valores encontrados em regiões impactadas por efluentes industriais e domésticos. (Francioni 2005). Neste mesmo estudo, o tempo médio de retenção foi de 32 minutos em 2006, sendo que os menores tempos foram registrados para o mesmo ponto do monitoramento anterior, próximo a Ponte Rio-Niterói (Francioni 2007).

Em São Sebastião, São Paulo (Brasil), o tempo médio de retenção do Vermelho Neutro foi de 24,1 minutos, sendo que os valores mais baixos foram encontrados próximos ao Terminal de Óleo (Pereira *et al.* 2006).

Na análise da Baía do Espírito Santo o tempo médio de retenção foi de 53,25 minutos nos pontos 1, 2 e 3 e 115,5 minutos no ponto referência. Segundo Francioni *et al.* (2007), o tempo de retenção inferior a 60 minutos indica danos severos nos hemócitos (Figura 2).

Essa informação reforça que os pontos 1, 2 e 3 podem estar impactados por agentes causadores de estresse oxidativo que gera a instabilidade lisossômica, pois esses pontos apresentam tempo de retenção do corante inferior a 60 minutos, e o ponto referência superior a 60 minutos. A diferença do tempo médio de retenção dos pontos 1, 2 e 3 em relação ao ponto referência foi estatisticamente significativa.

Comparando-se os resultados deste estudo com os de outras regiões, verifica-se que a Baía do Espírito Santo apresentou valores condizentes, demonstrando que o ensaio do vermelho

neutro é um biomarcador efetivo na identificação de perturbações em nível celular nos compartimentos lisossômicos de hemócitos provenientes de mexilhão *Perna perna*.

Os resultados obtidos nesse trabalho podem contribuir com órgãos ambientais do Estado do ES, pois oferecem subsídios à implantação de ações diferenciadas para recuperação e prevenção do ambiente, pois segundo Cheung *et al.* (1998), a avaliação da resposta celular dos bivalves servem de advertência do impacto ambiental.

Estudos de biomarcadores com mexilhão são de grande importância para o Estado do Espírito Santo, pois podem orientar aos pescadores do município de Vitória e região, o local menos impactado para a realização da coleta de sururu, que são utilizados na culinária capixaba. Essa prática poderá valorizar o turismo e cultura do Espírito Santo.

Após a avaliação da resposta celular do mexilhão *Perna perna* coletados na Baía do Espírito Santo, é possível concluir que:

O bioindicador utilizado foi encontrado em abundância na Baía do ES, o que torna o método viável para monitoramentos contínuos e possibilita a tomada de medidas preventivas antes da ocorrência de maiores distúrbios;

O biomarcador celular foi eficiente na avaliação do estresse oxidativo;

O ponto de coleta na região de Setiba (Município de Guarapari – ES) foi eficiente como ponto de referência, pois não apresentou desestabilização lisossômica em tempo inferior a 60 minutos;

Os pontos 1, 2 e 3 apresentaram alteração nos compartimentos lisossômicos de hemócitos do mexilhão *Perna perna*, sugerindo uma contaminação desses ambientes por poluentes causadores de danos oxidativos.

Agradecimentos

À APLYSIA e Tecnologia para o Meio Ambiente.

Referências

- Barnes RD (2006) **Zoologia dos Invertebrados**. 7 ed. São Paulo: Roca (SP).
- Borenfreund E, Puerner JA (1985) Toxicity determinate in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters** 24: 119-124.
- Cheung VV, Wedderburnm RJ, Depledge MH (1998) Molluscan lysosomal responses as diagnostic tool for the detection of a pollution gradient in Tolo Harbour, Hong Kong. **Marine Environmental Research** 46: 237-241.
- Depledge MH, Fossi MC (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (2). **Invertebrates Ecotoxicology** 3: 161-172.
- Fossi MC, Casini S, Savelli C, Corbelli C, Franchi E, Mattei N.; Sanchez-Hernandez JC, Corsi I, Bamber S, Depledge MH (2000) Biomarker responses at different levels of biological organization in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to benzo[a]pyrene. **Chemosphere** 40: 861-874.
- Francioni E, Wagener ALR, Cavalier B, Scofield AL (2005) Biomonitoring of

- polycyclic Aromatic hydrocarbon in *Perna perna* from Guanabara Bay, Brazil. **Environmental Forensics** 6: 361-370.
- Francioni E, Wagener ALR, Scofield AL, Depledge MH, Cavalier B (2007). Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. **Marine Pollution Bulletin** 54: 329-338.
- Furley TH (1993) **Utilização do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) como bioindicador dos metais pesados cádmio, chumbo, zinco, cobre e manganês do litoral do Rio Grande do Sul (Brasil)**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Fundação Universidade do Rio Grande.
- Gaze FN (2005) Tempo de residência na Baía do Espírito Santo. Monografia. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo.
- Huggett R, Limerle RA, Mehrle PM, Bergman HL (1992) **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Chelsea: Lewis Publishers.
- Jesus HC, Costa EA, Mendonça ASF, Zandonade E (2004) Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. **Química Nova** 27: 378-386.
- Krohling W, Freitas Netto R, Brum SM (2004) Levantamento preliminar da estrutura da comunidade bentônica da zona entremarés da Ilha do Frade, Vitória - ES. In: **XXV Congresso Brasileiro de Zoologia**. Brasília. Sociedade Brasileira de Zoologia.
- Lowe DM, Fossato VU, Depledge MH (1995) Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussel *Mytilus galloprovinciales* from the Venice Lagoon: in vitro study. **Marine Ecology Progress Series** 129: 189-196.
- Lowe DM, Pipe RK (1992) Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cell: in vitro study. **Aquatic Toxicology** 30: 357-365.
- McCarthy JF, Shugart LR (1990) Biological Markers of Environmental Contamination. In: McCarthy JF, Shugart, LR (ed). **Biomarkers of Environmental Contamination**. Chelsea: Lewis Publishers, p. 3-14.
- Nascimento IA, Sousa ECPM, Nipper M (2002). **Métodos em ecotoxicologia marinha; aplicações no Brasil**. Rio de Janeiro: Artes Gráficas e Indústria Ltda.
- Pereira CDS, Abessa DMS, Zaroni LP, Gasparro MR, Bicego M C, Taniguchi S, Furley TH, Sousa ECPM (2007) Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry** 26: 462-469.
- Santos MC (2004) **Morfometria de *Tivela mactroides* (Born, 1778) (bivalvia: veneridae) da Praia de Camburi, Vitória, Espírito Santo**. Monografia de Graduação: Santa Teresa: Escola Superior São Francisco de Assis.
- Souza EM (2002) **Avaliação da contaminação por metais pesados (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn) nos manguezais dos rios Aribiri, Bubu e Santa Maria da Vitória – Grande Vitória/ES – utilizando *Crassostrea rhizophorae* (Guildins, 1828) e *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) como biomonitores**. Dissertação de Mestrado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo.
- Svendsen C, Weeks JM (1995) The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet). **Marine Pollution Bulletin** 31: 139-142.
- Vasconcellos MAF (2004) **Bioacumulação e depuração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no mexilhão *Perna perna* em ensaios de microcosmos**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo.