



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR
MICROPLÁSTICOS NA
BIOMINERALIZAÇÃO DO GASTRÓPODE**
Pomacea canaliculata

Luiz Gustavo Alves Lopes

Orientadora: Marta Marques Souza
Coorientadora: Camila de Martinez Gaspar Martins

Rio Grande
2022



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR MICROPLÁSTICOS NA BIOMINERALIZAÇÃO DO GASTRÓPODE *Pomacea canaliculata*

Aluno: Luiz Gustavo Alves Lopes

Orientadora: Marta Marques Souza

Coorientadora: Camila de Martinez Gaspar Martins

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2022

Ficha Catalográfica

L864e Lopes, Luiz Gustavo Alves.
 Efeitos da contaminação por microplásticos na biomineralização
 do Gastrópode *Pomacea canaliculata* / Luiz Gustavo Alves Lopes. –
 2022.
 86 f.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
 FURG, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes
 Aquáticos Continentais, Rio Grande/RS, 2022.
 Orientadora: Dra. Marta Marques Souza.
 Coorientadora: Dra. Camila de Martinez Gaspar Martins.

 1. Calcificação 2. Cálcio 3. Ca²⁺+ATPase 4. Concha 5. Moluscos
 6. Polietileno I. Souza, Marta Marques II. Martins, Camila de Martinez
 Gaspar III. Título.

CDU 616-003.84

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES
AQUÁTICOS CONTINENTAIS



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS – Nº 004/2022**

Às 14h00 (quatorze horas) do dia 30 (trinta) do mês de maio de 2022 (dois mil e vinte e dois), via Webconferência no endereço eletrônico: (<https://conferenciaweb.rnp.br/events/defesa-mestrado-luiz-gustavo>) reuniram-se docentes, discentes e comunidade em geral, para a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado do acadêmico Luiz Gustavo Alves Lopes. A Dissertação intitulada **“EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR MICROPLÁSTICOS NA BIOMINERALIZAÇÃO DO GASTRÓPODE *Pomacea canaliculata*”** foi avaliada pela Banca Examinadora composta pela Orientadora: Prof^a. Dra. Marta Marques de Souza (Presidente da banca examinadora); Co-orientadora: Prof^a Dra. Camila De Martinez Gaspar Martins; Prof^a Dra Grasiela Lopes Leães Pinho (FURG) e Prof^a Dra Claudia Bueno dos Reis Martinez (UEL). Após a defesa e arguição pública, a Banca Examinadora reuniu-se, para deliberação final, e considerou o acadêmico **APROVADO**. Desta forma, o acadêmico concluiu mais uma das etapas necessárias para a obtenção do grau de **MESTRE EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS**. Nada mais havendo a tratar, às 18h00h (dezoito horas) foi lavrada a presente ata, que lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora, pelo Acadêmico e pelo Coordenador do Curso.

Prof^a. Dra. Marta Marques de Souza

Profª Dra. Camila De Martinez Gaspar Martins

Profª Dra Grasiela Lopes Leães Pinho

Profª Dra Claudia Bueno dos Reis Martinez

Luiz Gustavo Alves Lopes

Prof. Dr. Rogério Tubino Vianna
Coordenador do Curso

Dedico este trabalho à memória de minha avó
Deolinda Aparecida Pereira Alves
(♥28/02/1940♦ - ♣06/12/2019♠) e a todos os
caramujos da espécie *Pomacea canaliculata*
que foram necessários para o surgimento
desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

De acordo com a etimologia, a palavra agradecer contém a raiz *gratus*, que em latim significa ser acolhido ou acolher com favor + a terminação verbal *essere* que concede ação a palavra. Nesse sentido, me parece mais do que justo reconhecer com este agrado todo o acolhimento que recebi nesses anos de pós-graduação.

Em primeiro lugar agradeço à Deus, que me deu força, coragem e discernimento para terminar o curso, e que também não permitiu que a minha fé se abalasse, ainda que no contexto terrível da pandemia. Segundo, agradeço aos meus pais Paulo e Eneida Celestino, pelo apoio emocional e financeiro, por permitir esse aperfeiçoamento na minha formação, por todo amor e presença nos meus dias, mas acima de tudo agradeço pela confiança que vocês depositaram em mim e no meu propósito. Muito obrigado; eu amo muito vocês. Agradeço as minhas tias (em ordem alfabética) Ana Lucia, Anelisa e Rita, por acreditarem sempre em mim, por me mostrar em que tudo tem um momento certo de acontecer, e que independentemente de serem bons ou ruins eles passam, mas que ficam sempre lembranças no coração. Vocês são firmeza! Agradeço também as minhas tias Clara e Anna Thereza por terem me ligado periodicamente nas noites da pandemia; vocês me alegram! Agradeço aos meus irmãos Paulo Manoel, Leonardo, Giovanna, Pedro Henrique e Bruno; em vocês está a minha segurança de não estar só, obrigado pela presença nos meus dias durante este curso. É necessário agradecer aos meus primos José Cândido, José Guilherme, Anelisa, João Manoel, João Henrique, Ana Luísa e Pedro Henrique, pois também me apoiaram em momentos de angústia e solidão durante o curso. Amo vocês! A minha irmãzinha do coração, Priscilla Lopes, que sempre esteve presente me incentivando para que eu terminasse logo essa fase. Muito obrigado!

Agora, preciso agradecer aos meus amigos Tamires Pintado e Celomar Sena pelo nosso grupo de estudos, na preparação para o processo seletivo do PPGBAC; sem dúvidas, se não fosse por vocês eu não estaria aqui. Muito obrigado! Agradeço a todos os amigos da turma; gosto da ideia de que nossa turma foi a mais unida em anos de PPG, vocês são maravilhosos, e é muito satisfatório conhecer vocês, em especial a Gabriela Cossio, Raissa Praia, Amanda Travessas, Vinicius Mendes e Tauana Mores.

Agradeço também à família de coração que a FURG me deu, aos meus irmãos Bruno Henrique da Silva, Caroline Rezende, Carolina Machado e Maurício Lopes; a minha irmã Tainá Reis, e as minhas dindas Andrea Moraes, Sabrina Maya e Patrícia Buratto. Sem dúvidas, o amor de/por vocês foi fundamental pra mim chegar até aqui. Muito obrigado por tudo. Estendo também para algumas mães: Rosangela Mattos, Luciane Rezende, Liziane Reis, e Rosangela Moraes, o carinho e algumas comidinhas preparadas por vocês me nutriram até aqui! Agradeço também a

presença das minhas vizinhas nesse período tão difícil (especialmente pandêmico), Aline Bueno, Patrícia Zambelli e Laura Bastos. Compartilhar momentos com vocês preservou a minha saúde, a minha alegria e a minha esperança por dias melhores. Muito obrigado!

Preciso agradecer também às minhas amigas Andressa Suanes, Andressa Bonilha e Debora Chrisostomo, que em diferentes momentos e de diferentes maneiras, contribuíram para que eu conseguisse finalizar este trabalho. Muito obrigado minhas amigas! Agradeço, ainda as amigas Ana Rosa Melo, Talliandre Matos, Nicolli Gautério e Carinne Fortes, vocês foram verdadeiras fortalezas de refúgio para mim, agradeço por toda troca, reflexões e carinho, e também por sempre me inspirarem. Agradeço ao trio especial que me resgatou virtualmente em vários momentos de dificuldades: Junior Corrêa, Henrique Beneri e Leticia Pinheiro. Muito obrigado amores. Agradeço às amigas de sempre, Bianca Bimbato, Gabrielle Rahd e Isadora Fukassawa por acreditar na minha formação e profissão! Vocês são maravilhosas comigo! Por fim, ao amigo Ali El Assal, e as amigas da pauliceia Camila Makiyama e Kajila Finori por me mostrarem que a distância é apenas um número; também amo vocês!

“Profissionalmente” eu agradeço as professoras Sonia Hefler e Jaqueline Ritter por terem me iniciado na pesquisa científica, por me mostrarem anos a fio o quão satisfatório é descobrir e construir novos saberes! Muito obrigado minhas queridas, amo vocês! Agradeço carinhosamente aos técnicos Pablo Guimarães e Daiane Carrasco, que foram meus professores na graduação e que desde então, em nenhum momento, duvidaram da minha capacidade. Muito obrigado! Agradeço a professora Edelti Albertoni pela disponibilidade em me atender sempre que necessário; pela troca de figurinhas sobre pomaceas e pelas contribuições na minha formação. Muito obrigado! Agradeço a professora Fabiana Schneck pelo trabalho, dedicação e disponibilidade como coordenadora do curso, e também ao professor Rogério que atualmente exerce tal função. Muito obrigado! Agradeço também ao professor Luiz Hepp, pela disciplina de delineamento amostral e análise de dados que me “abriu os olhos” para a realização desta pesquisa. Excelente! Agradeço às integrantes do grupo da Profa. Marta, por me ouvirem sempre nas reuniões e nas prévias de apresentação; e aos integrantes do grupo da Profa. Camila, em especial a amiga Fernanda Lopes. Fer, se não fosse por você eu não estaria aqui. Muito obrigado!

Por fim, e de longe menos importante, agradeço as minhas orientadoras. É quase indescritível a minha admiração por vocês. Marta, nossa história começou faz tempo, em meio a debates e embates nas aulas de biofísica, evoluiu pra uma monitoria e culminou nesta orientação. E eu não posso encontrar desfecho mais feliz que este. Agradeço todas as mensagens, e-mails, as orientações, os papos de signo, meditação, alimentação saudável, dicas de banhos de ervas e óleos essenciais, enfim; toda a tua disponibilidade como orientadora.... Camila, eu diria que você é um *must*! Agradeço pela oportunidade que você me deu para mostrar o meu trabalho, a minha

dedicação e responsabilidade, obrigado pelas tuas respostas rápidas, precisas e cheias de conteúdo, por estar sempre disponível, dentro da tua realidade, e também por ceder tuas aulas da toxicologia para o meu estágio docência. Enfim, vocês são a síntese do que almejo ser quando crescer!

Para encerrar, agradeço às professoras Claudia Bueno e Grasiela Pinho que aceitaram compor a banca examinadora desta dissertação.

Luiz Gustavo

CHUVA ÁCIDA

Criolo

“Peixes mutantes invadindo o congresso
Vomitando poluentes com o logotipo impresso
B e R, quem é do mangue não esquece
As vítimas perecem, as famílias enlouquecem
O caranguejo gigante decepando seus corpos
Aniquilar suas famílias, jogá-las aos corvos
Garças bizarras movidas a óleo, sem dó e sem dor
Bicando seus olhos, sobrevoando em campos
Uma seleção de mortos, pensamentos mórbidos (não)
Realidade, carne e ossos
[...]

A chuva espalhando, todos os males
Ai ai, uiui, ai como isso arde
É bateria de celular, césio, similares
A peste invisível maculando os ares
Mercúrio nos rios, diesel nos mares, o solo estéril, é já fizeram sua parte
Uuh, ó, e salvem o planeta, papelzinho de bala no chão tio é muita treta
O sádico monstro está à frente
Sai do círculo vicioso e recicla sua mente (vamo estuda pô!)
Minha rima é voraz, árdua e quente, o Criolo aqui é doido e os planos são dementes
E o futuro é num piscar de olhos, cê tá sabendo?
(Olha ali ó) fulano ali tá derretendo

Nem água pra beber a gente não tem
Como que nós vamos viver?

[...]
Crack é fichinha, estão destruindo o planeta
Em breve nascerão vacas sem tetas
Nos cafezais, milharais, a praga dominando a colheita
A água que é pouca sumirá totalmente
Suas sacolas de dinheiro não comprarão seu copo de aguardente
Porque destruíram a cana, que adoça os doces, que adoça o amargo da vida
Olhar em volta e ver tanta burrice reunida
Vamos parar com isso, aprender sobre a coleta seletiva de lixo
Arqueólogos, geólogos, antropólogos façam parte dos nossos
Respeito e instrução ao povo para dizerem sim eu posso, sim eu posso, sim eu posso
Senhores do orgulho, abutres comerão suas tripas do entulho
As nuvens vão se formando, as gotas deteriorando
São as pernas quentes da morte aos poucos, aos poucos, aos poucos nos carregando”

RESUMO

A problemática dos resíduos plásticos ganhou maior atenção nas últimas duas décadas devido à descoberta de diminutos fragmentos entre 1µm e 5mm, nomeados microplásticos (MPs), especialmente em ecossistemas aquáticos. A maior parte das investigações ainda ocorre nos ambientes aquáticos, com prevalência do ambiente marinho, embora pesquisas relacionadas a ecossistemas de água doce e terrestres estejam ganhando popularidade. Estudos com peixes e crustáceos sugerem desbalanço na homeostase iônica, causado por alterações na concentração e no transporte de íons após exposições a MPs, especialmente de cálcio. Para organismos calcificadores tal íon é essencial para o processo de biomineralização, que permite a fabricação de conchas e partes mineralizadas. Assim, o presente trabalho objetivou investigar os efeitos de MPs de polietileno (PE) em biomarcadores da biomineralização do gastrópode dulcícola *Pomacea canaliculata*, como atividades enzimáticas (Ca^{2+} ATPase e anidrase carbônica) e concentração de cálcio, nos tecidos da borda do manto e da glândula digestiva e hemolinfa. Para tanto os animais foram expostos a 20 µg/L (MP) e água desclorada (CTR) em dois *sets* experimentais: (1) animais em condição fisiológica, por 24 e 72 h e (2) animais em condição de regeneração, por 72 e 120 h. Os resultados, em ambas as condições, indicaram que os MPs promovem alterações na concentração de cálcio hemolinfático e na atividade das enzimas Ca^{2+} ATPase e anidrase carbônica, nos tecidos da borda do manto e da glândula digestiva. No primeiro *set*, não foram observados padrões nas respostas enzimáticas da glândula digestiva, enquanto a ativação das atividades enzimáticas na borda do manto sugerem a manutenção da calcificação. Para o segundo *set* as respostas sugerem captação de cálcio via alimentação, enquanto as reduções de atividades enzimáticas no manto sustentam a utilização de outra via para recuperar a área lesionada. Além disso, a presença de MPs aumentou a taxa de regeneração da concha de *P. canaliculata*, o que pode estar associado à tentativa de imobilização das partículas pela calcificação, embora o mecanismo permaneça incerto. Por fim, podemos afirmar que (20 µg/L) MPs de PE foram capazes de alterar a disponibilidade de cálcio da hemolinfa em ambos *set* experimentais, bem como aumentar as atividades enzimáticas envolvidas no processo de biomineralização, especialmente no manto dos animais sem lesão.

Palavras-chave: Calcificação, Cálcio, Ca^{2+} ATPase, Concha, Moluscos, Polietileno

ABSTRACT

The plastic waste issue has gained increased attention in the last two decades due to the discovery of tiny fragments between 1 µm and 5mm, named microplastics (MPs), especially in aquatic ecosystems. Most research still takes place in aquatic environments, with a prevalence of the marine environment, although research related to freshwater and terrestrial ecosystems is gaining popularity. Studies with fish and crustaceans suggest imbalance in ion homeostasis, caused by changes in ion concentration and transport after exposures to MPs, especially calcium. For calcifying organisms, this ion is essential for the biomineralization process, which allows the manufacture of shells and mineralized parts. Thus, the present work aimed to investigate the effects of polyethylene (PE) MPs on biomineralization biomarkers in the freshwater gastropod *Pomacea canaliculata*, such as enzymatic activities (Ca²⁺ATPase and carbonic anhydrase) and calcium concentration, in mantle edge and digestive gland tissues and hemolymph, respectively. Animals were exposed to 20 µg/L (MP) and dechlorinated water (CTR) in two experimental sets: (1) animals in physiological condition for 24 and 72 h and (2) animals in regeneration condition for 72 and 120 h. The results, in both conditions, indicated that MPs promote changes in hemolymph calcium concentration and in the activity of the enzymes Ca²⁺ATPase and carbonic anhydrase, in both tissues. In the first set, the absence of a pattern in the enzymatic responses of the digestive gland suggests greater sensitivity of this epithelium to MPs, while the activation of the activities in the mantle edge indicate maintenance of calcification. For the second set, the responses suggest calcium uptake via feeding while the activities reductions in the mantle support the use of another route to recover the injured shell area. Furthermore, the presence of MPs increased the rate of *P. canaliculata* shell regeneration, which may be associated with particles immobilization attempt, by calcification, although the mechanism remains uncertain. Finally, we can state that (20 µg/L) PE MPs were able to alter the hemolymph calcium concentration, as well promote the enzymatic activity involved in the biomineralization process, specially in the mantle of non-excised gastropods.

Key-words: Calcification, Calcium, Ca²⁺ATPase, Mollusk, Polyethylene, Shell

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho está dividido em Introdução geral, Capítulo 1 e considerações finais. Para a formatação foram utilizadas as normas da ABNT, com exceção do capítulo 1 apresentado no formato de manuscrito, cuja formatação segue as normas do periódico ao qual será submetido.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1. A Problemática dos Plásticos:	3
1.1.1. Contextualização	3
1.1.2. Descoberta, definição e tipos de microplástico	4
1.1.3. Aporte de MPs, risco ecológico e efeitos na biota	6
1.2. A aplicação de moluscos nas investigações com MPs:	13
1.2.1. Estudos envolvendo MPs e gastrópodes	17
1.3. Mecanismos da biomineralização	21
1.3.1. Requisitos da biomineralização	23
1.3.2. Mobilização iônica e biomarcadores da biomineralização	26
1.3.3. Mecanismos da regeneração da concha	34
1.3.4. A biomineralização de moluscos na investigação de contaminantes e poluentes	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
2. OBJETIVOS	48
2.1. Objetivo geral	48
2.2. Objetivos específicos	48
3. HIPÓTESE	48
CAPÍTULO 1	49
ABSTRACT	50
GRAPHICAL ABSTRACT	51
1. Introduction	52
2. Materials and Methods	55
2.1. Gastropods cultivation and maintenance	55
2.2. Experimental Design	55
2.3. Biomarkers	56
2.3.1. Shell recovery image analysis	57
2.4. Statistical analyses	58
3. Results	58
3.1. Biomineralization biomarkers – non-excised shell animals	58
3.2. Biomineralization biomarkers – excised shell animals	59
3.3. Shell recovery image analysis	61
4. Discussion	63
5. Conclusion	68
6. Acknowledgments	69
7. References	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de publicações envolvendo os termos plastic pellets e a introdução do termo microplástico, para se referir ao tema, entre o período de 1970 até 2015. Fonte: extraído de “*Microplastics in the ocean: Sources, fate & effect*” (GESAMP. 2018).

Figura 2: Número de publicações de artigos de revisão envolvendo MPs e efeitos (eco)toxicológicos; entre o período de 2003 até 2018. Fonte: extraído de “*Annex XV Microplastics restriction repport proposal*” ECHA, 2019.

Figura 3: Frequência de estudos realizados com MPs até 2019 em táxons considerados representativos, com base nos dados incluídos na revisão realizada por GOMES e colaboradores (2022).

Figura 4: Grupos em destaque nas pesquisas com MPs, relacionadas exclusivamente a organismos de água doce, no período de 2011 a 2020. Nota-se que, em especial, gastrópodes e bivalves possuem uma diferença entre si maior que 50% no número de estudos. Fonte: KUKKOLA e colaboradores (2021).

Figura 5: A figura mostra uma raspagem na face externa da concha de *Pomacea canaliculata*, onde é possível identificar as três diferentes camadas gerais da concha dos moluscos: A) perióstraco B) óstraco e C) hipóstraco. *Fonte:* acervo pessoal.

Figura 6: A figura mostra os componentes morfofisiológicos envolvidos no processo de biomineralização de moluscos. Cada região está indicada por setas, bem como as nomenclaturas. Vale ressaltar que, na região do manto externo diferenças no epitélio garantem a formação específica de cada camada. *Fonte:* (MARIN et al., 2007).

Figura 7: A figura mostra as vias de absorção e incorporação de cálcio em moluscos, bem como a posterior mobilização para os tecidos e para a concha. *Fonte:* (SIMKISS; MASON, 1983).

Figura 8: Representação dos tecidos do manto e do espaço extrapalial. As estruturas e a direção do transporte encontram-se identificadas dentro do esquema.

Figura 9: Representação dos transportes relacionados à biomineralização nos epitélios do manto de moluscos. Fonte: criado com base nas informações publicadas por SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018; EBANKS; O'DONNELL; GROSELL, 2010; CHECA, 2018; CLARK, 2020.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A Problemática dos Plásticos:

1.1.1. Contextualização

A produção do plástico atual ocorreu principalmente após a Segunda Guerra Mundial sob a necessidade de produzir bens de consumo (roupas, calçados, utensílios domésticos) para contornar a indisponibilidade de outros materiais (JAMBECK et al., 2015). Com o tempo, os polímeros plásticos substituíram o uso de algodão, cimento, vidro, metal e madeira e tornaram-se um artigo inovador no mundo (ABIPET). O avanço das tecnologias de produção, associado ao baixo custo da matéria prima, permitiu o consumo de modelos descartáveis. O termo popularizado em inglês ‘*single-use*’ refere-se a itens de ‘uso-único’, como, copos, canudos, embalagens etc. Assim, a versatilidade dos plásticos sobrepôs, de certa forma, a preocupação da sociedade com o manejo e ciclo de vida de seus produtos (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017).

As primeiras investigações dos impactos ambientais envolvendo o descarte de resíduos sólidos (especialmente plásticos) mobilizou a comunidade científica na década de 1970, quando comitês e convenções sobre poluição marinha foram criados em países como Estados Unidos e Inglaterra. O objetivo era investigar e agrupar dados sobre a produção e descarte de resíduos sólidos bem como regulamentar esta prática (TURRA et al., 2020). Com o avanço das pesquisas, ainda nos anos 1970, autores também reportaram impactos ecológicos na abundância de aves e mamíferos marinhos e estuarinos. Por conseguinte, a análise do conteúdo estomacal de diversos organismos evidenciou a ingestão de grandes quantidades de resíduos, e identificou a ingestão de plástico como a causa da morte destes animais (ANDRADY, 2011).

Ainda que a indústria do plástico continue em alta, uma vez que esta matéria prima possui aplicabilidades de difícil substituição, a grande demanda se tornou um problema insustentável, com impactos possivelmente irreparáveis (THEVENON; CARROLL; SOUSA, 2015). Por sua resistência à decomposição, grande parte de todo o plástico já criado ainda persiste no planeta. No entanto, recentemente (últimas décadas), pesquisas científicas vêm sendo realizadas com diversos enfoques e abordagens para identificar, caracterizar, quantificar, e investigar a possível toxicidade de resíduos plásticos despejados no ambiente (HALPERN et al., 2008). Tal mobilização permitiu a inclusão dos plásticos na preocupação de agências e órgãos regulamentadores no mundo todo voltadas, num primeiro momento, para os impactos ambientais oceânicos, como a contaminação de plásticos e petróleo (TURRA et al., 2020). A partir dos anos 2000, a popularização da internet intensificou a divulgação de imagens dos

acúmulos plásticos em costas e oceanos. Tal fato incentivou a atuação e criação de novas organizações não governamentais (ONGs) e grupos de pesquisa, com intuito de conhecer, entender e explicar, fiscalizar, denunciar e conscientizar a sociedade sobre impactos ambientais e sustentabilidade (TURRA et al., 2020).

A pesquisa de GEYER e colaboradores (2017), envolvendo modelos matemáticos de distribuição, estima que até o fim de 2015 a indústria do plástico havia produzido 5,8 bilhões de toneladas de matéria prima plástica; com base nos dados de produção de oito setores representativos (e.g. fibras têxteis, nylon, resinas e construção). Os autores afirmam que ~60% do total foi descartado no ambiente, em aterros sanitários ou de forma irregular, em diferentes ecossistemas; enquanto ~30% ainda se encontra em uso, e ~21 % foi reciclado e/ou incinerado. Nesse sentido, o grande volume e persistência da contaminação por plásticos se tornou um marcador desta época geológica. A popularização do termo Antropoceno reconhece mudanças geológicas na biosfera, causadas por intervenções humanas no ambiente, em especial, a produção de gases e o despejo de materiais tóxicos, incluindo plásticos (CRUTZEN, 2002).

1.1.2. Descoberta, definição e tipos de microplástico

A descoberta mais alarmante na problemática dos plásticos, além da sua lenta degradação é também sua fragmentação em macro e micro resíduos e suas interações com os ambientes e biota (THOMPSON, 2004). Em 2004, a presença de diminutas partículas plásticas decantadas no assoalho marinho e em regiões de maré baixa introduziu o termo microplástico (MP) na sociedade em geral. Especificamente, referindo-se a partículas com tamanhos menores que 5 milímetros (*mm*); até então incluídos nas categorias de ‘*plastic pellets*’ ou ‘*plastic debris*’ (THOMPSON, 2004). Ainda que o conceito e definição não sejam universais, investigações envolvendo MPs ganharam popularidade desde então. Cientistas da Gesamp (do inglês, “*Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection*”) destacam que até 2015 o número de publicações havia aumentado significativamente, como indica o gráfico abaixo (Fig. 1). A maior parte delas aborda assuntos como: definição, caracterização, quantificação, interações com o ambiente, dispersão, toxicidade, acumulação, entre outros; no entanto a falta de dados e evidências em níveis orgânico, químico e bioquímico, ainda não permite conclusões precisas e estão sendo fomentadas.

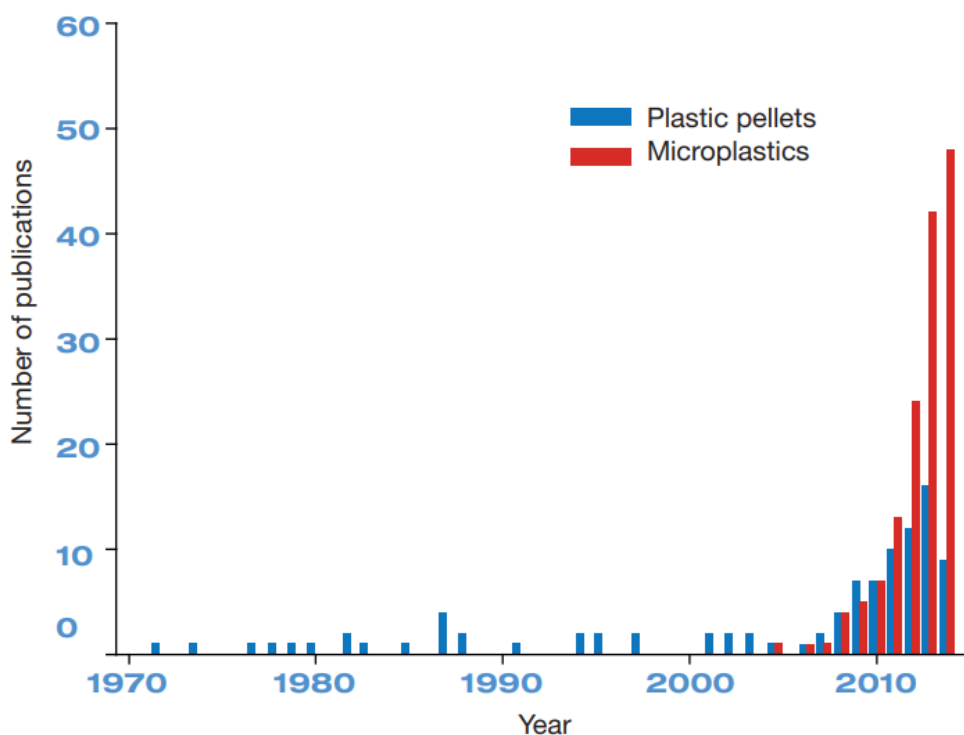


Fig. 1: Número de publicações envolvendo os termos plastic pellets e a introdução do termo microplástico, para se referir ao tema, entre o período de 1970 até 2015. Fonte: extraído de “*Microplastics in the ocean: Sources, fate & effect*” (GESAMP. 2018)

Atualmente, a definição do termo *microplástico* ainda não é consensual e pode variar entre as pesquisas; no entanto, em 2019 a agência europeia de químicos (ECHA, do inglês “*European Chemicals Agency*”) solicitou uma regulamentação do termo “*microplastic*” como qualquer material sólido de partículas poliméricas, ao qual aditivos ou outras substâncias possam estar presentes, e que compreende as dimensões $1\ \mu\text{m} \leq x \leq 5\ \text{mm}$. Para fibras o valor de comprimento é $3\ \mu\text{m} \leq x \leq 15\ \text{mm}$ com a proporção comprimento/diâmetro >3 . Polímeros naturais sem tratamentos químicos, bem como os biodegradáveis, não são considerados MPs (ECHA, 2019). Quanto à classificação dos MPs, esta considera o uso e a origem. A química dos monômeros formadores de cadeias poliméricas determinam a composição do material, e podem variar de acordo com a utilização. Dentre os mais investigados destacam-se: polietileno, polipropileno, poliestireno, poliuretano, policloreto de vinila, poliéster e poliamida (ECHA, 2019).

Assim, podemos dividi-los em duas categorias: MPs primários e MPs secundários. Os MPs primários são aqueles que chegam no ambiente com o tamanho igual ou inferior a 5 mm, sua origem e aplicação é industrial, incluindo a adição em produtos cosméticos; no geral encontram-se sob a forma de microesferas, mas também podem apresentar-se de forma oval,

retangular ou de polígonos aleatórios (na indústria têxtil encontram-se como fibras) (KLINGELHÖFER et al., 2020). São amplamente utilizados em soluções de manutenção industrial, detergentes e produtos de beleza, como microabrasivos mecânicos; também são matéria prima para a fabricação de lubrificantes e películas protetoras (e.g. peças automotivas, revistas, colas...). Por fim, podem ser descartados de maneira incorreta no processo de fabricação e manejo (ESSEL et al., 2015). Por outro lado, os MPs secundários são aqueles que caracterizam uma fragmentação e/ou abrasão lenta de pedaços plásticos maiores no ambiente; consequências do descarte irregular. Tal diminuição pode ser causada por exemplo por atrito, decomposição química e fotodegradação; são exemplos: redes de pesca, garrafas e tampas, embalagens em geral, restos de materiais de construção e pneus, tecidos sintéticos... e todo tipo de descarte plástico irregular; uma vez que consequentemente serão fragmentados com o tempo (KLINGELHÖFER et al., 2020).

1.1.3. Aporte de MPs, risco ecológico e efeitos na biota

As pesquisas envolvendo MPs vêm aumentando (PRINZ; KOREZ, 2020). No geral, as investigações se dividem em duas abordagens: ambiental e biota. O viés ambiental procura entender como as partículas primárias e secundárias chegam aos ecossistemas aquáticos e terrestres (HORTON et al., 2017). Como exemplo, a revisão de GEWERT; PLASSMANN; MACLEOD (2015) sobre os mecanismos de fragmentação das partículas secundárias, enfatiza a associação de variáveis como a temperatura, pH, radiação ultravioleta, marés, ventos e chuvas. Aparentemente, tais fatores podem intensificar o processo e aumentar a biodisponibilidade destes contaminantes no ambiente. Além disso, tal enfoque busca, ainda, rastrear os níveis desta contaminação, caracterizando e quantificando as partículas plásticas em diferentes compartimentos (i.e., níveis ecológicos) no intuito de encontrar concentrações ambientalmente relevantes.

Por outro lado, a investigação de interações específicas com a biota aquática também ganhou força nas últimas décadas (FOLEY et al., 2018). Nesse sentido, diferentes metodologias têm sido utilizadas para melhor compreender os possíveis efeitos frente à contaminação ou exposição aos MPs (ECHA, 2019). Na verdade, em 2017, o relatório da agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA, do inglês “*United States Environmental Protection Agency*”) já havia reportado que testes de toxicidade clássicos e estudos com biomarcadores ainda estão em processo de adaptação para responder perguntas relacionadas aos efeitos e interações dos MPs com a biota. O documento afirma que é necessário associar variáveis

subletais (i.e., *endpoints*) de fácil observação, como mudanças de comportamento, interferências no sucesso reprodutivo e alimentação, acumulação em órgãos e tecidos, alterações histológicas e atividades enzimáticas (U.S.EPA 2017). De fato, estudos com biomarcadores são muito utilizados na busca das possíveis interações com MPs. No geral, os autores buscam efeitos relacionados a inflamações, estresse oxidativo, respostas imunes, mecanismos de detoxificação, danos na membrana celular e no DNA, e alterações em neurotransmissores, entre outros, considerados clássicos no acesso da toxicidade de poluentes em geral (ECHA, 2019).

Nesse sentido, é possível perceber que além das diferentes estratégias, pesquisas envolvendo os MPs também possuem uma representatividade de grupos considerável. Interações e efeitos foram evidenciados desde o plâncton até vertebrados aquáticos e terrestres, incluindo algas, microalgas e macrófitas (VAN WEERT et al., 2019; WU et al., 2019). A necessidade de informações sobre a cinética e dinâmica destes contaminantes estabeleceu redes de colaboração entre instituições do mundo todo. A análise cienciométrica de BARBOZA; GIMENEZ (2015) identificou que, embora exista um crescimento (“quase exponencial”) das pesquisas e colaborações envolvendo MPs, algumas lacunas persistiam na época (como a origem e o destino das partículas). Na verdade, a socialização de achados e evidências são inevitáveis, especialmente quando relacionadas à contaminantes de preocupação emergente. Acredita-se que estas relações podem ser observadas no crescente número de artigos de revisão desde 2003 (quando surgiram propostas da nomenclatura MP), especificamente em respeito a pesquisas que buscaram efeitos (eco)toxicológicos em organismos aquáticos e terrestres (Fig. 2) (ECHA, 2019).

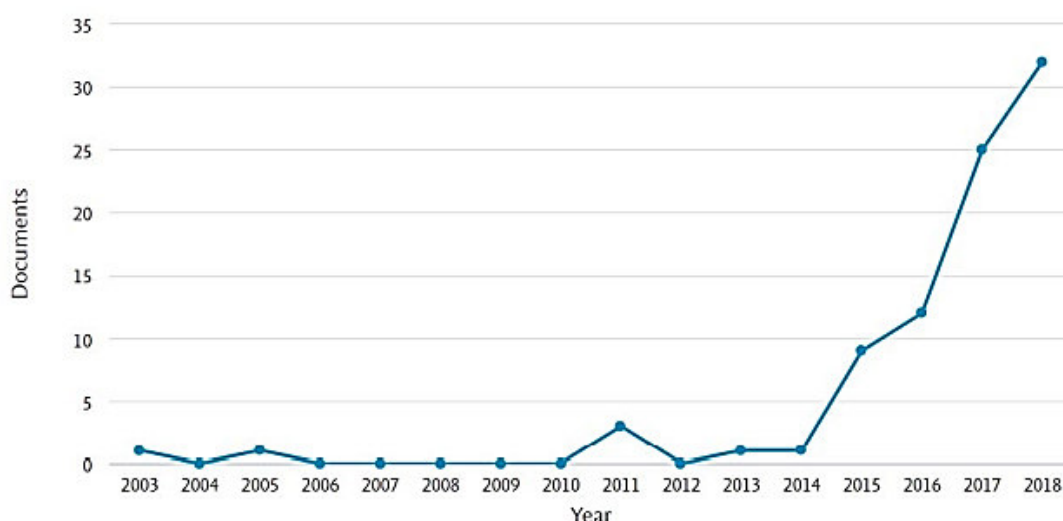


Fig. 2: Número de publicações de artigos de revisão envolvendo MPs e efeitos (eco)toxicológicos; entre o período de 2003 até 2018. Fonte: extraído de “*Annex XV Microplastics restriction repport proposal*” ECHA, 2019.

A necessidade de mapear a contaminação dos microplásticos nos ambientes naturais (especialmente aquáticos) e suas possíveis consequências, incentivou o uso de investigações clássicas da ecotoxicologia. Assim, não tardou para que avaliações de risco ecológico surgissem para complementar o entendimento das concentrações ambientalmente relevantes e passíveis de efeito. Tal metodologia é frequentemente aplicada para avaliar contaminantes de preocupação potencial (i.e., emergente) e se sustenta em concentrações conhecidas em ambientes naturais, testes de toxicidade e estudos ecotoxicológicos, envolvendo um número representativo de trabalhos e grupos (i.e., taxa). Além disso, é baseada em dados considerados de “alta qualidade”, que atendem uma série de critérios avaliativos relacionados à conduta da pesquisa, condições de exposição, representatividade, replicabilidade, precisão, entre outros (MOERMOND et al., 2016). Por fim, tem como objetivo encontrar valores relevantes e matematicamente relacionados, tais como, concentrações ambientais médias, concentrações previstas que não causam efeitos e um coeficiente de risco ecológico. No entanto, algumas questões ainda dificultam o trabalho dos pesquisadores. Pesquisas com diferentes polímeros e tamanhos podem ser comparadas? Qual a melhor expressão das concentrações: peso/volume, número de partículas? Aparentemente, tais questões ainda permanecem sem respostas, ao passo que novas informações surgem.

A investigação de risco ecológico, em ecossistemas de água doce da Holanda, realizada por BESSELING e colaboradores (2019) demonstra tais dificuldades. As concentrações ambientais são frequentemente expressas em número de partículas, enquanto na maioria dos estudos, envolvendo exposição em laboratório, são expressas nominalmente. Portanto, a conversão de valores para estabelecer relações aparenta ser inevitável; como também aponta a revisão bibliográfica de CONNORS; DYER; BELANGER (2017). Mas a que preço? Embora BESSELING e colaboradores (2019) tenham encontrado concentrações ambientais relevantes, os valores log-transformados podem dificultar a utilização prática destas informações em outros trabalhos. Os resultados pouco dizem em questões de concentrações propriamente ditas, considerando que a grandeza (valor em log) está mais relacionada a maiores ou menores concentrações de MPs em cada região observada. No entanto, é pertinente destacar que algumas regiões apresentaram concentrações disparadamente maiores do que outras. E embora tal discrepância possa tendenciar o resultado, os autores chamam a atenção para a existência de

“hotspots” e indicam que o estudo destas regiões é determinante na caracterização das contaminações por MP.

Outro fator importante é o tamanho das partículas. Nesta avaliação, BESSELING e colaboradores (2019) encontraram nos rios holandeses partículas com tamanho entre 50 μm - 5 mm. Os valores foram então relacionados matematicamente por meio da curva de sensibilidade de espécies (SSD, do inglês “*species sensitivity distribution*”), a partir da listagem das concentrações de MP utilizadas em testes de toxicidade e estudos ecotoxicológicos, com tamanho clássico (i.e., 1 μm - 5 mm). Tal ferramenta é utilizada na avaliação de risco ecológico uma vez que pode fornecer uma concentração estimada do contaminante em questão, que teoricamente afetaria apenas 5% das espécies representativas incluídas no estudo. Assim, os autores encontraram uma concentração “perigosa” de 1,67 $\mu\text{g/L}$ (HC_5 , do inglês “5% *hazardous concentration*”). Logo, para definir a concentração prevista sem efeito (PNEC, do inglês “*predicted no effects concentration*”) a HC_5 foi derivada seguindo critérios matemático que consideram os ruídos nos dados da investigação, como incompatibilidades, diferenças de grandeza, robustez e consistência das informações. Posteriormente, o valor foi então dividido por um fator de avaliação (do inglês, “*assessment factor*”), evidenciando um PNEC final de 0,33 $\mu\text{g/L}$ de MPs. Por fim, os autores afirmam que as concentrações encontradas podem servir como ponto de partida, para futuras investigações, embora ainda existam incertezas nestas evidências, principalmente a respeito da conversão das unidades de concentração.

Por outro lado, a avaliação de risco ecológico de ADAM; YANG; NOWACK (2019) utilizando concentrações ambientais de corpos de água doce do mundo todo apresentou-se mais conclusiva. Os autores estimaram um PNEC de 0,042 μg (~10 vezes menor que o valor holandês) que aparentemente está em acordo com as concentrações sem efeito reportadas pela literatura. Para comparar com as concentrações ambientais (medidas e previstas) foi realizada a conversão da concentração nominal para o número de partículas/L (diferentemente de BESSELING et al., 2019 que optou por transformar os valores em log). O PNEC encontrado foi de 740 partículas L^{-1} enquanto as concentrações ambientais observadas ficaram entre 0,0001-520 partículas L^{-1} . Assim, os autores concluem que a proximidade dos valores evidencia que as concentrações ambientais estão, não só aumentando mas que também podem, em breve, ultrapassar o valor do PNEC. Assim, os resultados indicam que os MPs se tornarão um risco ecológico para os sistemas de água doce.

A revisão metanalítica de HORTON e colaboradores (2017) mapeou anos antes as concentrações ambientais (em número de partículas) de ecossistemas aquáticos dulcícolas, e terrestres associados. Como esperado, os números variaram entre lagos e rios de diferentes

países, no entanto as concentrações achadas foram muito inferiores que os valores encontrados na avaliação de risco ecológico de ADAM; YANG; NOWACK (2019), considerando o intervalo de dois anos. Como exemplo, lagos espalhados pelo mundo apresentaram valores entre 0,00005 - 0,03 partículasL⁻¹. Os autores afirmaram que a previsão de crescimento era não só eminente, mas exponencial, o que pode sustentar a aplicabilidade dos dados elevados, encontrados por ADAM; YANG; NOWACK (2019), nos anos seguintes. No mesmo sentido, uma recente quantificação de MPs em lagos da Rússia também mostrou valores maiores que os de HORTON e colaboradores (2017); a concentração de MPs ficou entre 0,044 - 0,051 partículas/L (FRANK et al., 2020). Adicionalmente, os autores também apresentaram as seguintes concentrações nominais convertidas 0,079 - 0,087µg/L, que já estão acima do PNEC observado na avaliação de risco ecológico de ADAM; YANG; NOWACK (2019). Ainda que superficialmente, tais informações auxiliam no entendimento de que a concentração ambiental de MPs está de fato aumentando.

Com a chegada de novas informações, dúvidas em relação à origem dos MPs também surgiram. Considerando que estes já se encontram no ambiente, é esperado que existam vias de entrada e dispersão destes contaminantes, especialmente em ecossistemas aquáticos (ECHA, 2019). Em relação à água doce, estações de tratamentos de água (ETA) são investigadas para confirmar a presença e/ou a quantidade de MPs. Nesse sentido, algumas análises em água captada para tratamento apresentaram valores consideravelmente altos quando comparados aos ambientais. Estudos apontaram concentrações de MPs que variam entre 68 - 910 partículas/L (LESLIE et al., 2017); 20 - 40 partículas/L (BESSELING et al., 2019); 10,4 - 20,9 partículas/L (MURPHY et al., 2016). Os achados de MURPHY e colegas (2016) indicam que, num primeiro momento não houve uma diminuição significativa de MPs nas águas tratadas, o que vem incentivando a procura e adoção de outros passos no tratamento. A aplicação de processos oxidativos, decantação, escumação manual (do inglês “*skimming*”) e principalmente a instalação de microfiltros são métodos que têm mostrado eficácia de remoção de MPs entre 90-98% nos efluentes de diversas ETAs (MURPHY et al., 2016).

Atualmente, a incorporação de filtros e processos adicionais no tratamento de água é sugerida por agências internacionais como a ECHA e U.S. EPA, quando o assunto é MP. Entretanto, embora as ETAs caminhem para remover de maneira eficiente os MPs da água, é evidente que estes ainda terminam em corpos de água doce. A revisão de HORTON e colaboradores (2017) explicou tal fenômeno. O desague de águas “parcialmente” tratadas (i.e., ainda com MPs) é uma das fontes da contaminação de lagos e rios, além disso, fatores abióticos como chuvas e ventos aparentemente aceleram esse trajeto. A mobilidade encontrada nos

afluentes e efluentes podem impedir a acumulação de MPs, contrariamente ao observado em regiões de delta e estuarinas. Não obstante, a recente revisão de LU e colaboradores (2021), sobre MPs em ambientes aquáticos, alerta para inconsistências na aplicabilidade de concentrações ambientais e exemplifica que as diferenças destas concentrações podem alcançar mais de oito magnitudes.

Dentre os estudos disponíveis, o número de trabalhos direcionados para os oceanos é maior. Em análise bibliométrica, na plataforma Scopus®, BLETTLER e colaboradores (2018) indicam um viés nas pesquisas envolvendo MPs, que prioriza o ecossistema marinho. Até 2015, 87% das pesquisas incluídas na análise foram direcionadas para o ambiente marinho, enquanto 13% para os dulcícolas. Ainda que em menor quantidade, os dados de água doce evidenciam uma contaminação tão alarmante quanto nas costas e oceanos. Nesse sentido os autores justificam que o viés pode estar relacionado a visível contaminação de macro-resíduos plásticos em praias e estuários, o que levou num primeiro momento à identificação de MPs e estimulou a realização de novas pesquisas (BLETTLER et al., 2018). Adicionalmente, diversos experimentos têm sido conduzidos em laboratórios para avaliar a toxicidade dos MPs, pois é possível controlar as variáveis e porque são facilmente executáveis quando comparados com aqueles realizados *in situ* (CAMPOS DA ROCHA et al., 2021; KUTRALAM-MUNIASAMY et al., 2021; LU et al., 2021; WU et al., 2021) No entanto, algumas variáveis podem impedir maiores generalizações dos achados, em relação ao cenário de contaminação ambiental, como a utilização de apenas um polímero, tamanho pouco representativo, presença ou ausência de cor, capacidade de adsorção, adição de aditivos, entre outros (BOUR et al., 2021; ROZMAN et al., 2021).

FOLEY e colaboradores (2018), em revisão metanalítica, constataram que a ingestão de MPs é a principal via de contaminação dos animais, especialmente em invertebrados aquáticos. De fato, diversos autores sugerem que as partículas plásticas podem ser facilmente ingeridas, como e com o alimento (BRADNEY et al., 2019; DE-LA-TORRE, 2020; MATHEUS et al., 2020; WU et al., 2021). Adicionalmente, as pesquisas sustentam tal ideia por encontrar MPs em alguma porção do sistema digestivo. LEI e colaboradores (2018) relacionaram danos no DNA e estresse oxidativo, em células intestinais do peixe *Danio rerio*, com a presença de 0,1; 1 e 5 g/L de MPs de polietileno (PE). Além disso, investigações histológicas evidenciaram o rompimento das microvilosidades intestinais. Por outro lado, a “egestão” de MPs sem alterações na saúde de organismos aquáticos também é reportada (BATEL et al., 2016; DUIS; COORS, 2016). No entanto, uma vez incorporados e acumulados, a interação dos MPs com os tecidos pode ser inevitável.

Algumas informações ainda necessitam melhor entendimento, considerando que a incorporação de aditivos, como cobertura (do inglês, “*coating*”) pode aumentar a toxicidade e/ou favorecer interações (BRADNEY et al., 2019a; HWANG et al., 2020). Como partículas químicas (i.e., cadeia de monômeros), os MPs possuem a capacidade de adsorver substâncias, especialmente metais, o que pode intensificar os efeitos ou dificultar o entendimento das causas. No entanto, tal capacidade pode variar de acordo com os aditivos, tamanho e composição polimérica, o que tende também a aumentar a especificidade das pesquisas (HUANG et al., 2021). Geralmente, pesquisas de exposição em laboratório são realizadas com microesferas virgens (i.e., sem aditivos) de tamanhos e composição conhecidas e que podem ser compradas com ou sem cor e fluorescência (VON MOOS; BURKHARDT-HOLM; KÖHLER, 2012; FOLEY et al., 2018; RODA et al., 2020; WU et al., 2021). Artigos mais recentes passaram a incluir certificados de composição, vistos como uma boa prática de pesquisa (XU et al., 2020; DING et al., 2021; ROZMAN et al., 2021; HAN et al., 2022). Na verdade, quando comprado, a composição é incluída no rótulo e garantida pelos fabricantes; enquanto os certificados incluem análises específicas de composição, como a espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e Raman (que também podem ser solicitadas diretamente ao fabricante, mediante pagamento).

Outros fatores consideráveis para as pesquisas são a composição, tamanho e concentração das partículas. A pesquisa de LEI e colaboradores (2018) verificou que exposições de 5 mg/m² de MP de polietileno causou uma queda significativa nas concentrações de cálcio plasmático do nematódeo terrestre *Caenorhabditis elegans*, no entanto para *D. rerio* tal efeito não foi observado, nas mesmas condições. Por outro lado, no trabalho de RODA e colaboradores (2020), os autores observaram uma queda nas concentrações de cálcio plasmático do peixe *P. lineatus*, exposto a 20 µg/L de MPs, também de polietileno. Assim, é difícil generalizar efeitos encontrados, ainda que em organismos semelhantes (i.e., peixes de água doce) e utilizando o mesmo polímero. Curiosamente, a concentração do efeito observado por RODA e colegas (2020) foi ~250x menor que a concentração sem efeito adotada por LEI e colegas (2018), em *D. rerio*. Por outro lado, no trabalho de WATTS e colaboradores (2016), caranguejos costeiros *Carcinus maenas* foram expostos a 10⁶ partículas/L de MPs de poliestireno. Os autores observaram um aumento na concentração de cálcio plasmático, em oposição ao observado nos peixes de água doce.

Tais informações auxiliam na compreensão das dificuldades que surgem quando se pesquisa com MP, e ainda deixam algumas dúvidas: O aumento da concentração de cálcio em *C. maenas* ocorreu exclusivamente devido ao poliestireno? Uma vez que o polietileno diminuiu

a mesma variável em *P. lineatus*. A diferença entre os grupos (i.e., peixes dulcícolas vs. crustáceo marinho) é determinante? O valor de 10^6 partículas/L estão mais próximas de 5 mg/L ou 20 µg/L? Embora tais perguntas também permaneçam sem respostas precisas, é possível afirmar que pesquisas com MPs acessam de modo particular a saúde dos organismos. Em suma, as investigações ecotoxicológicas podem sim indicar os possíveis riscos da contaminação dos MPs sobre a biota aquática de modo geral, embora os mecanismos desta interação ainda permaneçam incertos. Ademais, considerando que mesmo “isolados”, os efeitos observados em laboratório possivelmente reproduzem os mesmos ocorridos do ambiente natural. Assim, existe um alerta para riscos potenciais nos ecossistemas, principalmente em níveis de populações e comunidades, além da necessidade de mais estudos científicos sobre o tema (DIOSES-SALINAS; PÉREZ-BACA; DE-LA-TORRE, 2019; PRINZ; KOREZ, 2020; BANK; HANSSON, 2022).

1.2. A aplicação de moluscos nas investigações com MPs:

A popularização de estudos com MPs e moluscos aparentemente está relacionada a dois fatores: 1) o interesse da comunidade científica na investigação de animais filtradores e pastadores (i.e. do inglês, “*filter-feeders*” e “*grazers*”, respectivamente) e 2) a dispersão dos moluscos em diferentes ecossistemas e compartimentos (DIOSES-SALINAS; PÉREZ-BACA; DE-LA-TORRE, 2019; VAN CAUWENBERGHE et al., 2015). Na verdade, tais características estão principalmente associadas ao potencial de retenção de partículas, considerando o hábito alimentar e o possível risco de transferência de MPs para níveis tróficos maiores (HORTON et al., 2017). No geral, a importância ecológica dos moluscos se dá ao fato destes organismos se comportarem como engenheiros ecossistêmicos, e/ou também como espécies chave (do inglês, “*keystone species*”), com potencial de controlar as relações nos primeiros níveis tróficos (i.e., produtores, consumidores primários e secundários) (WRIGHT; JONES, 2006; BESSELING et al., 2019).

Nesse sentido, as pesquisas com moluscos possuem um caráter ecológico, mesmo que indireto, uma vez que diversos autores consideram relevante à investigação de efeitos da contaminação por MPs em organismos de níveis tróficos inferiores (NAJI; NURI; VETHAAK, 2018; MAGNI et al., 2018; BESSELING et al., 2019; TANG et al., 2020). Além disso, acredita-se atualmente que estudos ecotoxicológicos com MPs, envolvendo espécies ambientalmente relevantes, são mais representativos na caracterização da contaminação e possíveis consequências na biota, especialmente aquática (WARD et al., 2019; DING et al., 2021).

Muitos são os efeitos dos MPs nos moluscos (como em diversos outros filos), que variam entre os níveis subcelular, organismico e de população; embora investigações em níveis ecossistêmicos ainda estejam surgindo (GOMES et al., 2022). As variáveis subcelulares com efeitos mais observados são indicativas de estresse oxidativo, como alterações na formação de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes (e.g., VON MOOS; BURKHARDT-HOLM; KÖHLER, 2012; BEGLIOMINI et al., 2017; LEI et al., 2018; HUANG et al., 2021). Alterações na expressão de genes também são reportadas, envolvendo as vias de sinalização para detoxificação, respostas imunes, controle de apoptose, formação de conchas e reservas energéticas (e.g., TANG et al., 2020; CAMPOS DA ROCHA et al., 2021; HUANG et al., 2021; HAN et al., 2022). A investigação de efeitos relacionados a neuro e genotoxicidade também evidencia danos no DNA, formação de micronúcleos e alterações na atividade da acetilcolinesterase (e.g., BRANDTS et al., 2018; BRÂTE et al., 2018; MAGNI et al., 2018). Para o nível organismico, as investigações relatam principalmente a ingestão de MPs, além de alterações na capacidade de alimentação, taxa de filtração, absorção e assimilação de nutrientes e minerais (MAGNI et al., 2018; BRADNEY et al., 2019; INOUE; ONITSUKA; KOITO, 2021; MATHEUS et al., 2020). Investigações histológicas também são popularmente utilizadas e no geral evidenciam alterações específicas no epitélio de órgãos como manto, brânquias, rim e glândula digestiva (VON MOOS; BURKHARDT-HOLM; KÖHLER, 2012; LEI et al., 2018; WAITE; DONNELLY; WALTERS, 2018; HAN et al., 2022). Já em nível populacional, os efeitos comumente relatados envolvem alterações na fecundidade, e no desenvolvimento de larvas (SUSSARELLU et al., 2016; GARDON et al., 2018; LUAN et al., 2019). Nesse sentido, moluscos não só são adequados para investigações com MPs, mas também são promissores, considerando algumas respostas rápidas e de fácil acesso (DIOSES-SALINAS; PÉREZ-BACA; DE-LA-TORRE, 2019; NAJI; NURI; VETHAAK, 2018).

Por outro lado, algumas pesquisas ressaltam para a possível resistência destes organismos, e/ou capacidade de superar os impactos causados pelos MPs (SANTANA et al., 2018; TALLEC et al., 2018). Evidências indicam a capacidade, de bivalves e gastrópodes, em regurgitar parte dos MPs incorporados pela ingestão, aparentemente sem danos à saúde; no entanto os custos deste processo ainda são incertos (WOODS et al., 2018; WARD et al., 2019). Nesse sentido, a mortalidade é pouco relatada nos estudos em geral (GOMES et al., 2022). De fato, acredita-se que concentrações que causam mortalidade estão muito acima das concentrações usualmente adotadas (ambientalmente relevantes ou não) e podem superestimar

os resultados (ADAM; YANG; NOWACK, 2019; BESSELING et al., 2019; GOMES et al., 2022).

Embora os efeitos possam variar, grande parte da preocupação científica está voltada para o consumo de moluscos na alimentação, considerando que dados sobre interações e impactos de MP na saúde humana ainda estão surgindo (WU et al., 2021; HAN et al., 2022). Inclui-se, ainda, investigações relacionadas ao cultivo de ostras e mariscos, do ramo alimentício e/ou da produção de pérolas. Especificamente, a utilização de contas plásticas (do inglês, “*plastic beads*”) já é adotada como substrato artificial para a fabricação de pérolas. É divulgado que tal aplicação aumentou a taxa de produção deste artefato, e aparentemente não traz danos à saúde dos animais; embora mais pesquisas também sejam necessárias. Nesse sentido, a maioria das pesquisas científicas envolvendo MPs e moluscos, até o momento, foram realizadas com bivalves (WU et al., 2021; HAN et al., 2022).

A recente revisão de GOMES e colegas (2022) sobre os impactos ecotoxicológicos dos MPs sustenta a popularidade dos moluscos na investigação de interações. Os resultados indicam que, dentre os artigos selecionados (i.e., $n = 175$), o filo Mollusca ocupou a terceira posição na frequência de estudos (21%), como ilustrado abaixo (Fig. 3). É pertinente destacar que tal revisão utilizou critérios muito mais rígidos, quando comparado com as demais, como a inclusão de controles positivo e negativo, número mínimo de réplicas = 3, confirmação da composição do polímero (FT-IR), confirmação da concentração de exposição (em número de partículas). O que possivelmente justifica a exclusão de ~21% dos trabalhos inicialmente selecionados (GOMES et al., 2022).

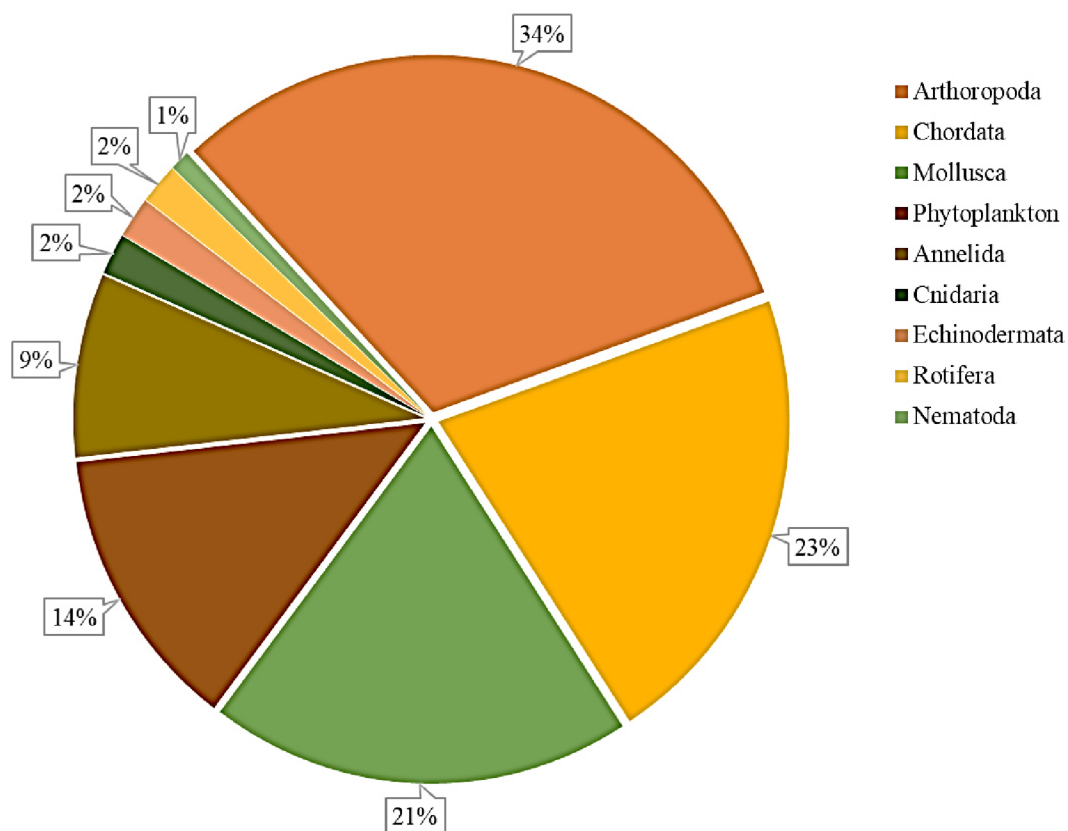


Fig. 3: Frequência de estudos realizados com MPs até 2019 em táxons considerados representativos, com base nos dados incluídos na revisão realizada por GOMES e colaboradores (2022).

Como mencionado, inúmeros trabalhos enquadram a ingestão como principal via de contaminação por MPs. BESSELING e colaboradores (2019) acreditam que organismos filtradores, bem como os bioturbadores (i.e., que revolvem a água e o sedimento) possuem a capacidade de alterar as concentrações de MPs no sedimento e na coluna d'água. Isto é possível devido ao hábito filtrador e a presença de muco ao seu redor que seria um ligante adicional aos MPs. Acredita-se que tais fenômenos possam intensificar a biomagnificação de MPs nas relações tróficas (i.e., cadeia alimentar), e também apontam para mais vias de incorporação de MPs. Adicionalmente, é observado a acumulação de microplástico em brânquias e outros tecidos moles dos moluscos (e.g., cavidade do manto e pé), embora mais informações sejam necessárias para atribuir relações precisas em níveis ecossistêmicos (DIOSES-SALINAS; PÉREZ-BACA; DE-LA-TORRE, 2019; GUTOW et al., 2019, 2019; WU et al., 2021).

1.2.1. Estudos envolvendo MPs e gastrópodes

Pesquisas científicas utilizando gastrópodes como modelos biológicos também são popularmente realizadas no monitoramento ambiental de contaminantes, bem como na ecotoxicologia (Begliomini et al., 2017; Naji; Nuri; Vethaak, 2018; Radwan; El-Gendy; Gad, 2020; Xu et al., 2020). Pode-se afirmar que o interesse nessa aplicação aumentou a partir de estudos que evidenciaram a capacidade destes organismos em acumular substâncias. Nesse sentido, Melo e colaboradores (2000) consideraram necessária tal utilização na busca de possíveis efeitos e interações causadas por substâncias. Consideram, ainda, que a representatividade (em níveis tróficos) pode contribuir na disponibilização de novas informações. Especificamente afirmam que fatores como ampla distribuição geográfica, abundância e nível trófico relevante tornam os caramujos do gênero *Pomacea* um modelo biológico adequado (como a maioria dos moluscos) (Melo et al., 2000).

Embora existam pesquisas relacionadas a contaminantes e poluentes, como mencionado, grande parte da literatura disponível está, no geral, dividida em dois outros temas principais: 1) aspectos ecológicos (dispersão, relações tróficas, reprodução e ciclo de vida, fatores abióticos e alimentação, relações com parasitas, etc.) (Glass; Darby, 2009; Godoy; Castro-Vazquez; Vega, 2013; Lobo-da-Cunha et al., 2018; Lobo-da-Cunha, 2019) e 2) mecanismos relacionados à formação e caracterização de conchas (Marxen et al., 2003; Banks; O'Donnell; Grosell, 2010a; Yang et al., 2016; Liu et al., 2017).

Especificamente, em relação aos MPs, a literatura ainda está surgindo (Dioses-Salinas; Pérez-Baca; De-la-Torre, 2019; Gomes et al., 2022). Para ilustrar, uma pesquisa rápida na plataforma *Science direct* com os termos *gastropod* AND *microplastic* retorna um total de 285 artigos; dos quais 24 foram publicados até 2017 e o restante (i.e., 261) compreende o período entre 2018 e 2022. Além disso, boa parte dos trabalhos não são exclusivamente relacionados a gastrópodes, outros possuem um viés de monitoramento ambiental, ao passo que poucos são voltados para a ecotoxicologia. No entanto, é possível perceber que associado à preocupação emergente, em respeito dos MPs, pesquisas com gastrópodes estão ganhando popularidade (observação do autor).

A aparente discrepância dos estudos com bivalves, em relação aos demais grupos, aparenta incentivar a realização de novas pesquisas na busca de informações específicas. Como exemplo, diversos trabalhos envolvendo MPs e gastrópodes utilizam como referências pesquisas relacionadas à bivalves, e evidenciam a falta de dados específicos para este

contaminante e grupo (observação do autor). Na revisão de KUKKOLA e colaboradores (2021) é possível perceber que a mesma desigualdade também se aplica nos estudos envolvendo exclusivamente organismos e/ou ecossistemas dulcícolas (Fig. 4).

Em relação aos efeitos, destacam-se, no geral os mesmos observados em bivalves, como estresse oxidativo, resposta imunes, e alterações genéticas; geralmente acessadas por meio de variáveis subletais. Além disso acredita-se que, como invertebrados bênticos, os gastrópodes estão potencialmente mais suscetíveis a interações com microplásticos decantados no assoalho aquático; o que também se aplica para gastrópodes terrestres. Como mencionado anteriormente, os indícios da aderência de MPs no muco ligante, especialmente na região do pé, sustentam a possibilidade de transferência pela cadeia trófica (considerando ainda que outros animais se alimentam deste muco) (KUKKOLA et al., 2021; ROZMAN et al., 2021).

A revisão de RADWAN; EL-GENDY; GAD (2020) também defende a utilização de gastrópodes (terrestres) nas investigações com poluentes e contaminantes em geral. Os autores afirmam que a combinação de diferentes biomarcadores é uma abordagem eficiente e que permite uma “visão geral” das interações e efeitos. Além disso, complementam que, embora existam esforços para o avanço destas investigações, muitas informações ainda são necessárias não só para validar, mas também comparar os dados obtidos em laboratório com aqueles observados no ambiente.

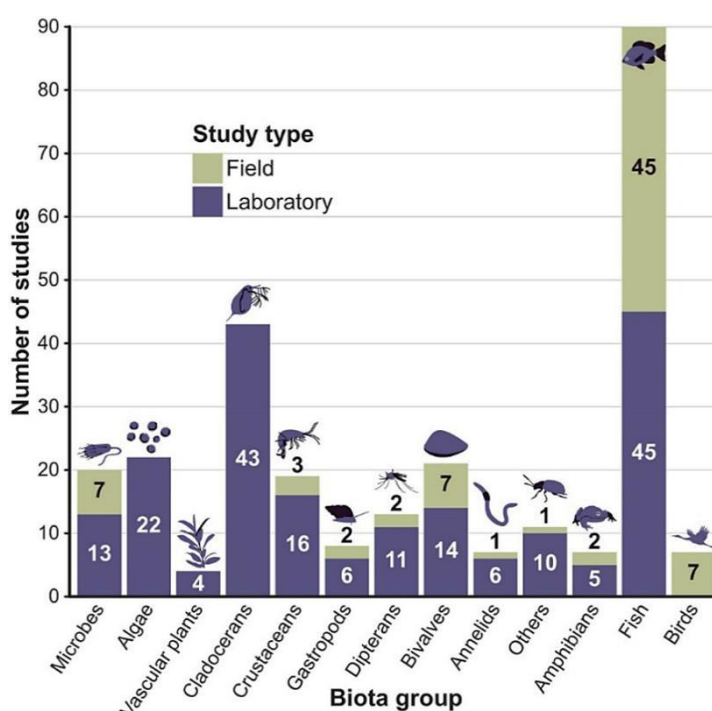


Fig. 4: Grupos em destaque nas pesquisas com MPs, relacionadas exclusivamente a organismos de água doce, no período de 2011 a 2020. Nota-se que, em especial, gastrópodes e

bivalves possuem uma diferença entre si maior que 50% no número de estudos. Fonte: KUKKOLA e colaboradores (2021).

Recentemente, uma pesquisa de campo utilizou gastrópodes das espécies *Lanistes varicus* and *Melanoides tuberculata* na investigação da presença de MPs em um sistema pluvial da Nigéria (os autores afirmam ser o primeiro estudo empírico da África ocidental a utilizar gastrópodes no acesso desta contaminação) (AKINDELE; EHLERS; KOOP, 2019). Os resultados evidenciaram a ingestão e o acúmulo nos tecidos, de fibras e filmes de nylon e polietileno, respectivamente. Por fim, os autores ressaltam que os resultados estão de acordo com os macro-resíduos na região e possivelmente a fragmentação aconteceu *in situ* (AKINDELE; EHLERS; KOOP, 2019).

Investigações relacionadas ao crescimento e alterações de conchas também aparentam ser promissoras no acesso da toxicidade de poluentes e contaminantes. BEGLIOMINI e colaboradores (2017) utilizaram como modelo biológico gastrópodes da espécie *Lottia subrugosa*, que habitavam regiões costeiras com três níveis de impacto ambiental (i.e., baixo, médio e alto). Os autores buscavam potenciais alterações na morfologia das conchas destes animais, causadas por contaminantes de origem antrópica, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, bifenilas policloradas, e pesticidas organoclorados, em regiões costeiras. Nesse sentido, alterações nas conchas não só foram evidenciadas como também maiores nas regiões com alto índice de contaminantes. Foi verificado que os parâmetros biométricos das conchas (i.e., altura, largura e espessura) sofrem redução nas regiões de maior impacto ambiental. Os autores sugerem uma diminuição na velocidade de crescimento da concha, enquanto análises com biomarcadores também constataram danos no DNA e aumento da peroxidação lipídica nos tecidos de *L. subrugosa* nas mesmas regiões. Adicionalmente, a análise dos elementos das conchas indicou diferenças na composição, entre as regiões estudadas. Curiosamente, conchas de animais provenientes das regiões de maior impacto possuíam menor concentração de cálcio em suas composições (quando comparadas com as de menor impacto). Embora os autores sustentem que as diferenças de composição sejam possivelmente causadas pela interação e substituição por outros metais (como o Cd^{2+}), a redução de cálcio aparentemente está relacionada à redução dos parâmetros biométricos bem como a alterações nos mecanismos de formação da concha (BEGLIOMINI et al., 2017).

Vale ressaltar que, para moluscos, a incorporação de íons de cálcio é fundamental, via alimentação ou diretamente do ambiente; considerando o mecanismo da formação de conchas (i.e., biomineralização) (SIMKISS; MASON, 1983). No entanto, aparentemente, ainda não

existem pesquisas específicas que investigaram possíveis interações dos MPs nos mecanismos da biomineralização de gastrópodes. Na verdade, o primeiro registro da acumulação de microplásticos (via ingestão) em tecidos de moluscos, foi publicado em 2012 com evidências sobre a glândula digestiva do bivalve *Mytilus edulis* (e.g., VON MOOS; BURKHARDT-HOLM; KÖHLER, 2012). Pesquisas mais recentes também reportaram fatos até então inéditos, como a aderência de MPs em partes moles, como no manto e no pé de gastrópodes e bivalves, considerados uma nova via de acumulação (BRÅTE et al., 2018; GUTOW et al., 2019). Além disso, HAN e colaboradores (2022) observaram, pela primeira vez, a incorporação de MPs na concha da ostra marinha *Pinctada fucata*. As exposições a 0,2; 0,5; e 1,0 g/L de MPs de polietileno, com tamanho médio de 20 µm, causaram também um aumento na expressão de genes relacionados a biomineralização da ostra. Adicionalmente, a presença de microplásticos aderidos na borda do manto (intimamente relacionada ao processo de calcificação) foi confirmada por técnicas de microscopia e fluorescência. Os autores afirmam que a presença de MPs neste epitélio alterou a deposição das novas camadas da concha (sob a forma de cristais irregulares), possivelmente causados por interações e/ou afinidade química com o polietileno. Acredita-se que o aumento da expressão dos genes relacionadas à biomineralização ocorreu na tentativa de imobilizar rapidamente as partículas plásticas. Por fim, não só destacam a relevância dos achados, mas também sugerem que mais estudos sejam realizados, inclusive com diferentes concentrações; considerando que outros moluscos (além de bivalves) também podem partilhar da recém descoberta via de incorporação de MPs (HAN et al., 2022).

Nesse sentido, é justificável a busca de informações sobre os possíveis efeitos dos MPs no mecanismo da biomineralização; ademais, a utilização de gastrópodes como modelo biológico nesta temática se apresenta com potencial ineditismo. Assim, adotamos o caramujo dulcícola *Pomacea canaliculata* como organismo teste desta investigação. A espécie *P. canaliculata* (Lamarck, 1822) pode ser encontrada em diversos países do mundo como invasor comum de plantações de arroz (ESTEBENET et al., 2006). No entanto, no extremo sul do Brasil, tal organismo apresenta, ainda, importância ecológica. São caramujos nativos (i.e. neotropicais) e ocupam um nível trófico relevante, exercendo o controle sobre comunidades de microalgas e macrófitas aquáticas; servem também como recurso para o gavião-caramujeiro *Rostrhamus sociabilis* (Vieillot, 1817) (Aves: Accipitridae) (BERGMANN, 2012). Assim, torna-se importante a criação de protocolos para a utilização de organismos nativos e ambientalmente relevantes na avaliação de possíveis contaminantes dos ambientes dulcícolas em estudos ecotoxicológicos.

Vale ressaltar que tal espécie também atende os requisitos popularmente indicados nas pesquisas para a caracterização de organismos sentinelas (ou biomonitores); a saber: 1) alta distribuição e facilidade de coleta/cultivo 2) interagir significativamente com o ecossistema ao redor (i.e., nível trófico relevante) 3) possuir, na literatura, dados suficientes que permitam a discussão dos resultados e 4) as respostas devem ser razoáveis e mensuráveis (MELO et al., 2000; AKINDELE; EHLERS; KOOP, 2019; DING et al., 2021).

Como dito anteriormente; diversos trabalhos evidenciaram respostas via biomarcadores após acumulação de MPs. No entanto, os efeitos fisiológicos da contaminação por MPs são frequentemente indiretos e podem também ser resultado da combinação de outros efeitos (dentre eles, possivelmente estresse oxidativo). Para tanto, investigações fisiológicas com *P. canaliculata* após exposição aos MPs aparenta ser razoável. Especificamente, a investigação da fisiologia da biomineralização por meio de biomarcadores pode entregar novas informações sobre os efeitos em gastrópodes, como mencionado. Ademais, os processos envolvidos neste mecanismo estão detalhados abaixo.

1.3. Mecanismos da biomineralização

Moluscos de água doce enfrentam um desafio na construção de suas conchas, uma vez que são hiperosmóticos quando comparados ao ambiente. Em particular, eles lidam com gradientes osmóticos e iônicos entre a hemolinfa e a água. Tal condição facilita o ganho de água e perda de íons por difusão (SANTINI et al., 2011). Portanto, a construção da concha requer um “sistema de construção”, regulado pelo organismo. Recentemente, fisiologistas passaram descrever o processo como um mecanismo biologicamente controlado, e não apenas mediado, como considerado anteriormente (WEINER; DOVE, 2003; CLARK, 2020; CLARK et al., 2020).

O aparato envolvido na formação de conchas garante as condições necessárias de nucleação mineral, que, logicamente, só é possível devido à absorção e incorporação de precursores até o local de mineralização, especialmente íons cálcio e afins (do inglês “*calcium-related ions*”) (CHECA, 2018). Assim, observa-se que a formação de novas camadas da concha ocorre com certo nível de sincronicidade, considerando a captação dos precursores (da água e alimentos), sua distribuição ao corpo, principalmente através do sistema circulatório, e o processo final de secreção (i.e., deposição) (SIMKISS; MASON, 1983). Nesse sentido, a dinâmica existente nos transportes para a promoção do crescimento de conchas, como um processo ininterrupto, é bem descrita (WATABE, 1983). Dentre as necessidades fisiológicas, o

crescimento é um requisito distinto para os moluscos conchíferos, considerando que a concha deve acompanhar o tamanho do corpo mole. Nesse sentido, a maioria exibe fases de crescimento expressivo (observado como linhas de crescimento), mas que reduzem com o tempo (WILBUR; SALEUDDIN, 1983).

Interessante ressaltar que os moluscos possuem, nesse “sistema de construção”, uma “caixa de ferramentas conservada” (do inglês, “*conserved toolbox*”), considerada por muitos como um traço ontogenético, e que possivelmente permitiu o sucesso evolutivo do grupo (CLARK, 2020; CLARK et al., 2020). Acredita-se que a base da biomineralização está especificamente relacionada aos níveis de transcrição e expressão gênica; das proteínas da matriz da concha (SMPs, do inglês “*shell matrix proteins*”), domínios de anidrase carbônica, ligantes de quitina (CB, do inglês “*chitin-binders*”), receptores semelhantes à calcitonina, entre outros. Portanto, alterações nestes níveis de expressão gênica podem intensificar ou reduzir o mecanismo de formação da concha e suas relações com os precursores (CHECA, 2018; CLARK et al., 2020).

Além disso, autores afirmam que a biomineralização ocorre simultaneamente aos demais processos fisiológicos, e com um certo nível de consonância, impulsionada pela própria homeostase (CHECA, 2018; CLARK et al., 2020; MARIN, 2012; SONG et al., 2019). Tal característica também fica evidente ao considerar a expressão gênica entre as fases de vida, os fatores de crescimento e as atividades enzimáticas envolvidas. Gastrópodes juvenis, por exemplo, estão relacionados a altas expressões de SMPs, uma vez que o crescimento após a eclosão é mais intenso quando comparado aos organismos reprodutivos (isto é, adultos). Além disso, diversos estudos envolvendo gastrópodes e bivalves, observaram que o crescimento também é fortemente relacionado aos fatores abióticos, tais como concentração de cálcio e bicarbonato, disponibilidade de alimentos, lotação (do inglês, “*crowding*”), pH e temperatura (HUNTER, 1990; ICHINOSE, 2002; ESTEBENET; MARTÍN; BURELA, 2006; ROGEVICH; HOANG; RAND, 2008; GLASS; DARBY, 2009). Em geral, os autores apresentam que o crescimento não é interrompido sob condições reduzidas ou aumentadas, mas que estas realmente refletem na morfologia da concha; como maior fragilidade, menor espessura, e até mesmo apontam para reduções na taxa de crescimento.

Estas descobertas indicam a existência de estratégias fisiológicas que poderiam ajudar os organismos a alcançar a construção da concha, tais como fonte de precursores endógenos e/ou coleta de reservas (principalmente Ca^{2+} e HCO_3^-), o que, por sua vez, ajuda a entender que a biomineralização não é um processo “passo a passo”, mas sim um mecanismo “autônomo”

(do inglês, “*self-driven*”) que pode ser modulado (EBANKS; GROSELL, 2008; CHECA, 2018).

1.3.1. Requisitos da biomineralização

Evidências indicam que o processo de biomineralização é “universal”, considerando que também se aplica na formação de ossos, exoesqueletos e partes mineralizadas de diversos grupos (WATABE, 1983; WILBUR; SALEUDDIN, 1983; SONG et al., 2019). Para os moluscos a criação da concha somente é possível devido à combinação de aspectos evolutivos, principalmente morfológicos e fisiológicos (MARIN, 2012). Atualmente, sabe-se que é necessário atender alguns requisitos, químicos e biológicos, para que a mineralização ocorra, a saber: 1) um espaço que permite a interação dos precursores e formação mineral 2) uma impermeabilização que impede o contato com a água e consequente dissolução dos minerais 3) um fluido (i.e., meio) básico e supersaturado que garanta a deposição mineral por afinidade 4) uma matriz orgânica e extracelular que sustenta a estrutura das camadas da concha em formação e 5) um epitélio calcificador que atua na secreção dos materiais precursores e na manutenção do pH (MARIN, 2012).

A matéria prima das conchas é essencialmente o carbonato de cálcio (CaCO_3), que no geral se apresenta sob a forma mineral de calcita, aragonita e nacre, podendo variar dentre as espécies (MARIN, 2012). A formação de CaCO_3 é resultado de uma reação entre íons cálcio (Ca^{2+}) e bicarbonato (HCO_3^-), considerados como principais precursores da biomineralização. Para termos ilustrativos, utiliza-se, na mineralogia, o empilhamento de tijolos na construção de um muro, como analogia mais próxima para os processos envolvidos na mineralização, que ocorrem em duas partes: a deposição dos materiais e a sequente nucleação mineral (MARIN, 2012).

Morfologicamente, a concha dos moluscos apresenta uma camada externa orgânica, o perióstraco (Fig. 5), cuja função é impermeabilizar as camadas calcárias contra a dissolução pela água, além de permitir a deposição subjacente (MARIN, 2012). Abaixo do perióstraco encontram-se ainda mais duas camadas cristalinas, sendo o óstraco, em disposição prismática, a camada do meio e o hipóstraco, com disposição pavimentosa, a camada mais interna (MARIN, 2012).

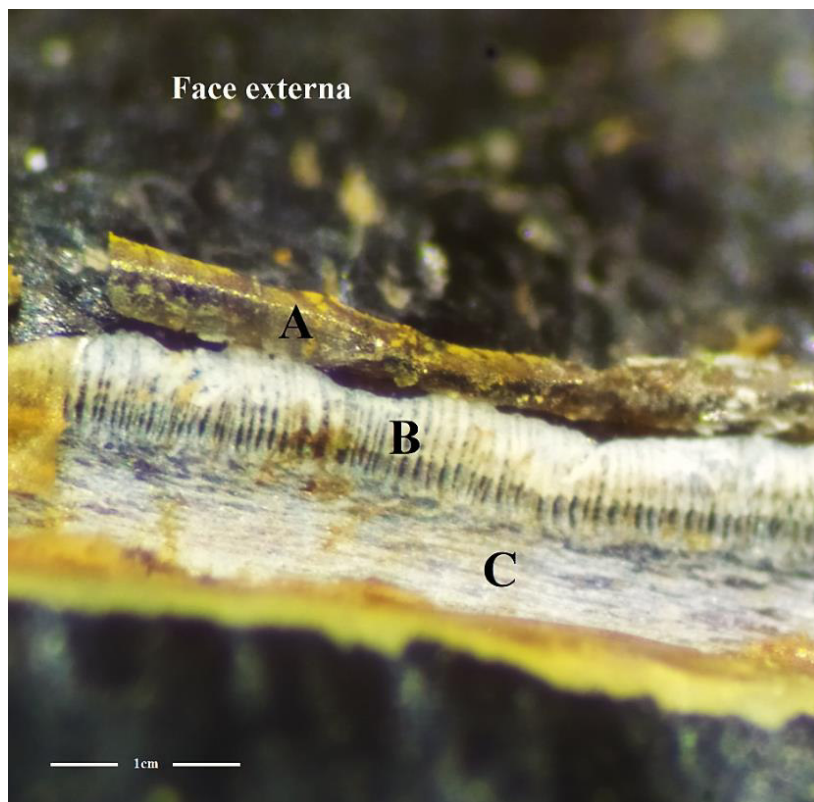


Fig. 5: A figura mostra uma raspagem na face externa da concha de *P. canaliculata*, onde é possível identificar as três diferentes camadas gerais da concha dos moluscos: A) perióstraco B) óstraco e C) hipóstraco. *Fonte:* acervo pessoal.

Na região anterior da concha, abaixo do perióstraco, encontra-se um pequeno compartimento, preenchido por uma matriz ‘gelatino-fibrosa’ (do inglês, “*silk-fibroin-like gel*”) e por um fluido supersaturado de carbonato de cálcio (CaCO_3); o espaço e fluido extrapalial, respectivamente (Fig. 6) (MARIN, 2012). Tais componentes agrupam uma mistura complexa de proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e polissacarídeos que interagem com os íons minerais, controlando a nucleação (i.e., deposição cristalina) (SIMKISS; MASON, 1983). Nesta região é possível encontrar, ainda, agregados calcários preenchidos por substância amorfa de carbonato de cálcio (Ca^{2+} e HCO_3^-), que ficam armazenados em vesículas sob a forma de grânulos (ABOLINŠ-KROGIS, 1976). É na matriz calcificante, que os íons cálcio reagem com o bicarbonato, formando carbonato de cálcio (CaCO_3), possibilitando a deposição e formação dos cristais da concha (WILBUR; SALEUDDIN, 1983). Logo abaixo, encontra-se a borda do manto (do inglês, “*mantle edge*”) que por sua vez é formada pelo epitélio externo do manto, ou manto calcificante, na parte superior (i.e., em contato com o espaço extrapalial) e pelo epitélio interno do manto na parte inferior (i.e., em contato com o ambiente) (Fig. 6) (SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018). A borda do manto é a responsável pela absorção (via ambiente e

hemolinfa) e secreção dos precursores que formarão a concha (em direção ao espaço extrapalial). Todo o processo tem origem na região do sulco periostracal, onde células epiteliais do manto externo secretam o perióstraco novo, enquanto a calcificação propriamente dita ocorre sequencialmente no espaço extrapalial. Ademais, acredita-se que tal região atua, ainda, na formação da matriz extracelular e demais componentes; para tanto alguns autores nomeiam esta região como “glândula do manto” (do inglês, “*mantle gland*”) considerando o papel secretor (SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018).

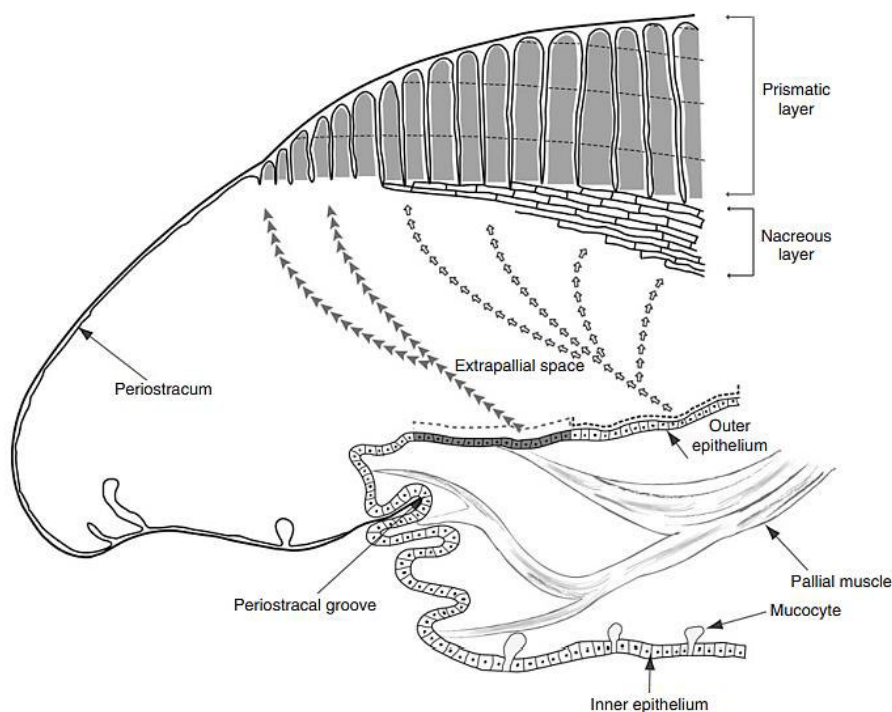


Fig. 6: A figura mostra os componentes morfofisiológicos envolvidos no processo de biomineralização de moluscos. Cada região está indicada por setas, bem como as nomenclaturas. Vale ressaltar que, na região do manto externo diferenças no epitélio garantem a formação específica de cada camada. *Fonte:* MARIN et al., 2007.

Estudos morfológicos demonstram que as camadas recém formadas ainda são finas e quebradiças; na extremidade deposicional a concha nova surge como uma linha visível, geralmente prateada e/ou brilhosa, destacando toda a região do perióstraco novo (SIMKISS; MASON, 1983).

1.3.2. Mobilização iônica e biomarcadores da biomineralização

Como mencionado, a biomineralização requer um processo efetivo de captação e distribuição de cálcio a partir do meio e da alimentação. Para os moluscos as vias de incorporação e mobilização de cálcio foram inicialmente descritas por Simkiss e Mason (1983) no chamado ciclo do cálcio (Fig. 7). A absorção direta de íons dissolvidos no ambiente, pelo manto externo, ou a partir da alimentação, pelo sistema digestivo (em especial intestinos e glândula digestiva) dá início às possíveis vias do cálcio no organismo. A circulação aberta dos moluscos permite que a hemolinfa transporte os íons por espaços entre os tecidos (i.e., hemocele) garantindo uma ampla distribuição pelo corpo. Parte do cálcio disponível flui pela hemolinfa até os tecidos do manto externo, onde ocorre a formação da concha; enquanto outra porção se agrupa formando vesículas de reserva (semelhante ao espaço extrapalial), armazenadas no tecido conjuntivo, adjacente ao manto externo. É importante destacar que, na época desta publicação, as células da hemolinfa eram identificadas como amebócitos e não possuíam função bem descrita e/ou conhecida (SIMKISS; MASON, 1983).

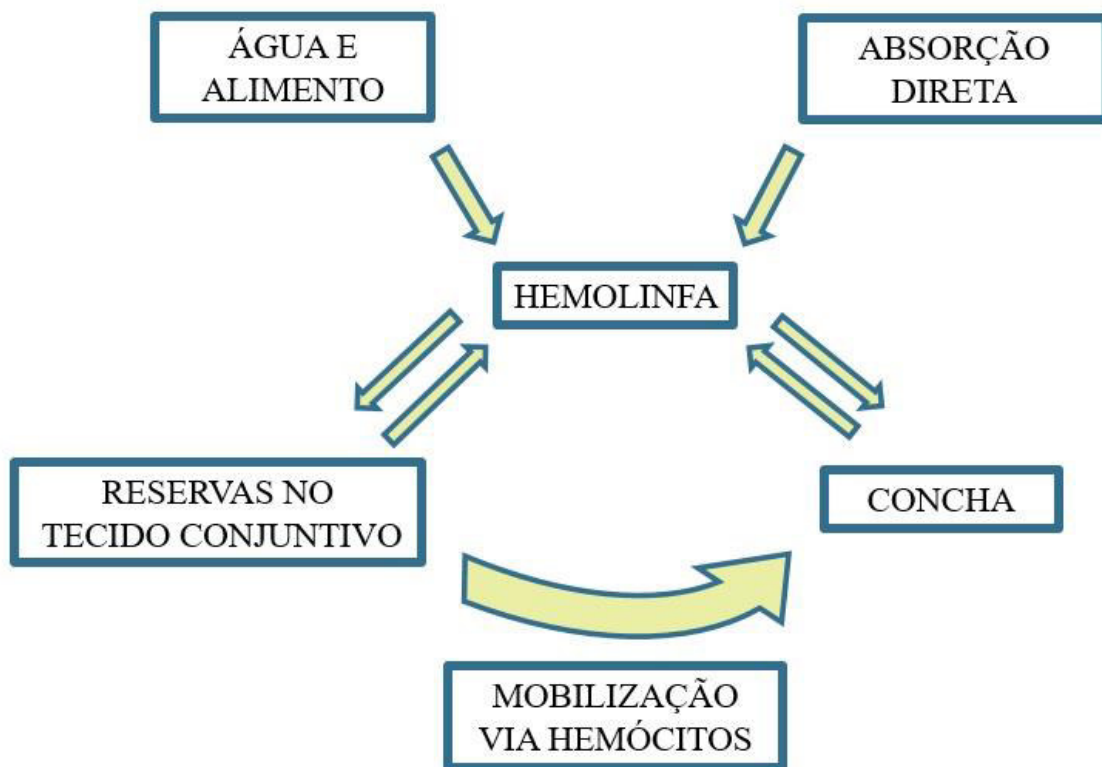


Fig. 7: A figura mostra as vias de absorção e incorporação de cálcio em moluscos, bem como a posterior mobilização para os tecidos e para a concha. *Fonte:* SIMKISS; MASON, 1983.

Atualmente a nomenclatura utilizada é “hemócito”; sabe-se também que os moluscos possuem no mínimo dois tipos e que estes atuam na biomineralização transportando os precursores do CaCO_3 via tecido conjuntivo e hemolinfa, até o epitélio externo do manto. Em casos específicos, como perda de tecido e danos na concha, os hemócitos podem realizar o transporte diretamente até o espaço extrapalial (MARIGÓMEZ et al., 2002; MOUNT et al., 2004; SONG et al., 2019).

A formação de conchas é, em grande parte, possível devido à atuação de transportadores e catalisadores e as principais enzimas envolvidas no processo são a Ca^{2+} ATPase e a anidrase carbônica (CHECA, 2018; SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018; ZEBRAL et al., 2019; CLARK et al., 2020). Em suma, um carreador transmembrana, que envia o cálcio para diferentes compartimentos, e uma metalo-enzima é responsável pela catálise do CO_2 , cujos subprodutos da reação inclui o HCO_3^- . Acredita-se, na literatura, que existam relações entre a absorção de Ca^{2+} e a produção endógena de HCO_3^- catalisada (EBANKS; GROSELL, 2008).

EBANKS e colaboradores (2010) apoiam tais relações acima. Ao investigar a tomada destes íons a partir do fluido perivitelínico, do caramujo dulcícola *Lymnaea stagnalis*, os autores descobriram que os embriões mantinham um platô de fluxo líquido¹ não apenas para o Ca^{2+} mas também para HCO_3^- . Além disso, testaram os mesmos embriões em condições com e sem HCO_3^- , na busca de possíveis relações entre a absorção iônica de Ca^{2+} e HCO_3^- . Curiosamente, os resultados mostraram que o fluxo líquido de Ca^{2+} foi significativamente maior sob condições livres de HCO_3^- , enquanto o fluxo alcalino titulável líquido (ou seja, HCO_3^-) diminuiu ~30%, quando comparado à condição de controle. Os resultados sugerem que a diminuição observada no fluxo líquido de HCO_3^- é um mecanismo de compensação decorrente da produção endógena, como resultado da hidratação do CO_2 (catalisada pela anidrase carbônica). Além disso, os dados da excreção de amônia, para a mesma condição (ou seja, livre de HCO_3^-) apontam que ~50% a mais de amônia foi excretada. Os resultados fazem sentido ao rever a equação da hidratação do CO_2 (e.g., $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$), onde a produção e consequente extrusão de prótons (necessária para a manutenção do pH) possivelmente aumenta o "aprisionamento de NH_3 como NH_4^+ " no sistema circulatório, como mencionado. Por fim, acredita-se que o aumento da extrusão de H^+ cria um gradiente eletroquímico para a influxo de Ca^{2+} via canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD) via manto interno de *L. stagnalis*, com a hiperpolarização das membranas apicais. Tal resposta

¹ Do inglês, “*net flux plateau*”, que diz respeito à quantidade de substâncias que entraram e saíram das células, de acordo com a seguinte equação: Fluxo líquido = influxo – efluxo.

poderia explicar o aumento observado na absorção de Ca^{2+} na região e, além disso, pode estabelecer uma relação entre as vias de cálcio e produção de bicarbonato (EBANKS; O'DONNELL; GROSELL, 2010).

A pesquisa de WETZEL e colaboradores (2002), apresentou que a inibição da anidrase carbônica, nos músculos de ratos Wistar, reduziu o trânsito intracelular de cálcio, posteriormente alterando a contração muscular. Os autores observaram que no retículo sarcoplásmico (RS) (e.g., relacionado ao armazenamento de Ca^{2+} , potenciais de ação e contrações) a inibição da anidrase carbônica causou uma diminuição na produção de HCO_3^- e H^+ , como esperado. Para melhor entendimento, o trocador de membrana Ca^+/H^+ ATPase realiza principalmente o influxo de Ca^{2+} (para o lúmen do RS) enquanto envia prótons de volta para o citosol. Assim, ao marcar as células dos feixes musculares, com o corante fluorescente Fura-2 (que se liga rapidamente ao Ca^{2+} livre), observaram que a inibição da anidrase carbônica causou um acúmulo de Ca^{2+} luminal. Nesse sentido, o menor influxo de prótons no lúmen (via H^+ ATPase) dificultaria a recaptção transitória de Ca^{2+} ao citosol. Finalmente, os autores afirmaram que, pelo aumento da intensidade do sinal Fura-2, o trânsito mais lento do Ca^{2+} retardou o relaxamento muscular. Embora o processo de hidratação de CO_2 também ocorra na ausência da anidrase, os autores afirmam que a presença do catalisador é fundamental, considerando as evidências da relação com o Ca^{2+} livre e a rapidez necessária para o processo (WETZEL et al., 2002). Como mencionado, tais evidências sugerem relações entre anidrase carbônica, a entrada e o trânsito de cálcio nas células. Especialmente, nos organismos calcificadores, a produção endógena de HCO_3^- aparenta estar sujeita a modificações de acordo com as necessidades do organismo, no que diz respeito a formação da concha (ZEBRAL et al., 2019).

É importante perceber que os transportes iônicos, relacionados à biomineralização acontecem por diferentes vias (Fig 8). Morfologicamente os epitélios do manto (i.e., interno e externo) são “espelhados”, considerando as dobras e o sulco periostracal (Fig. 6). Nesse sentido, o epitélio interno do manto possui face apical voltada para a cavidade do manto (em contato com a água do ambiente) (Fig 8). Tal região é coberta por um muco ligante, com função de aprisionar substâncias, e serve como defesa a corpos estranhos e parasitas, além de auxiliar na absorção. Além disso, na mesma região, canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD) garantem a entrada de Ca^{2+} . Já a face basolateral está voltada para o tecido conjuntivo; nesta região enzimas Ca^{2+} ATPase realizam a tomada do Ca^{2+} em direção a hemolinfa (Fig 8). Adicionalmente, a enzima anidrase carbônica, dentro das células do manto interno, catalisa a hidratação do CO_2 , proveniente da hemolinfa, produzindo HCO_3^- e prótons H^+ que são

extrudidos para o ambiente por transportadores apicais H^+ ATPase e trocadores $Ca^{2+}/2H^+$; tal processo facilita a manutenção do gradiente eletroquímico (CHECA, 2018; CLARK, 2020; MARIN, 2012).

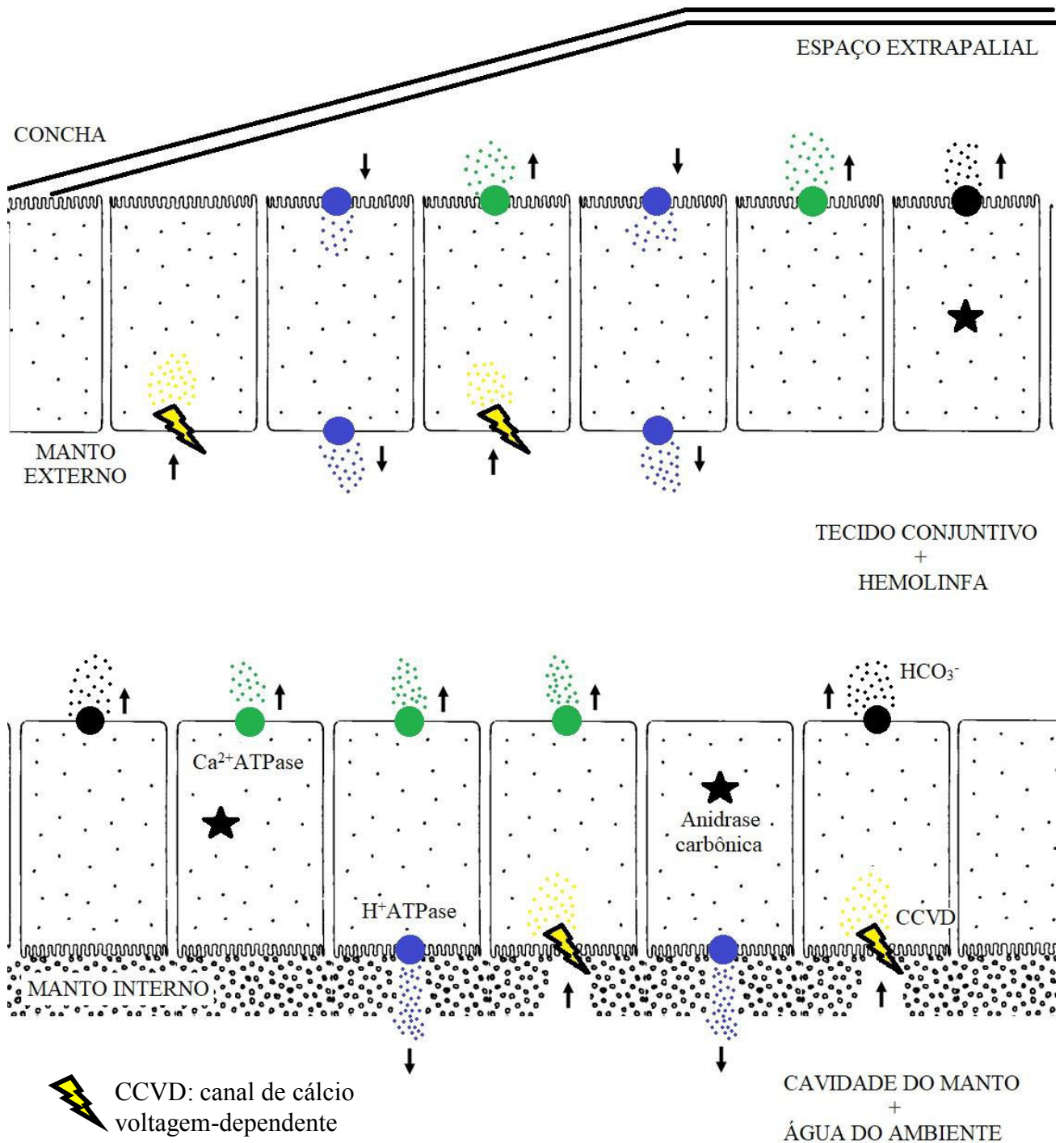


Fig. 8: Representação dos tecidos do manto e do espaço extrapalial. As estruturas e a direção dos transportes encontram-se identificadas no esquema.

Por outro lado, para o manto externo, considera-se que a face em contato com o tecido conjuntivo/hemolinfa também é basolateral, ao passo que a outra face, voltada para o espaço extrapalial, é apical (Fig. 8). Na região basolateral, embora a entrada de Ca^{2+} (nas células) também ocorra por CCVD, é evidenciado a presença de Ca^{2+} ATPases, com transporte voltado para a hemolinfa (relacionadas às sinalizações do metabolismo). Já na região apical, Ca^{2+} ATPases enviam Ca^{2+} ao espaço extrapalial, enquanto CCVD podem, quando necessário, retornar o Ca^{2+} da matriz para a célula. Nesta região, encontram-se também transportadores H^+ ATPase, que captam os prótons, provenientes da hidratação do CO_2 no espaço extrapalial (Fig. 8) (CHECA, 2018; CLARK, 2020; MARIN, 2012).

Sabe-se, com certeza, que o Ca^{2+} é o precursor mais abundante da biomineralização (Marin, 2012). Assim, devido a Ca^{2+} ATPase, presente nos epitélios da borda do manto, a captação e secreção são possíveis; para a hemolinfa e espaço extrapalial, respectivamente, como mencionado. Vale destacar que Ca^{2+} ATPases também estão presentes no epitélio da glândula digestiva, contribuindo com o fornecimento de Ca^{2+} direcionado à hemolinfa, como visto anteriormente no ciclo do cálcio. Ademais, a dinâmica desta bomba garante que a concentração intracelular de Ca^{2+} permaneça em níveis baixos em ambos os epitélios (EBANKS; O'DONNELL; GROSELL, 2010; MARIN, 2012; LOBO-DA-CUNHA et al., 2018). Portanto, tanto a glândula digestiva quanto a borda do manto atuam como epitélios absorptivos, em relação ao fluxo de Ca^{2+} no corpo, proveniente da água e dos alimentos (MARIGÓMEZ et al., 2002). Entretanto, mesmo que a glândula digestiva forneça íons para a hemolinfa (e.g., Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^-), contribuindo para a biomineralização, seu papel além da digestão envolve a desintoxicação, que garante a defesa e saúde dos organismos (LOBO-DA-CUNHA et al., 2018; LOBO-DA-CUNHA, 2019). Por outro lado, a borda do manto atua principalmente na formação da concha; entretanto sua participação na regulação iônica, especialmente de cálcio e bicarbonato, também seja descrita na literatura (SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018; CLARK et al., 2020).

Após revisar os transportes relacionados à produção de conchas de moluscos aquáticos, observações de CLARK, (2020), sustentam que os transportes iônicos nos epitélios do manto, especialmente do Ca^{2+} , favorecem a via da biomineralização (Fig. 9). Para o manto interno, EBANKS; O'DONNELL; GROSELL (2010) sugerem que o trocador $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ na membrana apical contribua duplamente na absorção de cálcio nos organismos e na extrusão de prótons H^+ para o ambiente, produzidos após hidratação do CO_2 , como mencionado (Fig. 8). No mesmo sentido, CLARK, (2020) afirma que a mobilização de cálcio nas células do manto externo também pode estar relacionada a outros transportadores, tais como Na^+/K^+ ATPases (NKA) e

os trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ basolaterais (Fig. 9). Adicionalmente, SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL (2018) verificaram que para a Ostra-do-pacífico *Crassostrea gigas*, a inibição da NKA diminuiu em 25% o transporte total de cálcio no manto externo. Esta informação pode indicar um auxílio basolateral na captação de Ca^{2+} , embora falte evidências para responder precisamente a questão. Os autores reforçam a existência apical da Ca^{2+} ATPase, mas sugerem que o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, na mesma região, também participa da secreção de cálcio para o espaço extrapalial, considerando os valores observados (SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018; CLARK et al., 2020) (Fig.9).

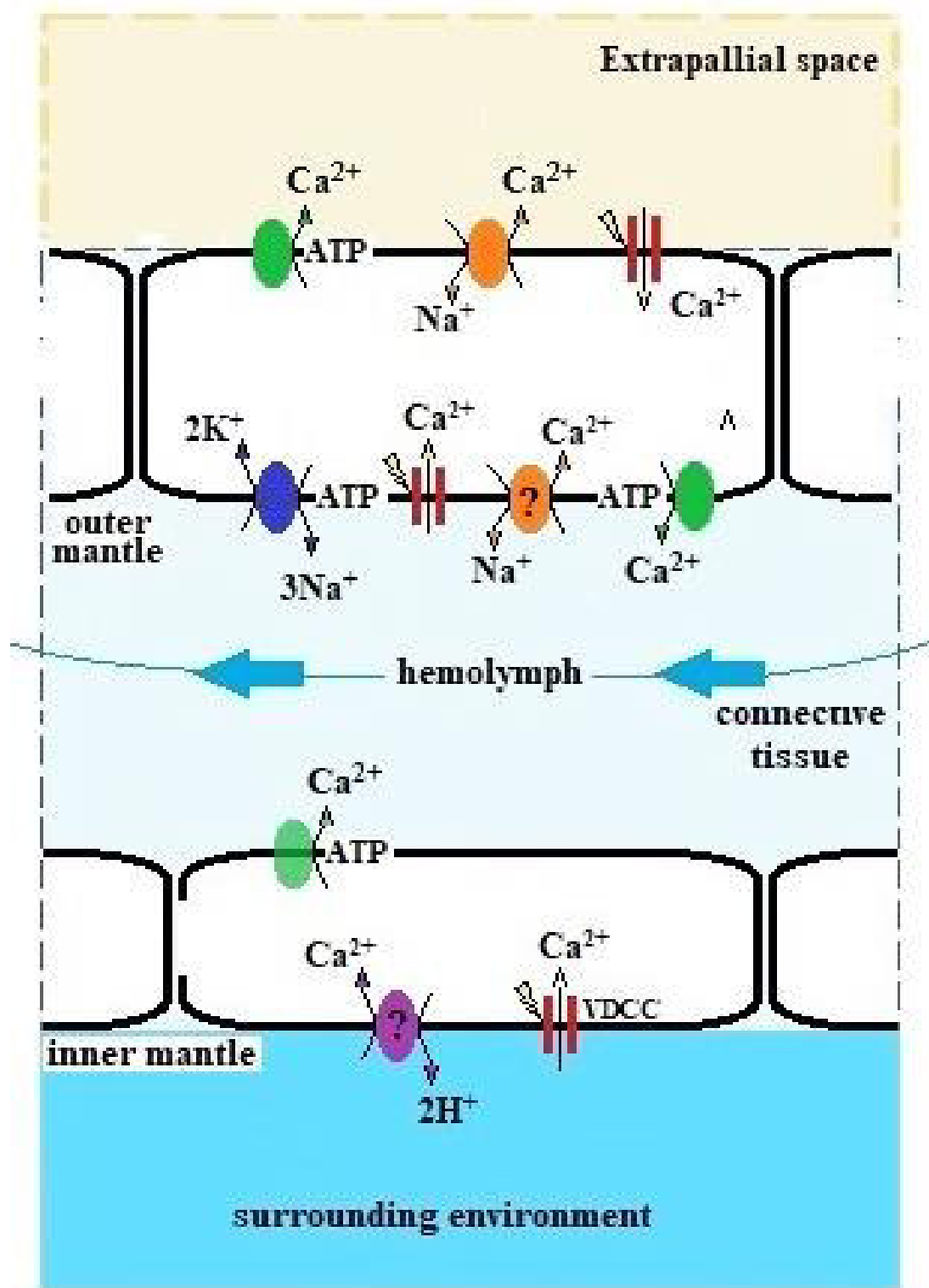


Fig. 9: Representação dos transportes relacionados à biomineralização nos epitélios do manto de moluscos. Os íons estão indicados na figura, VDCC: do inglês “*voltage-dependant calcium chanel*”. Fonte: criado com base nas informações publicadas por SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018; EBANKS; O'DONNELL; GROSELL, 2010; CHECA, 2018; CLARK, 2020.

Especificamente, o bombeamento de cálcio no manto externo compreende quase 50% do transporte total de cálcio envolvido na formação das conchas dos moluscos (CLARK et al., 2020). A inibição específica da Ca^{2+} ATPase (i.e., por caloxina), no manto externo de *C. gigas*, diminuiu em ~32% o transporte total de Ca^{2+} neste epitélio, enquanto um inibidor geral de ATPases (i.e., vanadato) diminuiu em ~14%. Estes resultados sustentam a ideia de que o bombeamento de Ca^{2+} está centrado em direção ao espaço extrapalial, como dito anteriormente, enquanto a retomada basolateral de Ca^{2+} (para hemolinfa) está mais relacionada à regulação e sinalização metabólica (Fig. 9) (SANTINI et al., 2011; CLARK, 2020; CLARK et al., 2020). Por fim, afirmam que a entrada de íons de cálcio pelo epitélio interno, via CCVDs apicais, compreende ~20% da absorção total de cálcio, não só em *C. gigas* mas também em outros bivalves e gastrópodes, reforçando que a absorção, via alimentação (i.e., glândula digestiva) também é fundamental (EBANKS; O'DONNELL; GROSELL, 2010; SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018).

Informações adicionais, a respeito da “fisiologia do cálcio”, podem auxiliar o entendimento da biomineralização como um processo “resiliente”, mas suscetível a modificações. Como mencionado, diversos autores consideram a biomineralização como uma consequência adaptativa dos moluscos, uma vez que nenhum mecanismo exclusivo está envolvido na formação de conchas. No entanto, acredita-se que o metabolismo seja adaptado para favorecer a formação da concha, de acordo com a homeostase dos organismos (SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018; CLARK et al., 2020).

Alguns mecanismos apresentam semelhanças com os de outros seres vivos, tais como os vertebrados. Em humanos, por exemplo, a produção do hormônio calcitonina (CALC) pode regular a disponibilidade e absorção de Ca^{2+} ; e ao mesmo tempo, promover sua deposição nos ossos, alterando o processo de mineralização (CARDOSO et al., 2020). Um estudo recente com bivalves (*Mytilus galloprovincialis* e *C. gigas*), investigaram estas semelhanças funcionais entre fatores reguladores de moluscos e humanos. Os resultados experimentais mostraram que os fatores de transcrição da borda do manto responderam às incubações com CALC humanas, aumentando a expressão genética dos receptores. Os autores observaram que tal aumento promoveu a captação de Ca^{2+} da hemolinfa para as células do manto. Assim, acredita-se que os moluscos também apresentam um sistema regulatório (para o Ca^{2+}), que possivelmente modula a biomineralização, de acordo com os “aportes sensoriais” (do inglês, “*sensorial inputs*”), como mencionado pelos autores (CARDOSO et al., 2020).

1.3.3. Mecanismos da regeneração da concha

A investigação da capacidade de regenerar conchas também é popularmente abordada na malacologia. Moluscos ‘conchíferos’ possuem, como defesa, a capacidade de reconstruir suas conchas frente a possíveis intempéries externas, tais como, lesões por impacto, ataque de predadores e parasitas (WATABE, 1983). As primeiras pesquisas evidenciaram a rápida e eficiente capacidade em regenerar partes da concha; no entanto os processos envolvidos eram bem incertos (MEENAKSHI et al., 1975; ABOLINŠ-KROGIS, 1976; WATABE, 1983). Ainda que o processo de biomineralização também se aplique para a regeneração de conchas, uma vez que utiliza os mesmos precursores, os mecanismos envolvidos são outros (MOUNT et al., 2004). No geral, evidências mais recentes indicam que o processo não depende exclusivamente do transporte mediado, entre epitélios e células, tampouco de enzimas catalizadoras (KÁDÁR, 2008; YANG et al., 2016; LIU et al., 2017). Na verdade, acredita-se que a disponibilização dos precursores ocorra por meio da dissolução de reservas, enquanto a mediação do transporte ocorre via hemócitos, até o local perdido/lesionado.

Sem dúvidas, a necessidade de regeneração da concha cria um cenário de estresse fisiológico nos animais. A maior parte das evidências apresentam, em comum, o aumento do número total de hemócitos (NTH), especialmente na hemolinfa, o que sustenta (em partes) a participação destes no processo (MOUNT et al., 2004; KÁDÁR, 2008; LIU et al., 2017). Na verdade, o aumento do NTH é interpretado como resposta imunológica não específica, considerando que também é reportado em situações de infecções parasitárias e inflamações (VON MOOS; BURKHARDT-HOLM; KÖHLER, 2012; LOBO-DA-CUNHA et al., 2018). Além disso, acredita-se que a regeneração ocorra após uma combinação de processos, como alterações no epitélio externo do manto, aumento da expressão gênica de proteínas da matriz extracelular, alterações nas atividades enzimáticas, aumento da absorção de cálcio (via manto interno e sistema digestivo) e dissolução de reservas (KÁDÁR, 2008; YANG et al., 2016; LIU et al., 2017).

Embora as evidências abordem diferentes tipos de organismos, como bivalves (em maioria) e gastrópodes, marinhos e dulcícolas, as informações parecem se cruzar. Nesse sentido, mesmo que alguns processos possivelmente ocorram de maneira simultânea, é plausível descrever os passos da regeneração. A pesquisa de KÁDÁR (2008) com o mexilhão marinho *Bathymodiolus azoricus*, afirma que num primeiro momento, pós lesão, se inicia a mobilização de hemócitos via hemolinfa até o tecido conjuntivo adjacente ao manto externo e a parte da concha perdida. Concomitantemente, os autores perceberam um aumento de 50% na NTH em comparação ao controle, além da

degradação dos tecidos, na região em que os hemócitos foram encontrados (KÁDÁR, 2008). Estudos mais antigos, envolvendo a regeneração dos mexilhões *Arcuatula senhousia* (estuarino) e *Anodonta sp.* (dulcícola) reportaram, de início, apenas mudanças na morfologia do epitélio externo do manto, como células alongadas e espaçadas, enquanto para os gastrópodes dulcícolas *Pomacea paludosa* e *L. stagnalis* foi observada a degeneração no epitélio externo do manto (ABOLINŠ-KROGIS, 1976; WATABE, 1983; WILBUR; SALEUDDIN, 1983). Em todos os casos, os autores acreditam que os hemócitos passem pelos espaços disponíveis no epitélio, em direção ao espaço extrapalial, como um tipo de vazamento (do inglês, “leakage”). Por outro lado, a pesquisa de MOUNT e colaboradores (2004) observou que, para a ostra-americana *Crassostrea virginica*, o aumento da NTH foi de apenas 10%. Os autores defendem que o baixo aumento do número, em comparação a outros estudos, está mais relacionado com a mobilização dos hemócitos já existentes, de outras partes do corpo, do que propriamente com a produção celular. No entanto, também observaram a acumulação de hemócitos na superfície apical do epitélio externo do manto, formando um tipo de barreira (MOUNT et al., 2004). Em relação ao cálcio, os estudos indicam uma diminuição nos níveis circulantes (i.e., hemolinfa) logo após a lesão (MOUNT et al., 2004; KÁDÁR, 2008; LIU et al., 2017). A maioria das pesquisas observaram que os hemócitos carregavam cálcio em seu interior, o que possivelmente justificaria a queda dos níveis hemolinfáticos. Em contrapartida, os níveis de cálcio circulantes, em geral, aumentaram alguns dias depois; nesse momento considera-se também que as reservas de cálcio, do tecido conjuntivo, são mobilizadas (MOUNT et al., 2004; KÁDÁR, 2008; LIU et al., 2017). No estudo envolvendo *C. virginica*, análises radioisotópicas sustentam que na regeneração o epitélio externo do manto é responsável por ~2,5% da rotatividade do cálcio (i.e., do inglês “turnover”); o restante (i.e., do inglês “nonexcheable pool”) é retido na face apical (MOUNT et al., 2004). Acredita-se que as reservas sejam uma das fontes desse cálcio, e que o transporte realmente ocorra via hemócitos, considerando que apresentaram grânulos birrefringentes em seu interior (indicativo de cálcio e/ou substância amorfa de CaCO_3) (MOUNT et al., 2004). Os resultados da microscopia do mexilhão *B. azoricus* também indicaram aumento semelhante na intensidade da coloração dos hemócitos (KÁDÁR, 2008). Curiosamente, os autores encontraram hemócitos fortemente corados na face basolateral do epitélio interno do manto, o que possivelmente está relacionado com o aumento da absorção de cálcio do ambiente (KÁDÁR, 2008).

A primeira camada a ser regenerada é o perióstraco e sua produção acontece rapidamente, com objetivo de reestabelecer a impermeabilização do espaço extrapalial

(WILBUR; SALEUDDIN, 1983). Para tanto, observa-se que o reparo é mais eficiente quando ocorre em regiões próximas a borda do manto, quando comparado aos reparos no meio da concha (YANG et al., 2016; LIU et al., 2017). Por fim, uma vez no espaço extrapalial, as pesquisas indicam duas possibilidades: 1) os hemócitos liberam os cristais e grânulos que permitem a nucleação das novas camadas (especialmente as inorgânicas) e retornam para a hemolinfa e 2) os hemócitos sofrem autólise diretamente na região de deposição, servindo como ‘substrato’ para a nucleação de novos cristais, sucessivamente (MOUNT et al., 2004; KÁDÁR, 2008). Embora eficiente, as camadas da concha regenerada não se assemelham as da concha “normal”; é possível observar a presença de cicatrizes permanentes nos locais lesionados (YANG et al., 2016; LIU et al., 2017).

Duas pesquisas mais recentes investigaram a capacidade de regeneração de *P. canaliculata*, associada a biomarcadores da biomineralização, como a concentração de cálcio circulante e a atividade da enzima anidrase carbônica (YANG et al., 2016; LIU et al., 2017). Ambas as pesquisas evidenciam que tal organismo apresenta uma velocidade de regeneração maior, quando comparado com outros gastrópodes e bivalves. Após a lesão foi observado um aumento na CTH, além de quedas significativas na concentração de cálcio circulante nos primeiros dias, com valores de pico no quinto dia, e posterior retorno da concentração para níveis normais (i.e., pré lesão). Para a enzima anidrase carbônica, os resultados indicaram queda na atividade logo no primeiro dia, no entanto houve a retomada, que alcançou um pico de atividade também no quinto dia, concomitante a finalização do perióstraco novo (YANG et al., 2016; LIU et al., 2017).

Os autores afirmam que os achados estão de acordo com os registros da literatura, e possivelmente indicam que a queda da concentração de cálcio ocorreu em conjunto com o aumento e mobilização dos hemócitos (YANG et al., 2016; LIU et al., 2017). Já os valores de pico de cálcio podem ser indício da dissolução das reservas, enquanto os da atividade enzimática, da formação do perióstraco novo, considerando que ‘coincidentemente’ até o quinto dia, os animais haviam completado a produção desta camada. Por outro lado, a formação das camadas subjacentes ocorreu de maneira mais lenta após o quinto dia, o que também está de acordo com os registros da regeneração de *L. stagnalis* e *P. paludosa* (WATABE, 1983; KÁDÁR, 2008; YANG et al., 2016; LIU et al., 2017). Por fim, ainda que existam dúvidas sobre a maneira em que os hemócitos participam da regeneração das conchas, alguns dos autores defendem que tal associação seja uma importante aquisição evolutiva, que contribuiu para o sucesso e dispersão dos moluscos conchíferos (KÁDÁR, 2008; MARIN, 2012; YANG et al., 2016; LIU et al., 2017).

1.3.4. A biomineralização de moluscos na investigação de contaminantes e poluentes

Nos últimos anos o mecanismo da biomineralização ganhou popularidade em pesquisas envolvendo mudanças climáticas, especialmente nas relacionadas ao aumento da temperatura e níveis de dióxido de carbono atmosférico e a consequente acidificação oceânica (SZALAJ et al., 2017; ZEBRAL et al., 2019; CHAVES LOPES et al., 2020). No entanto o foco se manteve, até o momento, para a calcificação de corais, que aparentemente sofrem alterações em tal cenário. Por outro lado, para os moluscos, a utilização de parâmetros biométricos e biomarcadores da biomineralização, também se mostrou promissor no acesso da toxicidade de contaminantes em estudos de exposição (Begliomini et al., 2017). Acredita-se que possíveis alterações na formação da concha podem indicar um comprometimento, não só da homeostase, mas também na saúde dos organismos (Begliomini et al., 2017).

O estudo de SANTINI (2011), envolvendo os efeitos da exposição de cobre (Cu) no bivalve de água doce *Anodonta anatina*, evidenciou alterações nas atividades da Ca^{2+} ATPase e anidrase carbônica. Os resultados indicaram quedas significativas nos epitélios da borda do manto, bem como na glândula digestiva. Particularmente, ambos Ca^{2+} and Cu^{2+} compartilham um raio iônico semelhante, portanto uma competição no transporte era esperado (considerando também que é classicamente descrita). Para tanto, os autores afirmaram que tal “disrupção da homeostase” pode interferir nas vias de tomada de Ca^{2+} e possivelmente comprometer o processo da biomineralização (SANTINI et al., 2011).

Ao expor o marisco branco, *Amarilladesma mactroides* à benzofenona-3 (BP3) (composto comum em protetor solar), a pesquisa de CHAVES-LOPES e colaboradores (2020) verificou um aumento na atividade da anidrase carbônica na glândula digestiva e nenhuma alteração no manto. Em relação a Ca^{2+} ATPase, nenhuma alteração ocorreu em ambos os epitélios. No mesmo sentido, ao realizar os experimentos em cenários de acidificação oceânica (i.e., pH 7,6), os autores observaram a repetição dos resultados anteriores. No entanto, é pertinente destacar que a notável diferença nos valores de controle da anidrase carbônica (menores no pH 7,6), podem sugerir que, para a glândula digestiva, tal enzima está mais relacionada ao equilíbrio ácido-base do que propriamente com a biomineralização (CHAVES LOPES et al., 2020).

Nesse sentido, é possível perceber que a utilização destes biomarcadores pode entregar boas respostas em estudos ecotoxicológicos. Especificamente, em relação aos microplásticos, algumas pesquisas evidenciaram efeitos na concentração de cálcio de organismos aquáticos

(WATTS et al., 2016; LEI et al., 2018; RODA et al., 2020). Para tanto, a investigação da concentração de cálcio pode ser interessante para acessar a biomineralização, considerando a importância deste íon como precursor do CaCO_3 . No entanto, pesquisas relacionando microplásticos e calcificação ainda estão surgindo.

Para o peixe dulcícola, *P. lineatus*, 24 h de exposição a MPs causou uma queda significativa nas concentrações de cálcio plasmático; os autores também observaram uma diminuição no transporte ativo de cálcio nas brânquias (RODA et al., 2020). A mesma redução de cálcio também foi observada no intestino do nematódeo terrestre *Caenorhabditis elegans* 48 h pós exposição a MPs (LEI et al., 2018). Curiosamente, ambos os trabalhos sugerem a ocorrência de estresse oxidativo, embora somente para *C. elegans* a análise de biomarcadores do estado oxidativo foi significativa. Aparentemente os resultados são em maioria indiretos, no entanto a presença de efeitos em concentrações iônicas pode sugerir a existência de um desbalanço no gradiente eletroquímico das células, possivelmente causado pela toxicidade dos microplásticos. Na verdade, acredita-se que efeitos como alterações de transportes e atividades enzimáticas podem ser consequências de processos mais complexos relacionados a detoxificação e defesa dos organismos, por exemplo (WATTS et al., 2016; LEI et al., 2018; RODA et al., 2020).

A pesquisa de TANG e colaboradores (2020) evidenciou alterações na expressão de um gene envolvido no trânsito intracelular de cálcio (e.g., calmodulina, CaM) após exposição a MPs. A pesquisa com o bivalve costeiro *Tegillarca granosa*, verificou que a menor expressão do gene CaM refletiu na diminuição da concentração de cálcio intracelular dos organismos. Especificamente, os autores acreditam que o gene CaM está relacionado à ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD) das membranas, e os resultados observados indicam um comprometimento da capacidade regulatória de cálcio, causada pelo menor influxo nas células (TANG et al., 2020). Vale ressaltar que íons cálcio também estão relacionados a outros processos, como o controle da proliferação e apoptose celular, respostas imunológicas, reconhecimento de patógenos e fagocitose e a própria biomineralização. Nesse sentido os autores defendem que os resultados da exposição podem, não só indicar a combinação de outros efeitos, como estresse oxidativo, mas também um possível comprometimento dos processos mencionados anteriormente (TANG et al., 2020).

Já a pesquisa de HAN e colaboradores (2022), apresentou pela primeira vez, evidências da exposição a MPs relacionadas ao mecanismo da biomineralização. Os resultados de exposição da ostra da pérola *Pinctada fucata*, evidenciaram uma nova via de acumulação de MPs. Em sete dias foi possível perceber MPs acumulados em diversos pontos da borda do

manto; as análises microscópicas sustentaram que o ocorrido se tratava de uma forte aderência ao tecido, e não apenas de acumulação superficial como é comumente reportado nas pesquisas. Nesse sentido, as técnicas de microscopia de luz e fluorescência evidenciaram o encapsulamento de MPs na face interna da concha de *P. fucata*, especialmente na região do perióstraco e da camada prismática. Adicionalmente, os autores também verificaram um aumento notável na expressão de genes relacionados à biomineralização (e.g., proteínas da matriz, domínios de anidrase carbônica, fatores de crescimento e proteínas ligantes de CaCO_3). Curiosamente, os valores encontrados estão de acordo com a expressão gênica de bivalves e gastrópode juvenis, e os autores defendem que a biomineralização pode ser promovida na presença de microplásticos. No entanto, ressaltam que provavelmente os resultados são uma soma de estratégias defensivas na tentativa de “superar” a contaminação por MPs, e não devem ser interpretados como uma melhoria do mecanismo, mas sim como resposta a um estresse (HAN et al., 2022).

Como explicado, os organismos que possuem concha calcária necessitam da incorporação efetiva dos íons cálcio para o seu desenvolvimento. Ao passo que novas evidências surgem, a investigação da toxicidade de MPs, associada aos mecanismos da formação de conchas se mostra interessante, especialmente em moluscos. De tal maneira, conforme as informações apresentadas, adotamos o caramujo de água doce *Pomacea canaliculata* como modelo biológico. Assim, o presente estudo se propõe a averiguar possíveis interferências da exposição a MPs de PE em alguns biomarcadores da biomineralização, como a atividade de enzimas envolvidas (Ca^{2+} ATPase e anidrase carbônica), concentração de cálcio da hemolinfa e a capacidade de regeneração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPET - HISTÓRIA da embalagem PET. Disponível em: <https://abipet.org.br/historia-da-embalagem-pet/>. Acesso em: 26 nov. 2021

ABOLINŠ-KROGIS, A. Ultrastructural study of the shell-repair membrane in the snail, *Helix pomatia* L. **Cell and Tissue Research**, v. 172, n. 4, p. 455–476, set. 1976.

ADAM, V.; YANG, T.; NOWACK, B. Toward an ecotoxicological risk assessment of microplastics: Comparison of available hazard and exposure data in freshwaters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 436–447, fev. 2019.

AKINDELE, E. O.; EHLERS, S. M.; KOOP, J. H. E. First empirical study of freshwater microplastics in West Africa using gastropods from Nigeria as bioindicators. **Limnologica**, v. 78, p. 125708, set. 2019.

ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 8, p. 1596–1605, ago. 2011.

BANK, M. S.; HANSSON, S. V. The Microplastic Cycle: An Introduction to a Complex Issue. Em: BANK, M. S. (Ed.). **Microplastic in the Environment: Pattern and Process**. Environmental Contamination Remediation and Management. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 1–16.

BARBOZA, L. G. A.; GIMENEZ, B. C. G. Microplastics in the marine environment: Current trends and future perspectives. **Marine Pollution Bulletin**, v. 97, n. 1–2, p. 5–12, ago. 2015.

BATEL, A. et al. Transfer of benzo[*a*]pyrene from microplastics to *Artemia* nauplii and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants: Trophic transfer of microplastics and associated POPs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 7, p. 1656–1666, jul. 2016.

Begliomini, F. N. et al. Shell alterations in limpets as putative biomarkers for multi-impacted coastal areas. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 494–503, jul. 2017.

BESSELING, E. et al. Quantifying ecological risks of aquatic micro- and nanoplastic. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 32–80, 2 jan. 2019.

BLETTLER, M. C. M. et al. Freshwater plastic pollution: Recognizing research biases and identifying knowledge gaps. **Water Research**, v. 143, p. 416–424, out. 2018.

BOUR, A. et al. Comprehending the complexity of microplastic organismal exposures and effects, to improve testing frameworks. **Journal of Hazardous Materials**, v. 415, p. 125652, ago. 2021.

BRADNEY, L. et al. Particulate plastics as a vector for toxic trace-element uptake by aquatic and terrestrial organisms and human health risk. **Environment International**, v. 131, p. 104937, out. 2019a.

BRADNEY, L. et al. Particulate plastics as a vector for toxic trace-element uptake by aquatic and terrestrial organisms and human health risk. **Environment International**, v. 131, p. 104937, out. 2019b.

BRANDTS, I. et al. Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. **Science of The Total Environment**, v. 643, p. 775–784, dez. 2018.

BRÂTE, I. L. N. et al. Weathering impacts the uptake of polyethylene microparticles from toothpaste in Mediterranean mussels (*M. galloprovincialis*). **Science of The Total Environment**, v. 626, p. 1310–1318, jun. 2018.

CAMPOS DA ROCHA, F. O. et al. Microplastic pollution in Southern Atlantic marine waters: Review of current trends, sources, and perspectives. **Science of The Total Environment**, v. 782, p. 146541, ago. 2021.

CARDOSO, J. C. R. et al. The calcitonin-like system is an ancient regulatory system of biomineralization. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7581, dez. 2020.

CHAVES LOPES, F. et al. Effect of the UV filter, Benzophenone-3, on biomarkers of the yellow clam (*Amarilladesma mactroides*) under different pH conditions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 158, p. 111401, set. 2020.

CHECA, A. G. Physical and Biological Determinants of the Fabrication of Molluscan Shell Microstructures. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, p. 353, 26 set. 2018.

CLARK, M. S. Molecular mechanisms of biomineralization in marine invertebrates. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 11, p. jeb206961, 1 jun. 2020.

CLARK, M. S. et al. Deciphering mollusc shell production: the roles of genetic mechanisms through to ecology, aquaculture and biomimetics. **Biological Reviews**, v. 95, n. 6, p. 1812–1837, dez. 2020.

CONNORS, K. A.; DYER, S. D.; BELANGER, S. E. Advancing the quality of environmental microplastic research: Advancing the quality of environmental microplastic research. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1697–1703, jul. 2017.

CRUTZEN, P. J. Geology of mankind. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 23–23, jan. 2002.

DE-LA-TORRE, G. E. Microplastics: an emerging threat to food security and human health. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 5, p. 1601–1608, maio 2020.

DING, J. et al. Microplastics in four bivalve species and basis for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution. **Science of The Total Environment**, v. 782, p. 146830, ago. 2021.

DIOSES-SALINAS, D.; PÉREZ-BACA, B.; DE-LA-TORRE, G. Ecotoxicological effects of microplastics and adsorbed contaminants on aquatic organisms. **Manglar**, v. 16, n. 2, p. 173–182, 31 dez. 2019.

DUIS, K.; COORS, A. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 2, dez. 2016.

EBANKS, S. C.; GROSELL, M. Fluid and osmolyte recovery in the common pond snail *Lymnaea stagnalis* following full-body withdrawal. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 3, p. 327–336, 1 fev. 2008.

EBANKS, S. C.; O'DONNELL, M. J.; GROSELL, M. Acquisition of Ca^{2+} and $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ for shell formation in embryos of the common pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 180, n. 7, p. 953–965, out. 2010a.

EBANKS, S. C.; O'DONNELL, M. J.; GROSELL, M. Characterization of mechanisms for Ca^{2+} and $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ acquisition for shell formation in embryos of the freshwater common pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 23, p. 4092–4098, 1 dez. 2010b.

ESSEL, R. et al. Sources of microplastics relevant to marine protection in Germany. p. 48, [s.d.].

ESTEBENET, A. L.; MARTÍN, P. R.; BURELA, S. Workshop: Biology of Ampullariidae. p. 8, [s.d.].

FOLEY, C. J. et al. A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. **Science of The Total Environment**, v. 631–632, p. 550–559, ago. 2018.

FRANK, Y. A. et al. Preliminary Screening for Microplastic Concentrations in the Surface Water of the Ob and Tom Rivers in Siberia, Russia. **Sustainability**, v. 13, n. 1, p. 80, 23 dez. 2020.

GARDON, T. et al. Microplastics Affect Energy Balance and Gametogenesis in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 9, p. 5277–5286, 1 maio 2018.

GEWERT, B.; PLASSMANN, M. M.; MACLEOD, M. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 17, n. 9, p. 1513–1521, 2015.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. e1700782, jul. 2017.

GLASS, N. H.; DARBY, P. C. The effect of calcium and pH on Florida apple snail, *Pomacea paludosa* (Gastropoda: Ampullariidae), shell growth and crush weight. **Aquatic Ecology**, v. 43, n. 4, p. 1085–1093, dez. 2009.

GODOY, M. S.; CASTRO-VAZQUEZ, A.; VEGA, I. A. Correction: Endosymbiotic and Host Proteases in the Digestive Tract of the Invasive Snail *Pomacea canaliculata*: Diversity, Origin and Characterization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 8 jul. 2013.

GOMES, T. et al. Ecotoxicological Impacts of Micro- and Nanoplastics in Terrestrial and Aquatic Environments. Em: BANK, M. S. (Ed.). **Microplastic in the Environment: Pattern and Process**. Environmental Contamination Remediation and Management. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 199–260.

GUTOW, L. et al. Gastropod pedal mucus retains microplastics and promotes the uptake of particles by marine periwinkles. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 688–696, mar. 2019.

HALPERN, B. S. et al. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 948–952, 15 fev. 2008.

HAN, Z. et al. Microplastics impact shell and pearl biomineralization of the pearl oyster *Pinctada fucata*. **Environmental Pollution**, v. 293, p. 118522, jan. 2022.

HORTON, A. A. et al. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of The Total Environment**, v. 586, p. 127–141, maio 2017.

HUANG, W. et al. Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: A review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health. **Journal of Hazardous Materials**, v. 405, p. 124187, mar. 2021.

HUNTER, R. D. Effects of low pH and low calcium concentration on the pulmonate snail *Planorbella trivolvis* : a laboratory study. **Canadian Journal of Zoology**, v. 68, n. 7, p. 1578–1583, 1 jul. 1990.

HWANG, J. et al. Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7391, dez. 2020.

ICHINOSE, K. INFLUENCE OF AGE AND BODY SIZE ON ALARM. **Journal of Chemical Ecology**, p. 12, 2002.

INOUE, K.; ONITSUKA, Y.; KOITO, T. Mussel biology: from the byssus to ecology and physiology, including microplastic ingestion and deep-sea adaptations. **Fisheries Science**, v. 87, n. 6, p. 761–771, nov. 2021.

JAMBECK, J. R. et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768–771, 13 fev. 2015.

KÁDÁR, E. Haemocyte response associated with induction of shell regeneration in the deep-sea vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 362, n. 2, p. 71–78, ago. 2008.

KLINGELHÖFER, D. et al. Research landscape of a global environmental challenge: Microplastics. **Water Research**, v. 170, p. 115358, mar. 2020.

KUKKOLA, A. et al. Nano and microplastic interactions with freshwater biota – Current knowledge, challenges and future solutions. **Environment International**, v. 152, p. 106504, jul. 2021.

KUTRALAM-MUNIASAMY, G. et al. Overview of microplastics pollution with heavy metals: Analytical methods, occurrence, transfer risks and call for standardization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 415, p. 125755, ago. 2021.

LEI, L. et al. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science of The Total Environment**, v. 619–620, p. 1–8, abr. 2018.

LESLIE, H. A. et al. Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. **Environment International**, v. 101, p. 133–142, abr. 2017.

- LIU, Q. et al. Regeneration of excised shell by the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 50, n. 1, p. 17–29, 2 jan. 2017.
- LOBO-DA-CUNHA, A. et al. Endocytosis, lysosomes, calcium storage and other features of digestive-gland cells in cephalaspidean gastropods (Euopisthobranchia). **Journal of Molluscan Studies**, 1 ago. 2018.
- LOBO-DA-CUNHA, A. Structure and function of the digestive system in molluscs. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 475–503, set. 2019.
- LU, H.-C. et al. A systematic review of freshwater microplastics in water and sediments: Recommendations for harmonisation to enhance future study comparisons. **Science of The Total Environment**, v. 781, p. 146693, ago. 2021.
- LUAN, L. et al. Differential toxicity of functionalized polystyrene microplastics to clams (*Meretrix meretrix*) at three key development stages of life history. **Marine Pollution Bulletin**, v. 139, p. 346–354, fev. 2019.
- MAGNI, S. et al. Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia). **Science of The Total Environment**, v. 631–632, p. 778–788, ago. 2018.
- MARIGÓMEZ, I. et al. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs: Distribution of Metals in Molluscs. **Microscopy Research and Technique**, v. 56, n. 5, p. 358–392, 1 mar. 2002.
- MARIN, F. et al. Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution. Em: **Current Topics in Developmental Biology**. [s.l.] Elsevier, 2007. v. 80p. 209–276.
- MARIN, F. The formation and mineralization of mollusk shell. **Frontiers in Bioscience**, v. S4, n. 3, p. 1099–1125, 2012.
- MARXEN, J. C. et al. EARLY MINERALIZATION IN BIOMPHALARIA GLABRATA: MICROSCOPIC AND STRUCTURAL RESULTS. **Journal of Molluscan Studies**, v. 69, n. 2, p. 113–121, maio 2003.
- MATHEUS, S. F. DE B. et al. Ingestion of plastic debris affects feeding intensity in the rocky shore crab *Pachygrapsus transversus* Gibbs 1850 (Brachyura: Grapsidae). **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 12, n. 2, p. 113–117, 30 abr. 2020.
- MEENAKSHI, V. R. et al. Studies on shell regeneration—I. Matrix and mineral composition of the normal and regenerated shell of *Pomacea paludosa*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 50, n. 2, p. 347–351, fev. 1975.
- MELO, L. E. L. et al. Developing the gastropod *Pomacea lineata* (Spix, 1827) as a toxicity test organism. p. 6, [s.d.].
- MOERMOND, C. T. A. et al. CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 1297–1309, maio 2016.
- MOUNT, A. S. et al. Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in the Eastern Oyster. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 297–300, 9 abr. 2004.

MURPHY, F. et al. Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 11, p. 5800–5808, 7 jun. 2016.

NAJI, A.; NURI, M.; VETHAAK, A. D. Microplastics contamination in molluscs from the northern part of the Persian Gulf. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 113–120, abr. 2018.

PRINZ, N.; KOREZ, Š. Understanding How Microplastics Affect Marine Biota on the Cellular Level Is Important for Assessing Ecosystem Function: A Review. Em: JUNGBLUT, S.; LIEBICH, V.; BODE-DALBY, M. (Eds.). . **YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 101–120.

RADWAN, M. A.; EL-GENDY, K. S.; GAD, A. F. Biomarker responses in terrestrial gastropods exposed to pollutants: A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 257, p. 127218, out. 2020.

REICHERT, J. et al. Reef-building corals act as long-term sink for microplastic. **Global Change Biology**, v. 28, n. 1, p. 33–45, jan. 2022.

RODA, J. F. B. et al. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 242, p. 110659, abr. 2020.

ROGEVICH, E. C.; HOANG, T. C.; RAND, G. M. The Effects of Water Quality and Age on the Acute Toxicity of Copper to the Florida Apple Snail, *Pomacea paludosa*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 690–696, maio 2008.

ROZMAN, U. et al. An extensive characterization of various environmentally relevant microplastics – Material properties, leaching and ecotoxicity testing. **Science of The Total Environment**, v. 773, p. 145576, jun. 2021.

SANTANA, M. F. M. et al. Continuous Exposure to Microplastics Does Not Cause Physiological Effects in the Cultivated Mussel *Perna perna*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, n. 4, p. 594–604, maio 2018.

SANTINI, O. et al. Effects of low-level copper exposure on Ca^{2+} -ATPase and carbonic anhydrase in the freshwater bivalve *Anodonta anatina*. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 93, n. 9, p. 1826–1837, out. 2011.

SILLANPÄÄ, J. K.; SUNDH, H.; SUNDELL, K. S. Calcium transfer across the outer mantle epithelium in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1891, p. 20181676, 21 nov. 2018.

SIMKISS, K.; MASON, A. Z. Metal Ions: Metabolic and Toxic Effects11The work was supported by a NERC grant No. GR3/3063. Em: **The Mollusca**. [s.l.] Elsevier, 1983. p. 101–164.

SONG, X. et al. Recent Advances of Shell Matrix Proteins and Cellular Orchestration in Marine Molluscan Shell Biomineralization. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, p. 41, 19 fev. 2019.

SUSSARELLU, R. et al. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 9, p. 2430–2435, mar. 2016.

SZALAJ, D. et al. The effects of ocean acidification and a carbon dioxide capture and storage leak on the early life stages of the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) and metal bioavailability. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 765–781, jan. 2017.

TALLEC, K. et al. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 1226–1235, nov. 2018.

TANG, Y. et al. Immunotoxicity of microplastics and two persistent organic pollutants alone or in combination to a bivalve species. **Environmental Pollution**, v. 258, p. 113845, mar. 2020.

THEVENON, F.; CARROLL, C.; SOUSA, J. (EDS.). **Plastic debris in the ocean: the characterization of marine plastics and their environmental impacts, situation analysis report**. [s.l.] International Union for Conservation of Nature, 2015.

THOMPSON, R. C. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? **Science**, v. 304, n. 5672, p. 838–838, 7 maio 2004.

U.S.EPA 2017.microplastics_expert_workshop_report_final_12-4-17 (1).pdf. , [s.d.].

VAN CAUWENBERGHE, L. et al. Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. **Marine Environmental Research**, v. 111, p. 5–17, out. 2015.

VAN WEERT, S. et al. Effects of nanoplastics and microplastics on the growth of sediment-rooted macrophytes. **Science of The Total Environment**, v. 654, p. 1040–1047, mar. 2019.

VON MOOS, N.; BURKHARDT-HOLM, P.; KÖHLER, A. Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 20, p. 11327–11335, 16 out. 2012.

WAITE, H. R.; DONNELLY, M. J.; WALTERS, L. J. Quantity and types of microplastics in the organic tissues of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and Atlantic mud crab *Panopeus herbstii* from a Florida estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 129, n. 1, p. 179–185, abr. 2018.

WARD, J. E. et al. Selective Ingestion and Egestion of Plastic Particles by the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) and Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Implications for Using Bivalves as Bioindicators of Microplastic Pollution. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 15, p. 8776–8784, 6 ago. 2019.

WATABE, N. Shell Repair. Em: **The Mollusca**. [s.l.] Elsevier, 1983. p. 289–316.

WATTS, A. J. R. et al. Effect of Microplastic on the Gills of the Shore Crab *Carcinus maenas*. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 10, p. 5364–5369, 17 maio 2016.

WEINER, S.; DOVE, P. M. 1 An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. p. 29, [s.d.].

WETZEL, P. et al. Inhibition of muscle carbonic anhydrase slows the Ca^{2+} transient in rat skeletal muscle fibers. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 283, n. 4, p. C1242–C1253, 1 out. 2002.

WILBUR, K. M.; SALEUDDIN, A. S. M. Shell Formation. Em: **The Mollusca**. [s.l.] Elsevier, 1983. p. 235–287.

WOODS, M. N. et al. Microplastic fiber uptake, ingestion, and egestion rates in the blue mussel (*Mytilus edulis*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 137, p. 638–645, dez. 2018.

WRIGHT, J. P.; JONES, C. G. The Concept of Organisms as Ecosystem Engineers Ten Years On: Progress, Limitations, and Challenges. **BioScience**, v. 56, n. 3, p. 203, 2006.

WU, M. et al. How do humans recognize and face challenges of microplastic pollution in marine environments? A bibliometric analysis. **Environmental Pollution**, v. 280, p. 116959, jul. 2021.

WU, Y. et al. Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae. **Journal of Hazardous Materials**, v. 374, p. 219–227, jul. 2019.

XU, Q. et al. An effective method for evaluation of microplastic contaminant in gastropod from Taihu Lake, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 18, p. 22878–22887, jun. 2020.

YANG, S. et al. Repair process and enzymatic activity associated with induction of shell regeneration in the invasive species *Pomacea canaliculata*. **Molluscan Research**, v. 36, n. 3, p. 207–212, 2 jul. 2016.

ZEBRAL, Y. D. et al. Carbonic Anhydrase as a Biomarker of Global and Local Impacts: Insights from Calcifying Animals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 3092, 25 jun. 2019.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição de microplásticos (MPs) de polietileno na biomineralização da concha do gastrópode *Pomacea canaliculata*.

2.2. Objetivos específicos

Verificar se a exposição de MPs altera a concentração de íons cálcio circulantes na hemolinfa de *P. canaliculata*;

Verificar se a exposição de microplástico MPs altera a atividade dos biomarcadores envolvidos no processo de biomineralização: Ca^{2+} ATPase e anidrase carbônica;

Verificar se a exposição de MPs altera a capacidade de *P. canaliculata* em regenerar lesões na concha.

3. HIPÓTESE

Visto que a exposição do peixe dulcícola *Prochilodus lineatus* a microplásticos (MPs) de PE provocou reduções na atividade da enzima Ca^{2+} ATPase e nas concentrações plasmáticas de Ca^{2+} e resultados semelhantes também foram observados na concentração de cálcio intestinal do nematódeo *Caenorhabditis elegans*; hipotetizamos que os MPs também podem alterar os mesmos biomarcadores fisiológicos em *P. canaliculata*, um molusco calcificador dulcícola, e, portanto, prejudicar processo de biomineralização.

CAPÍTULO 1

Manuscrito a ser submetido para a revista “*Comparative Biochemistry & Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*”

[<https://www.sciencedirect.com/journal/comparative-biochemistry-and-physiology-part-c-toxicology-and-pharmacology>]

BIOMINERALIZATION BIOMARKERS: A TRENDING STRATEGIE TO ACCESS MICROPLASTICS TOXICITY?

Luiz Gustavo Alves Lopes^a, Fernanda Chaves Lopes^b, Karine Gularte Quintana^c, Patrícia Gomes Costa^d, Camila de Martinez Gaspar Martins^{a,b}, Marta Marques Souza^{a,b}

^a Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Av. Itália km 8, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil

^b Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Av. Itália km 8, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil

^c Universidade Federal do Rio Grande, Graduação em Oceanologia, Instituto de Oceanologia, Av. Itália km 8, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil

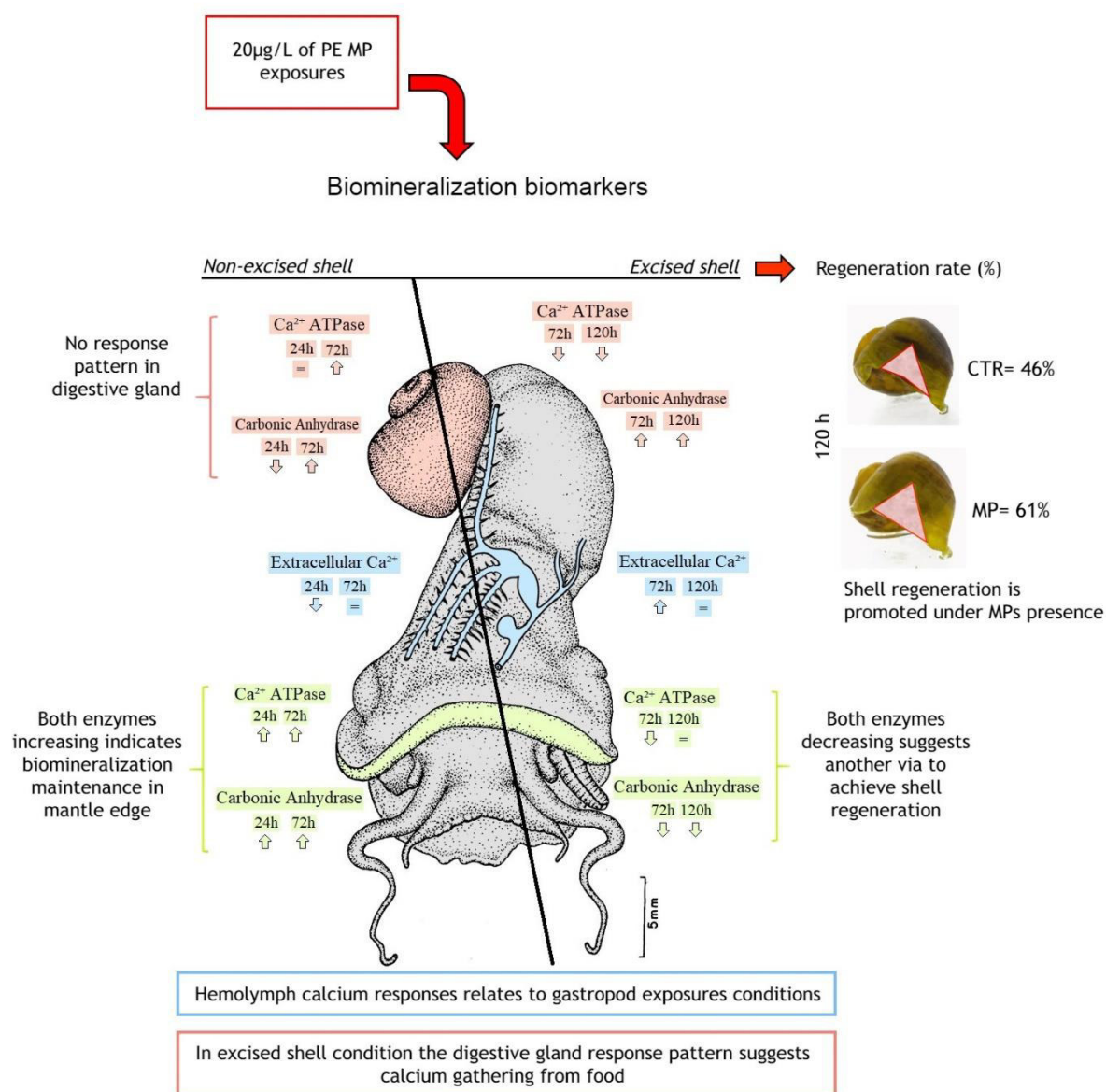
^d Fundação Espírito-santense de Tecnologia – FEST. Av. Fernando Ferrari, 845 - Goiabeiras, Vitória - ES, Brazil

ABSTRACT

The concern regarding plastic microparticles, between 1µm and 5mm (MPs), has gained force with the increase of researches reporting toxic effects on biota, especially aquatic. In recent years, published papers have highlighted changes in ion transport and concentration, especially calcium in organisms exposed to MPs. For calcifying organisms, such as mollusks, maintaining calcium homeostasis is critical for the construction of shells and mineralized parts. In this sense, this study aimed to investigate the effects of polyethylene (PE) MPs on biomarkers of biomineralization in the freshwater gastropod *Pomacea canaliculata*. To this end, animals were exposed to 20 µg/L (MP) and dechlorinated water (CTR) in two experimental sets: (1) animals in physiological condition for 24 h and 72 h and (2) animals in regeneration condition for 72 h and 120 h. The results of the first set showed that in 24 h the hemolymph calcium concentration decreased and CaATPase activity was unchanged in the digestive gland, but increased at the mantle edge. For the enzyme carbonic anhydrase, the activity decreased in the gland and increased in the mantle at this same time. By 72 h, the calcium concentration of the hemolymph did not change, while both enzyme activities increased in both epithelia. In the second set, the hemolymph calcium concentration increased in 72 h, while calcium pumping decreased in both epithelia. For AC the results were opposite, increase in the gland and decrease in the mantle. At 120 h, there was no difference in hemolymph calcium concentration, while calcium pumping followed reduced in both epithelia. CA continued to increase in the gland while in the mantle no further differences were observed. Finally, we can state that (20 µg/L) PE MPs were able to alter *P. canaliculata* hemolymph calcium concentration, as well promote the enzymatic activity involved in the biomineralization process, specially in the mantle of non-excised gastropods.

Key-words: Calcification, Calcium, Ca²⁺ATPase, Mollusk, Polyethylene, Shell

GRAPHICAL ABSTRACT



1. Introduction

Microplastics (MPs) are considered contaminants of emerging concern for aquatic ecosystems both marine and freshwater (Gomes et al., 2022). They are ubiquitous plastic particles ranging between 1 μm and 5 mm, and usually classified in two categories related to their origin: the primary one comes from intentional or unintentional industrial release (wastewater), while the secondary ones arises from plastic debris degradation, physical, chemical, and photodegradation (by UV action) (Bour et al., 2021). Currently, most of research about MPs is concentrated in the oceans ecosystems, but it is proposed that ocean MPs come regularly from the freshwater system; however, little is known about MPs contamination in freshwater (Lu et al., 2021).

Since 2004, there is an increasing in the number of publications reporting that MPs are potentially harmful to the aquatic biota (Thompson, 2004; Connors et al., 2017). MPs seem to be a long-term hazard, due to its emerging dispersal and negative effects, which have been mostly studied in the aquatic biota, from plankton to vertebrates (Bour et al., 2021; Rozman et al., 2021; Bank and Hansson, 2022). Ingestion has been described as the main via of MPs uptake and accumulation by the organisms (Dioses-Salinas et al., 2019; De-la-Torre, 2020). It is also reported the presence of MPs in the digestive tract cells, mostly of fish and mollusks, not only aggregating into the lumen surface (von Moos et al., 2012; Lei et al., 2018). However, in filter feeding animals as the bivalves, gills also seem to be an organ with high ability for MPs accumulation, which may further cause toxic effects (Besseling et al., 2019).

In this sense, there are works already showing oxidative stress, and biochemical alterations as consequence of MPs exposure (Gomes et al., 2022). In fact, the effects of MPs exposure for mollusks (as in several other phyla), vary between subcellular, organismic and population levels, although investigations at the ecosystem level are also emerging (Gomes et al., 2022). In majority, the most observed effects are changes in biomarkers related to oxidative stress, genetic and immune toxicity (Tang et al., 2020; Campos da Rocha et al., 2021; Huang et al., 2021; Han et al., 2022). And also in feeding, reproductive, and developmental capacity (Sussarellu et al., 2016; Bradney et al., 2019; Luan et al., 2019; Matheus et al., 2020; Inoue et al., 2021). In addition, some researchers also show histological changes in organs such as gills, kidney, digestive gland and mantle epithelia (von Moos et al., 2012; Waite et al., 2018; Han et al., 2022). In this sense, mollusks are very promising for investigations with MPs (Naji et al., 2018; Dioses-Salinas et al., 2019; De-la-Torre, 2020).

Recently, findings regarding MPs showed their ability to alter ionic concentrations of aquatic and terrestrial organisms (Watts et al., 2016; Lei et al., 2018; Roda et al., 2020). The study conducted by Watts et al., (2016) with the offshore crab *Carcinus maenas*, observed that 10^7 microspheres/L of 8 μm polystyrene (PS) MPs exposure caused a decrease in gills sodium (Na^+) homeostasis. Later on, Lei et al., (2018) also reported an intestinal Ca^{2+} decrease in the nematode *C. elegans* after 5.0 mg/m^2 of 1 μm polyethylene (PE) exposure, while Roda et al. (2020) recently reported decreases in plasma Ca^{2+} concentration and gills Ca^{2+} ATPase for the freshwater fish *Prochilodus lineatus* exposed to 20 $\mu\text{g/L}$ of 10-90 μm PE MP. It is worthy to highlight that those works sustained that MPs exposure might further result in ionic imbalance, especially the one with freshwater fish (Roda et al., 2020). Furthermore, Tang et al., (2020) reported that 1 mg/L of 30 μm PE MPs exposures caused a decrease in genes involved in intracellular Ca^{2+} regulation and biomineralization of the coastal clam *Tegillarca granosa*. Thus, it is reasonable to consider that for calcifying mollusks a lack in Ca^{2+} regulation/availability, caused by MPs exposure, could possibly interfere in their shell formation.

The biomineralization is the biological process in which mollusks achieve the construction of their shells, mostly by Ca^{2+} and HCO_3^- mobilization (Marin, 2012). This requires a finely regulated system controlled by mechanisms of ionic homeostasis (Clark et al., 2020). Shell formation apparatus guarantees the essential conditions of mineral nucleation into the mineralization site, adjacent to the mantle edge (i.e. extrapallial space) (Checa, 2018). Ion transport (uptake and distribution) and shell synthesis (ion secretion and deposition) involve mechanisms that work with synchronicity, in order to allow an uninterrupted animal growth process (Clark, 2020). The biomineralization starts with the resources gathering in the mantle edge epithelia, which in turn have two faces (Marin, 2012). The inner mantle acts in environmental Ca^{2+} absorption, via apical channels, while basolateral Ca^{2+} ATPases mediate the uptake to hemolymph (Sillanpää et al., 2018). On the other hand, the Ca^{2+} entrance in outer mantle occurs via basolateral Ca^{2+} channels and apical Ca^{2+} ATPases mediate the secretion into extrapallial space (Sillanpää et al., 2018). The dynamics of this pump guarantees that intracellular Ca^{2+} concentration stays at low levels in both epithelia (Checa, 2018).

In this sense, Ebanks et al. (2010) observed on gastropod *Lymnaea stagnalis* embryos that Ca^{2+} and HCO_3^- uptake gradually triggered the shell-forming mechanisms. These authors found that embryos' mantle keeps a net flux plateau for Ca^{2+} and HCO_3^- . Curiously, under HCO_3^- free conditions, *L. stagnalis* had a significantly greater Ca^{2+} net flux, while the HCO_3^- flux decreased. The results point that HCO_3^- decrease is a compensation mechanism from

endogenous production, resulted from the CO₂ hydration, catalyzed by carbonic anhydrase (CA) (Ebanks et al., 2010a). In addition, the ammonia excretion results, for the same condition (i.e., HCO₃⁻ free) point that ~50% more ammonia was excreted (Ebanks et al., 2010a). Those findings should make sense considering the mantle AC role in biomineralization, by reviewing the CO₂ hydration (e.g., CO₂ + H₂O → HCO₃⁻ + H⁺ → CO₃²⁻ + H⁺), where the protons extrusion (needed to maintain extrapallial space alkalinity for calcification) should enhance the “trapping of NH₃ as NH₄⁺” in the circulatory system (Ebanks et al., 2010a; Zebral et al., 2019). Finally, the increased H⁺ excretion is possibly creating an electrochemical gradient for Ca²⁺ diffusion (via channels) through the inner mantle of *L. stagnalis*, by enhancing the hyperpolarization of their apical membranes. This could explain the observed increase in Ca²⁺ uptake, and furthermore, may stand a relation between calcium and bicarbonate, pathways and production, respectively (Ebanks et al., 2010a).

In addition, it is known that the synthesis of a new shell layer involves the “mantle edge – circulatory system – digestive gland” axis, first detailed in the calcium cycle for mollusks by Simkiss and Mason (1983). Thus, due to Ca²⁺ATPase and AC, present in the mantle edge epithelia, the uptake and secretion of precursors are possible (Sillanpää et al., 2018). Furthermore, it is worthy to highlight that both enzymes, in the digestive gland epithelium, also contributes with the precursors supply directed to hemolymph, due to digestion absorption (Marin et al. 2007; Ebanks et al. 2010; Lobo-da-Cunha et al. 2018). Therefore, both digestive gland and mantle edge act as absorptive epithelia, from water and food, concerning calcium uptake onto the body (Marigómez et al., 2002; Marin et al., 2007). Additionally, mantle edge role in ion regulation, especially calcium and bicarbonate, is also reported in the literature (Ebanks and Grosell, 2008; Zebral et al., 2019).

Therefore, it is hypothesized that a disruption in the process of Ca²⁺ uptake and regulation as well as in the formation of carbonated species, caused by MPs or other pollutant, would affect formation of mineralized parts of calcifying organisms. Particularly, there are only a few of works regarding biomineralization and MPs, especially for freshwater organisms.

Considering the information exposed above, this work investigated the effects of PE MPs on *Pomacea canaliculata* biomineralization biomarkers. *P. canaliculata* is a gastropod native from South America, but has been invaded countries like United States, China and Indonesia (Ichinose, 2002). For this study, we carry out analysis of Ca²⁺ATPase and CA activity and extracellular Ca²⁺ concentration, since they are intrinsically involved in the biomineralization of mollusks.

2. Materials and Methods

2.1. Gastropods cultivation and maintenance

A pinkish eggs mass from the snails *Pomacea canaliculata* were collected in the Polegar lake (32° 04' 43" S and 52° 10' 03" W), which is located at the Federal University of Rio Grande (FURG), Southern Brazil. The eggs were stored in an incubator at 24.5°C (ELETROlab®, Brazil), with a photoperiod of 12h light: 12h dark, until they lose their color. Within approximately 45 days, the eggs were completely white, and ~ 340 hatchlings were born. After hatching the baby snails were divided into eight glass aquariums (30 x 20 x 15 cm) filled with 8 L of dechlorinated tap water. After one month, the snails were moved to plastic boxes (45 x 30 x 30 cm) filled with 35 L of dechlorinated tap water at 22°C and photoperiod. A biologic filter was added in the boxes as well as mussel's shells to increment the water hardness. In both conditions the snails were fed ad libitum with fresh lettuce every two days, combined with a total water renewal when they presented to be no longer interested in the food. Water quality parameters were measured with Alcon® fishkeeping kits every two days until the snails reached the size desired for the experiments: pH= 7.5 ± 0.03 ; Free chlorine = Ø; Total hardness (CaCO₃) 125 ± 10.4 ; NH₃ = 0.0008 ± 0.0004 . After approximately 75 days, the shell length of seven snails were randomly measured and they presented a medium value of 24.7 ± 0.14 mm which is considered adequate for the microplastic (MP) exposure assays (Yang et al., 2016; Liu et al., 2017). Thus, they used for the experiments.

2.2. Experimental Design

It was performed two experimental sets both with the objective to access the gastropods' physiological condition and their respective biomineralization biomarkers responses facing microplastics (MPs) exposure. The second set was performed with *Pomacea canaliculata* with a shell excision, to check the ability of gastropods to regenerate their shells in the presence and absence of MPs. For excision, animals were stimulated to retract the operculum, and once they stopped, a triangle-shaped excision was made in the shell using a small ABC® Iris scissors with the apex adjacent to the center of the retracted operculum. After shell excision, the animals were immediately placed on the experimental beakers.

For both experiments, the animals were placed in 600 mL beakers filled with 500 mL of same dechlorinated tap water used for cultivation (n= 4 animals per beaker) at 22°C, and photoperiod of 12h light:12h dark. In the two sets, the gastropods were exposed to MPs (n= 28)

or kept under control (n= 28) condition. For the first set of experiment, half of the animals were sampled at 24 h and the rest were sampled at 72 h.

For the second set, performed with excised shell animals, half were sampled at 72 h and half at 120 h. Food was disposed for excised shell animals at 0 h and 72 h to ensure the calcification occurrence (Watabe, 1983; Marigómez et al., 2002). In the second set, seven animals of each condition were photographed every 24 h, using a MI[®] cellphone camera (REDMI Note7/14-megapixel [f/2.2, 1.25-micron] (see Figure 5). At each sampling time, animals had their hemolymph collected by constantly pressing the operculum (Bucci et al., 2013; Montanari et al., 2020), then, they were euthanized on ice, followed by dissection of mantle and digestive. The tissues were gently dried with Kleenex[®] paper, and stored into 2 mL microtubes at -80°C (ColdLab[®]) for the analysis of activities of Ca²⁺ATPase and CA enzymes. The hemolymph was also stored at -80°C for further analysis of extracellular Ca²⁺ concentration.

The MP used in this study was the white-polyethylene microspheres (50-99% polyethylene and 1-49% titanium dioxide, 10-90µm diameter, 1.377 g cm⁻³ density) purchased from Cospheric LLC[®] (USA) at the concentration of 20 µg/L. According to findings of Lei et al., 2018; and Roda et al., 2020, this concentration of MP is considered as nonlethal concentrations for mollusks and also appears to be environmentally relevant.

2.3. Biomarkers

To access activity of CA and Ca²⁺ATPase, tissues (pools of 2 animals) were homogenized by Ultra-turrax t10 basic disperser IKA[®], and then vortexed with a buffer containing 75 mM sucrose, 10 mM tris-base, 1 mM phenyl methanesulfonyl fluoride (PMSF), and 1 mM dithiothreitol (DTT), pH in a ratio of 1:4 w/v for both gland and mantle edge. The homogenates were centrifuged at 20,000xg, 4°C for 20 min. The activity of each of the enzymes, CA and Ca²⁺ATPase, were analyzed separately in the supernatant (Lopes et al., 2018). The analyses were standardized by total protein content in the supernatant determined by the biuret method (commercial kit VIDA Biotecnologia[®], Brazil). The CA analysis was performed using the method described by Henry (1991). First, the supernatant of each tissue was mixed to the reaction buffer (10mM Tris-base, 75mM sucrose, 225mM mannitol, and 10mM sodium phosphate; pH was also adjusted to 8.5) and added to a saturated CO₂ ultrapure water at ~ 2°C. The enzyme activity was defined by the pH reduction in the mixture (sample + buffer + CO₂), which was monitored until 30sec, recording the values downgrade every 5 sec, using a pHmeter (PHS3BW Engecal[®], Brazil). Because of CO₂ hydration, catalyzed by CA, H⁺ ions are released. Therefore, it is expected that ampler drops of pH represent greater activity of CA.

For the Ca^{2+} ATPase activity, the analysis followed the method described by Vajreswari et al. (1983) with adaptations. The homogenate was added to the reaction buffer (5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 20 mM tris-HCl, and 189 mM NaCl; with 1 mM ouabain and 3 mM ATP) into microtubes and incubated at 30°C for 30 min to allow the enzymatic reaction to occur. Later, microtubes were placed on ice to stop the reaction. The amount of inorganic phosphate released into the reaction mixture was determined using a phosphate colorimetric assay kit (*MAK030*, *Sigma-Aldrich*[®]). Absorbance was measured at 630 nm on a microplate reader (*Elx880 BioTek instruments*[®], USA).

To perform the extracellular calcium quantification, nitric acid 65% Suprapur[®] (Merck, Darmstadt, Germany) was used for dilution (500x) within ultrapure water. Equivalent acidification to 1% of the sample and resistivity of 18 MΩ cm (Millipore, Bedford, Maryland, USA). Calibration samples were prepared with standard monoelemental solutions of 10 μg mL⁻¹ of Ca (CertiPUR[®] - MERCK, Darmstadt, Germany). Calcium concentrations of gastropods' hemolymph samples (1:500) were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (Plasma Quant ICP-MS spectrometer, Analytik Jena, Germany), with kinetic energy discrimination, using an 89Y as internal standard at a concentration of 1 μg L⁻¹. The method was validated, exhibiting good precision (relative standard deviations < 5%), linearity, and mean analytical recovery values (91 to 103%, CRM DORM-4). The ICP-MS instrumental LODs and LOQs were 0.020 μg/L and 0.065 μg/L, respectively.

2.3.1. Shell recovery image analysis

To evaluate the shell recovery, pictures of the excised-shell snails (n = 7 per treatment; control and 20 μg/L MPs) were taken as follows: 0, 24, 48, 72, 96, and 120h. Later, the images were resized equally and treated by adjusting color, sharpness, brightness, and temperature. Finally, the regenerated areas were measured with *ImageJ* software, and the regeneration percentages ($R_{\%}$) calculated following the formula:

$$R_{\%} = \frac{A_{(t)} \times 100}{A_o}$$

where $A_{(t)}$ represent the regenerated area values in pixels number for each time, while A_o is the initial excised area.

2.4. Statistical analyses

Results are expressed as the mean $\pm$ standard error. Significant differences were determined using the parametric T-test of Welch ($p < 0.05$), according to the data distribution (normality and homoscedasticity). The statistics were performed at R[®] software (R Core Team).

3. Results

3.1. Biomineralization biomarkers – non-excised shell animals

Concerning the effects of 20 $\mu\text{g/L}$ of microplastics (MPs) on gastropods without shell excision, we see that Ca^{2+} concentration significantly decreased in hemolymph of animals sampled at 24 h of test, but not at 72 h. However, it is important to note that there was a trend of increasing in hemolymph Ca^{2+} levels at 72 h with a p value of 0.07 (Figure 1), thus, the result of 24 h contrasts with the one of 72 h.

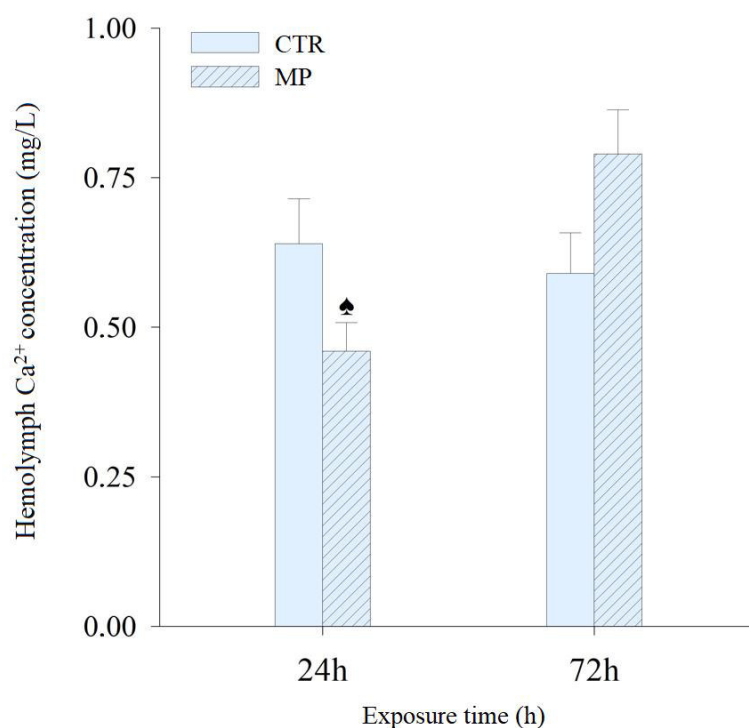


Figure 1. Hemolymph Ca^{2+} concentration (mean $\pm$ SE) of *P. canaliculata* exposed only to water (CTR) and to 20 $\mu\text{g/L}$ (MP) for 24 and 72 h. Spades indicate significant differences between the treatments, for each experimental time ($p < 0.05$).

The Ca²⁺ATPase activity in the digestive gland was not affected by MPs exposure at 24 h, but after 72 h it increased in MPs exposed animals. In the mantle edge, Ca²⁺ATPase activity increased after MPs exposure at both 24 and 72 h (Figure 2A). Regarding the carbonic anhydrase (CA), in the digestive gland MPs caused an activity decrease after 24 h of test; this being the unique case in which MPs inhibited this enzyme. Oppositely, after 72 h, CA activity increased in this same tissue. For the mantle edge, an increase following MPs exposure occurred at both 24 and 72 h (Figure 2B), as observed for Ca²⁺ATPase; however, the augment was about 2-fold, being higher than the one saw for Ca²⁺ATPase activity in all cases. Mantle showed higher activity of both enzymes.

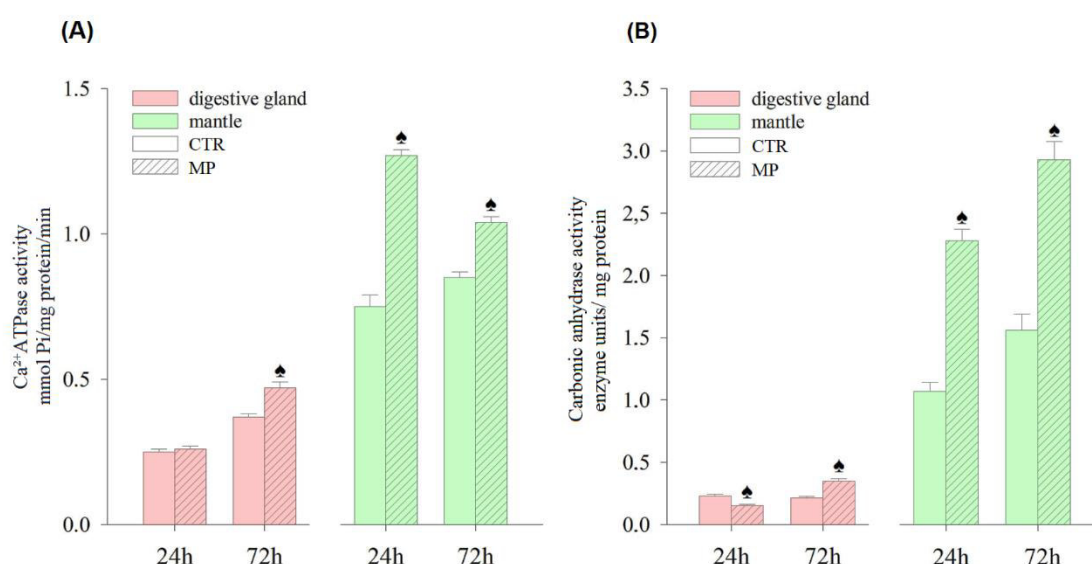


Figure 2. Ca²⁺ATPase (A) and Carbonic anhydrase (B) activities (mean ± SE) in the tissues of *P. canaliculata*, at physiological condition, exposed only to water (CTR) and to 20μg/L (MP) for 24 and 72 h. Spades indicate significant differences between the treatments, for each tissue in each experimental time (p<0.05).

3.2. Biomineralization biomarkers – excised shell animals

Regarding the second experimental set performed with gastropods' shell excised, it can be seen that hemolymph Ca²⁺ concentration increased after 72h of test, and within 120 h the concentration did not change between treatments (Figure 3).

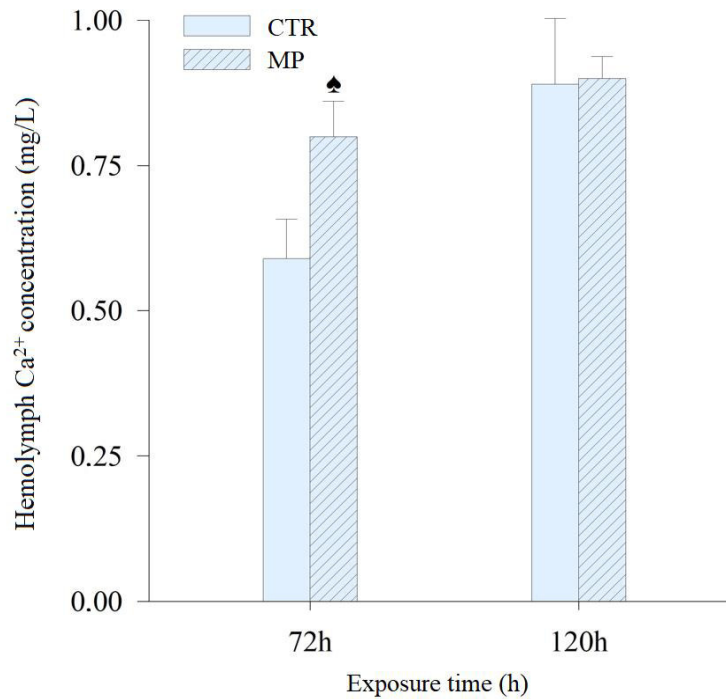


Figure 3. Hemolymph extracellular Ca^{2+} concentration (mean $\pm$ SE; $n = 7$) of *P. canaliculata* exposed only to water (CTR) and to $20\mu\text{g/L}$ (MP) for 72 and 120 h after shell excision. Spades indicate significant differences between the treatments, for each experimental time ($p < 0.05$).

Figure 4A shows that in the digestive gland, Ca^{2+} ATPase activity decreased at both 72 h and 120 h of MPs exposure, and in the mantle edge, the decrease was observed only at 72 h, while after 120 h no significant differences was observed between control and MPs exposed gastropods. The CA activity was quite different from the first experimental set. For the digestive gland, CA activity increasing was observed at both 72 and 120 h following MPs exposure. However, CA activity decreased in the mantle edge at both experimental times in animals exposed to MPs (Figure 4B). Again, mantle showed higher activities of Ca^{2+} ATPase and CA compared to digestive gland.

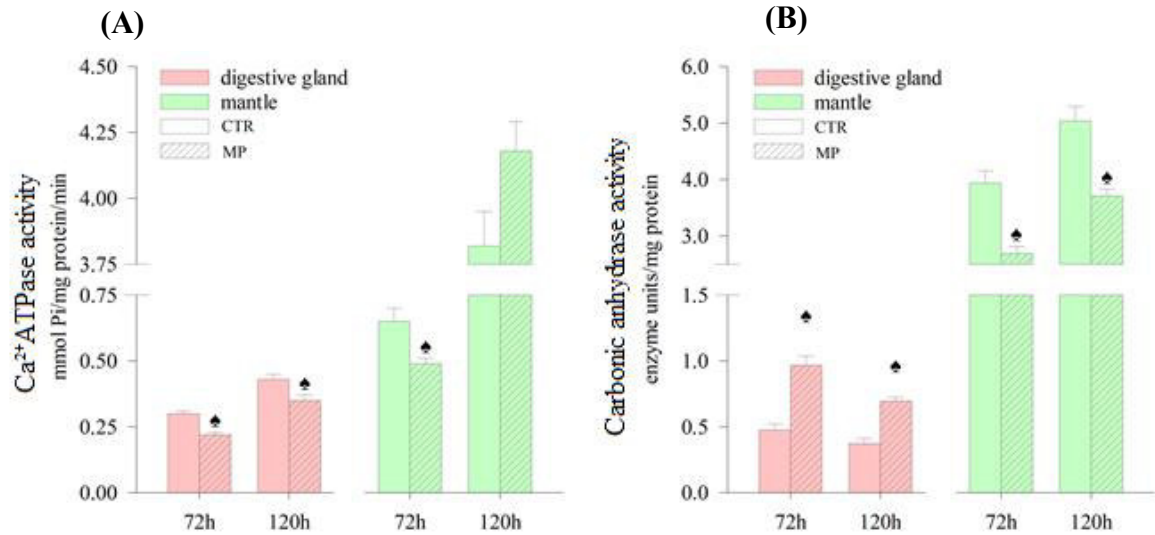


Figure 4. Ca²⁺ATPase (A) and Carbonic anhydrase (B) activity (mean ± SE; n = 7) in the tissues of *P. canaliculata*, at shell recovery condition, exposed only to water (CTR) and to 20µg/L (MP) for 72 and 120h after shell excision. Spades indicate significant differences between the treatments, for each tissue in each experimental time (p<0.05).

3.3. Shell recovery image analysis

The 20 µg/L of MPs exposure induced a hastened regeneration in the shell-excised gastropods during 72 h (Figures 5A and 5B). After 24 h, the MPs exposed animals recovered 8% more than the CTR, for 48 and 72 h the recovery was 16% and 25% higher than the CTR, respectively. From 96 h and beyond, MPs exposure did not cause significant differences in gastropods shell recovery.

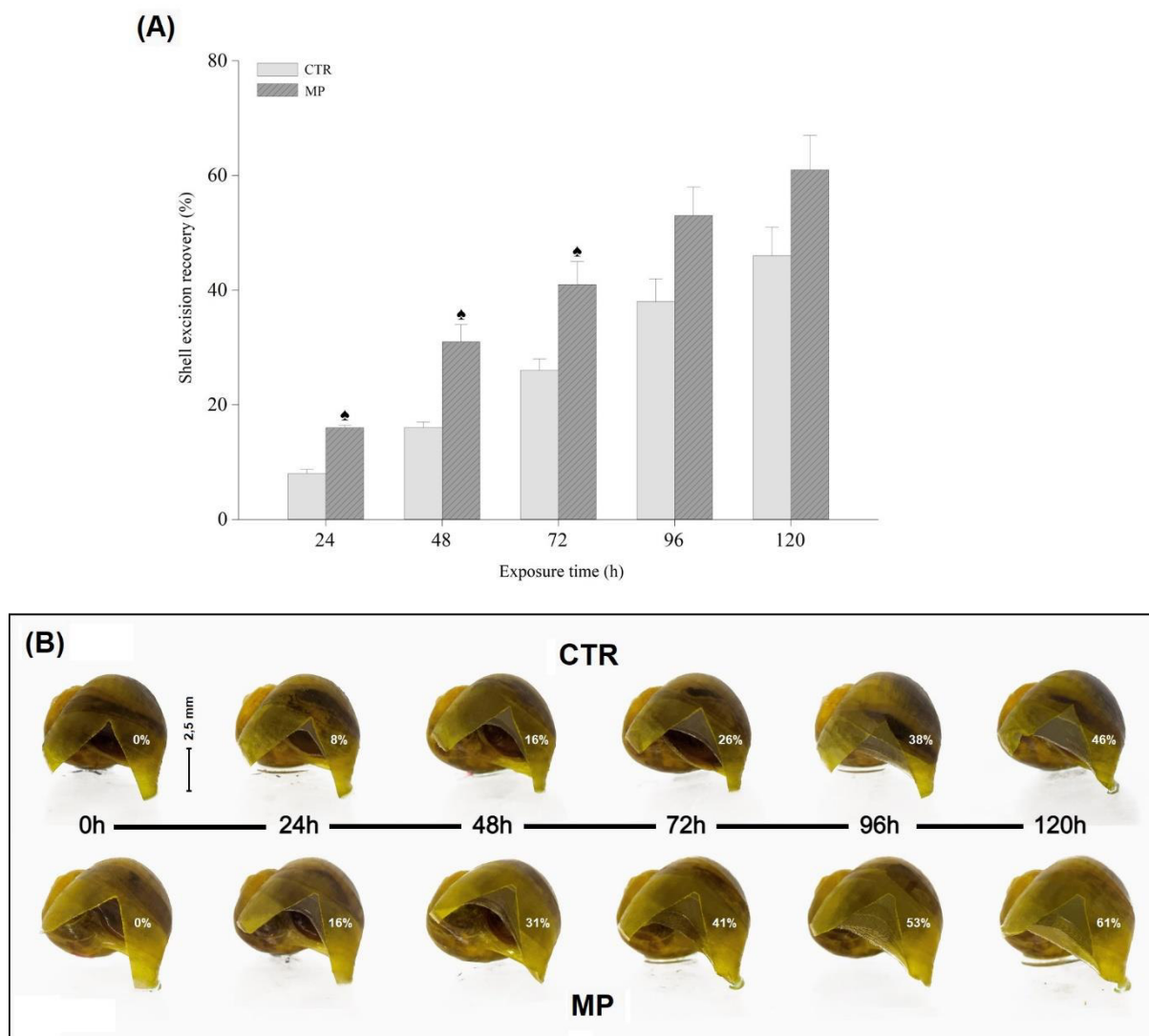


Figure 5. The image group the results of the experimental set involving shell excision and regeneration of *P. canaliculata* exposed only to water (CTR) and to 20 μ g/L of PE MPs (MP), experimental times are indicated below. **(A)** The recovered area (mean $\pm$ SE; n = 7) of *P. canaliculata* excised shell. Spades indicate significant differences between the treatments for each experimental time (p<0.05). **(B)** Shell recovery image analysis of *P. canaliculata* in **CTR** and **MP** condition recovered medium values are indicated in the image, respectively.

4. Discussion

Results from present study clearly indicate that 20 µg/L of Polyethylene (PE) microplastic (MP) interferes with the biomineralization pathways, altering activities of enzymes involved in Ca^{2+} and HCO_3^- regulations, essentials ions for shell formation. It is also true that extracellular calcium (hemolymph) was affected. However, these alterations do not seem to influence short-time shell regeneration ability in the second experimental set, even when the effect is inhibitory (i.e. inhibition of Ca^{2+} ATPase in digestive gland and mantle and inhibition of carbonic anhydrase (CA) in mantle), meaning that animals can continue growth protected by their shells (Wilbur and Saleuddin, 1983). Several studies have already reported that gastropods and bivalves growth is strongly related to environmental conditions, such as calcium and bicarbonate concentration, food disponibility, crowding, pH and temperature. Alterations of those variables indeed reflect into different shell morphology and shell growth rate, influencing its size and thickness. However, it is known that these animals have the ability to manage calcium physiology to favor the biomineralization (Marigómez et al., 2002; Rogevich et al., 2008; Glass and Darby, 2009; Ebanks et al., 2010; Cooper et al., 2010; Lobo-da-Cunha et al., 2018).

Assuredly, calcium ions are the most abundant precursor of mineralization (Marin, 2012). After reviewing transports related to aquatic mollusks shell production Clark (2020) supported the model that the inner mantle epithelium uptakes Ca^{2+} to hemolymph, while the outer mantle cells secrete Ca^{2+} to the extrapallial space, being both apical active transports, mediated by Ca^{2+} ATPases (Ebanks et al., 2010; Sillanpää et al., 2018). The Ca^{2+} ATPase is assumed to be in apical and basolateral faces of the outer mantle epithelia but, conceivably, it is related to other transporters, such as basolateral NKA (Na^+/K^+ ATPase) and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers (Clark, 2020). Sillanpää et al. (2018) verified that NKA inhibition decreased in 25% the total calcium transport. This information may indicate a basolateral aid into Ca^{2+} uptake, and reinforce the existence of, either a pump (i.e., Ca^{2+} ATPase) and other calcium exchanger in the apical membrane, which act mainly in calcium secretion into extrapallial space (Sillanpää et al., 2018). Calcium pumping comprehends almost 50% of total Ca^{2+} transport in mollusks shell formation (Clark et al., 2020) and the specific inhibition (i.e., with caloxin) of Ca^{2+} ATPase decreased in ~32% the total Ca^{2+} transport, to the extrapallial space, while a general ATPase inhibitor (i.e., vanadate) decreased it by ~14% (Clark et al., 2020). These results support the idea that this activity is centered in the direction of calcification, as said before, while the uptake into hemolymph is more related to Ca^{2+} regulation and balance (Santini et al., 2011). As

presented, the active calcium secretion (i.e., in the direction to extrapallial space) is more expressive than its uptake by hemolymph (Clark et al., 2020). In the same way, the entrance of Ca^{2+} into the body (mainly through foot and mantle cavity) occur via voltage-dependent calcium channels (CCVD), comprehending ~20% of total calcium uptake from water (Ebanks et al., 2010).

The first experiment (without shells excision) showed a decreased in Ca^{2+} hemolymph concentration at 24 h of MPs exposure and this occurred with the digestive gland concomitant decrease of CA activity and no effect on Ca^{2+} ATPase activity. Perhaps MPs physically reduced Ca^{2+} concentration in hemolymph, affecting its entrance into the mantle and digestive gland cells. However, the hemolymph decrease could be a reflection of mantle edge Ca^{2+} ATPase activity, favoring the biomineralization. Regarding CA, an explanation can be related to what was found by Wetzel et al. (2002) performing experiments with rats. The authors observed that an inhibition of CA activity in the sarcoplasmic reticulum (SR) of rat's muscles caused a depletion in HCO_3^- and H^+ production, but also caused an accumulation of free Ca^{2+} in the SR, reducing its availability. On the other hand, Chaves Lopes et al., (2020) indicated that CA activity in the digestive gland of yellow clam (*Amarilladesma mactroides*) is more related to acid-basic balance than to biomineralization. Regardless the mechanism that lead to MPs to cause a Ca^{2+} extracellular depletion or CA inhibition, results presented here suggests that the gastropods could deal with MPs and reverse this situation at 72 h. In some way MPs has triggering the increase in Ca^{2+} ATPase activity in digestive gland possibly in order to increase the ion uptake and recover Ca^{2+} hemolymph concentration, which was in fact observed at 72 h.

Results in the literature are not well agreed on the effects of MPs on Ca^{2+} homeostasis. For the freshwater fish *Prochilodus lineatus* exposed to 20 $\mu\text{g/L}$ of PE MP for 24 h, it was observed a significant drop in plasmatic Ca^{2+} concentration (Roda et al., 2020), in agreement with our results. It was also reported a Ca^{2+} ATPase gills activity decrease, the opposite of mantle edge results (Roda et al., 2020). It is worth saying that gills are more related to ionic regulation than liver (or digestive gland), and calcium demand for calcifying organisms might reflect as different effects in different epithelia, such as mantle edge. Adversely to results with freshwater fish and snails, for the shore crab *Carcinus maenas*, 10^7 microspheres/L of 8 μm polystyrene (PS) exposure, increased plasma Ca^{2+} concentration in 24 h (Watts et al., 2016). In addition, Lei et al., (2018), reported effects closer associated with the one found by this study; they show that the terrestrial nematode *Caenorhabditis elegans* exposed (48 h) to 5mg/m^2 of 5 μm PE MP had a decreased in the intestinal Ca^{2+} concentration. The authors pointed that it was

a consequence of MPs accumulation into intestinal lumen. Moreover, they showed oxidative stress establishment (Lei et al., 2018).

In this sense, the digestive system should be one target for MPs investigation. It is described that for mostly mollusks a binding mucus, that facilitates food and nutrient absorption, covers the gut lumen (Gutow et al., 2019). In this context, it is plausible that MPs could be attached to the mucus and be entrapped by endosomes. Actually, this endocytosis phenomenon by the digestive gland have been already described by von Moos et al., (2012) 6 h after exposing the mussel *Mytilus edulis* to 2.5 g/L of 1-80 µm PE MP. Beyond both gut and gland accumulation, it was observed a notable inflammation response due to MP entrapment into eosinophilic granulocytes vacuoles, marked by the increased number of granulocytoma (von Moos et al., 2012). Thus, the findings sustains that MPs have the potential to trigger immune responses in the body.

Concerning the mantle, both Ca^{2+} ATPase and CA activities were augmented in this tissue in both times of the first exposure set, and this can suggest the biomineralization maintenance, as a compensatory response to keep shell formation, but also the possibility to detoxify the MPs via shell deposition. Han et al. (2022), recently presented substantial information by connecting MP exposures and shell biomineralization, after exposing the pearl oyster *Pinctada fucata* over 7 days to 1.0 g/L of 20 µm PE MP. For the first time, was possible to observe that MP accumulated in diverse spots of mantle edge, as white floccules covered by mucus. Furthermore, the fluorescence techniques allowed seeing that MPs were not just adhered in the tissue surface (Han et al., 2022). It was suggested an encapsulation process performed by *P. fucata*. In fact, plastic beads already are being used as artificial substrates for pearls formation in oyster farms (Naji et al., 2018). As it seems, the deposition of prismatic and nacreous layer occurs normally (or even faster depending on beads size) and also increased the production of pearls (Naji et al., 2018; Han et al., 2022). In the same work, Han et al., (2022) also looked for differences in biomineralization-related genes of mantle edge cells, specifically in the formation of nacreous and prismatic layers but also amorphous CaCO_3 binding proteins (ACBP). It turns out that, in the investigated MP concentrations (e.g., 0.2, 0.5, and 1 g/L), all genes expression raised not only significantly but also with notable values when compared to control (only water) (Han et al., 2022). In general, their expression is related to matrix proteins, CA domains, aragonite and calcite structures and mostly the transformation and growth of CaCO_3 crystals. Curiously, ACCBP high expression is naturally observed in juveniles' bivalves due to age peak-growth, and this increased expression have been also reported for bivalves under shell regeneration. Thus, this work concluded that biomineralization is strongly promoted

in the presence of MP, most likely as a defensive strategy to immobilize foreign particles by calcification (Han et al., 2022).

As mentioned before the idea of the second set of experiment of this work was to see if a second stressor, such as the shell excision, could alter the MPs effects concerning the biomineralization, as well as if MPs could affect shell regeneration. Based on the results from the first set we imagined that Ca^{2+} concentration in hemolymph would be also decreased or shell would not regenerate in the MPs exposed animals, even though we did not measure in these same times.

At 72 h, under shell recovery condition, MP apparently disturbed *P. canaliculata* Ca^{2+} secretion towards hemolymph and extrapalial space, as the observed decreases in Ca^{2+} ATPase activity at digestive gland and mantle edge, respectively. In addition, at 120 h, this same enzyme kept suppressed in the gland, while no difference was observed in the mantle. Simultaneously, it seems that *calcium-related* reserves were dissolved to support shell regeneration, since hemolymph Ca^{2+} increased at 72 h. This possibility was supported by Liu et al. (2017) research, where the authors also found an increase in the extracellular Ca^{2+} concentration 48 h after *P. canaliculata* shell excision, but without MPs. Moreover, considering that both epithelia decreased their Ca^{2+} pumping at 72 h, a lack in calcium supplying to extrapalial space could be expected, indicating that the regeneration is following another via.

Regarding CA, the activity decreased in the mantle edge, at 72 and 120 h. In fact, this enzymatic activity was already expected to decrease in the mantle edge, since it is in accordance with Yang et al., (2016), whose research also involved *P. canaliculata* under shell excision condition, but without MPs. Specifically, they found that mantle edge CA activity punctually decreased within 72h after excision. In the MPs exposed gastropods, we believe that a greater CA activity could lead to an enhanced uptake of Ca^{2+} from digestive gland lumen due to the electrical gradient established by H^+ production. These results could be possibly related to food disponibility and reserves mobilization, in opposition to the first experimental set.

In fact, shell regeneration condition was not only possible but apparently, biomineralization was also stimulated in MPs presence once we observed a faster recovery rate. However, the functional dynamics of shell regeneration are very different, as literature records already described it for mostly bivalves and gastropods (Watabe, 1983). In experiments involving shell regeneration, some authors noticed that CA activity decreased after excision, while hemolymph calcium increased in the following moments (Yang et al., 2016; Liu et al., 2017). It is also reported that those values pass through peaks within time but tend to return to, as stated, "pre-excision values" (Kádár, 2008; Liu et al., 2017). These are not only in accordance

with our results but also reinforce the MPs potential to imbalance the whole calcification mechanism.

However, it is worthy to highlight that we observed the opposite in our first experiment (without excision), where we presumed that an increased Ca^{2+} ATPase activity may lead to the decrease of hemolymph calcium concentration. In fact, when comparing results from both experiments (with and without shell excision), it becomes evident that both enzymes are over activated in the mantle when facing a shell repair situation, especially at 120 h. In particular, the mantle edge epithelia are more related to the shell forming mechanisms than the gland is, as mentioned before, which could explain the peaking value over the regenerating condition. In addition, there was a different pattern observed at 72 h between the two sets of experiments. In the first one, both enzymes were activated in both epithelia, while in the second set they were suppressed at 72 h, only in the mantle edge, even though at 72 h Ca^{2+} ATPase activity also decreased.

The shell repair process is known to be mediated by hemocytes and not so dependant to the enzymatic apparatus (Mount et al., 2004; Kádár, 2008). It seems that the hemocytes work by collecting and delivering shell precursors onto the damaged area and may also concentrate at the adjacent tissue below (Mount et al., 2004). The establishment of shell repair is a signal-dependent process, mainly involving the migration and production of hemocytes, matrix proteins and growth factor genes expression, but also some outer mantle epithelial breakages (Liu et al., 2017). Hence, some authors believe that all modifications, stimulated by shell wounds, are a sum of immunological responses controlled by the mantle, kidney and digestive gland, as seen before (Kádár, 2008; Lobo-da-Cunha et al., 2018). However, it is worthy of considering that in our case, the MP presence, as a second stressor (i.e., beyond the excision), might cause a way more complex condition, possibly involving detoxification as well (Marigómez et al., 2002; Browne et al., 2008; Han et al., 2022).

Beyond shell formation, gastropods and bivalves also have the peculiar ability to entrap foreign bodies, such as parasites or strange bodies (e.g., pearl formation) (Kádár, 2008). In this sense, considering MP contamination, a similar mechanism was recently reported with corals (Reichert et al., 2022). The process, described as a “long-term MP sinking”, may evidence that coral reefs can calcificate microparticles into their skeleton, linking it to growth factors. The harms of these captures are not yet well described but may, indeed, link it to other species' behavior, when confronting MP by calcification. Similarly, Han et al., (2022) observed MPs adhered in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*, and their research also presented new information regarding CaCO_3 growth in MPs surface. Furthermore, both studies defend that

MPs entrapment in mineralized parts may possibly be a new path of accumulation (Han et al., 2022; Reichert et al., 2022). Considering the *P. canaliculata* faster regeneration, in the MPs condition, we presume that entrapment mechanisms might also be happening, as an attempt to immobilize MPs but also achieve shell recovery.

5. Conclusion

Our results indicate that 20 µg/L of polyethylene (PE) microplastic (MP) can alter the biomarkers of biomineralization, Ca^{2+} ATPase, carbonic anhydrase (CA) and hemolymph calcium concentration. Additionally, in the first experimental set, the inhibitory effects caused by MPs in the digestive gland CA may be associated with the calcium pumping increase at 72h, as a compensatory mechanism. Apparently, such results are not only in alignment but also associated in this same epithelium and could be considered as an onset response of the exposure, considering that both enzymes were increased later. On the other hand, for the mantle, the results followed opposite directions between the experimental sets. The increase of both enzymes in the first set, associated with the decrease in hemolymph calcium, supports that PE MPs promote the biomineralization of *Pomacea canaliculata*, possibly involving particle trapping. Perhaps, the involvement of epithelia in the biomineralization process could justify the particularities of the effects. Regarding the second set, the inhibition of Ca^{2+} ATPase activity in both epithelia may indicate higher susceptibility to MPs under regeneration conditions and also suggest another via to achieve shell regeneration. The same is true for CA, except for the digestive gland, whose activity promotion appears to be higher under this same condition. The increase in hemolymph calcium was also contrary to the first set. Thus, may indicate the mobilization of reserves to overcome both shell excision and the presence of MPs. Finally, although regeneration was promoted after the exposure the costs of this process remains uncertain.

6. Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and is part of the Master dissertation of LGA Lopes. MM Souza and CMG Martins are research fellows from CNPq (#314776/2020-6 and, #312898/2020-7 respectively). Special thanks to Dr.^a Claudia B. R. Martinez for the microplastics donation, to Ingrid Souza and Andressa Suanes for the help with the biomarkers analysis and gastropod culture. Finally, we thank the graphic designer Pedro Veneziano for the help with the shell-recovery images edition and for the drawing showed in the graphical abstract.

7. References

- Bank, M.S., Hansson, S.V., 2022. The Microplastic Cycle: An Introduction to a Complex Issue, in: Bank, M.S. (Ed.), *Microplastic in the Environment: Pattern and Process*, Environmental Contamination Remediation and Management. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–16. https://doi.org/10.1007/978-3-030-78627-4_1
- Besseling, E., Redondo-Hasselerharm, P., Foekema, E.M., Koelmans, A.A., 2019. Quantifying ecological risks of aquatic micro- and nanoplastic. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 49, 32–80. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1531688>
- Bour, A., Hamann Sandgaard, M., Syberg, K., Palmqvist, A., Carney Almroth, B., 2021. Comprehending the complexity of microplastic organismal exposures and effects, to improve testing frameworks. *J. Hazard. Mater.* 415, 125652. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125652>
- Bradney, L., Wijesekara, H., Palansooriya, K.N., Obadamudalige, N., Bolan, N.S., Ok, Y.S., Rinklebe, J., Kim, K.-H., Kirkham, M.B., 2019. Particulate plastics as a vector for toxic trace-element uptake by aquatic and terrestrial organisms and human health risk. *Environ. Int.* 131, 104937. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104937>
- Campos da Rocha, F.O., Martinez, S.T., Campos, V.P., da Rocha, G.O., de Andrade, J.B., 2021. Microplastic pollution in Southern Atlantic marine waters: Review of current trends, sources, and perspectives. *Sci. Total Environ.* 782, 146541. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146541>
- Chaves Lopes, F., Rosa de Castro, M., Caldas Barbosa, S., Primel, E.G., de Martinez Gaspar Martins, C., 2020. Effect of the UV filter, Benzophenone-3, on biomarkers of the yellow clam (*Amarilladesma mactroides*) under different pH conditions. *Mar. Pollut. Bull.* 158, 111401. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111401>
- Checa, A.G., 2018. Physical and Biological Determinants of the Fabrication of Molluscan Shell Microstructures. *Front. Mar. Sci.* 5, 353. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00353>
- Clark, M.S., 2020. Molecular mechanisms of biomineralization in marine invertebrates. *J. Exp. Biol.* 223, jeb206961. <https://doi.org/10.1242/jeb.206961>
- Clark, M.S., Peck, L.S., Arivalagan, J., Backeljau, T., Berland, S., Cardoso, J.C.R., Caurcel, C., Chapelle, G., De Noia, M., Dupont, S., Gharbi, K., Hoffman, J.I., Last, K.S., Marie, A., Melzner, F., Michalek, K., Morris, J., Power, D.M., Ramesh, K., Sanders, T., Sillanpää, K., Sleight, V.A., Stewart-Sinclair, P.J., Sundell, K., Telesca, L., Vendrami, D.L.J., Ventura, A., Wilding, T.A., Yarra, T., Harper, E.M., 2020. Deciphering mollusc shell production: the roles of genetic mechanisms through to ecology, aquaculture and biomimetics. *Biol. Rev.* 95, 1812–1837. <https://doi.org/10.1111/brv.12640>
- Connors, K.A., Dyer, S.D., Belanger, S.E., 2017. Advancing the quality of environmental microplastic research: Advancing the quality of environmental microplastic research. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 1697–1703. <https://doi.org/10.1002/etc.3829>
- Cooper, C.A., Whittamore, J.M., Wilson, R.W., 2010. Ca^{2+} -driven intestinal HCO_3^- secretion and CaCO_3 precipitation in the European flounder in vivo: influences on acid-base regulation

and blood gas transport. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R870–R876. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00513.2009>

De-la-Torre, G.E., 2020. Microplastics: an emerging threat to food security and human health. *J. Food Sci. Technol.* 57, 1601–1608. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04138-1>

Dioses-Salinas, D., Pérez-Baca, B., De-la-Torre, G., 2019. Ecotoxicological effects of microplastics and adsorbed contaminants on aquatic organisms. *Manglar* 16, 173–182. <https://doi.org/10.17268/manglar.2019.024>

Ebanks, S.C., O'Donnell, M.J., Grosell, M., 2010b. Characterization of mechanisms for Ca^{2+} and $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ acquisition for shell formation in embryos of the freshwater common pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 213, 4092–4098. <https://doi.org/10.1242/jeb.045088>

Glass, N.H., Darby, P.C., 2009. The effect of calcium and pH on Florida apple snail, *Pomacea paludosa* (Gastropoda: Ampullariidae), shell growth and crush weight. *Aquat. Ecol.* 43, 1085–1093. <https://doi.org/10.1007/s10452-008-9226-3>

Gomes, T., Bour, A., Coutris, C., Almeida, A.C., Bråte, I.L., Wolf, R., Bank, M.S., Lusher, A.L., 2022. Ecotoxicological Impacts of Micro- and Nanoplastics in Terrestrial and Aquatic Environments, in: Bank, M.S. (Ed.), *Microplastic in the Environment: Pattern and Process, Environmental Contamination Remediation and Management*. Springer International Publishing, Cham, pp. 199–260. https://doi.org/10.1007/978-3-030-78627-4_7

Gutow, L., Bartl, K., Saborowski, R., Beermann, J., 2019. Gastropod pedal mucus retains microplastics and promotes the uptake of particles by marine periwinkles. *Environ. Pollut.* 246, 688–696. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.097>

Han, Z., Jiang, T., Xie, L., Zhang, R., 2022. Microplastics impact shell and pearl biomineralization of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Environ. Pollut.* 293, 118522. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118522>

Huang, W., Song, B., Liang, J., Niu, Q., Zeng, G., Shen, M., Deng, J., Luo, Y., Wen, X., Zhang, Y., 2021. Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: A review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health. *J. Hazard. Mater.* 405, 124187. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124187>

Ichinose, K., 2002. INFLUENCE OF AGE AND BODY SIZE ON ALARM. *J. Chem. Ecol.* 12.

Inoue, K., Onitsuka, Y., Koito, T., 2021. Mussel biology: from the byssus to ecology and physiology, including microplastic ingestion and deep-sea adaptations. *Fish. Sci.* 87, 761–771. <https://doi.org/10.1007/s12562-021-01550-5>

Kádár, E., 2008. Haemocyte response associated with induction of shell regeneration in the deep-sea vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 362, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.05.014>

Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., Shi, H., Raley-Susman, K.M., He, D., 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Total Environ.* 619–620, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.103>

- Liu, Q., Zhao, L.L., Yang, S., Zhang, J.E., Zhao, N.Q., Wu, H., He, Z., Yan, T.M., Guo, J., 2017. Regeneration of excised shell by the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 50, 17–29. <https://doi.org/10.1080/10236244.2016.1261455>
- Lobo-da-Cunha, A., Alves, Â., Oliveira, E., Guimarães, F., Calado, G., 2018. Endocytosis, lysosomes, calcium storage and other features of digestive-gland cells in cephalaspidean gastropods (Euopisthobranchia). *J. Molluscan Stud.* <https://doi.org/10.1093/mollus/eyy034>
- Lu, H.-C., Ziajahromi, S., Neale, P.A., Leusch, F.D.L., 2021. A systematic review of freshwater microplastics in water and sediments: Recommendations for harmonisation to enhance future study comparisons. *Sci. Total Environ.* 781, 146693. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146693>
- Luan, L., Wang, X., Zheng, H., Liu, L., Luo, X., Li, F., 2019. Differential toxicity of functionalized polystyrene microplastics to clams (*Meretrix meretrix*) at three key development stages of life history. *Mar. Pollut. Bull.* 139, 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.003>
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs: Distribution of Metals in Molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358–392. <https://doi.org/10.1002/jemt.10040>
- Marin, F., 2012. The formation and mineralization of mollusk shell. *Front. Biosci.* S4, 1099–1125. <https://doi.org/10.2741/s321>
- Matheus, S.F. de B., Tereza, C. dos S.C., Alberis, S.S., Ewerton, V. dos S., 2020. Ingestion of plastic debris affects feeding intensity in the rocky shore crab *Pachygrapsus transversus* Gibbes 1850 (Brachyura: Grapsidae). *Int. J. Biodivers. Conserv.* 12, 113–117. <https://doi.org/10.5897/IJBC2020.1391>
- Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P., Snider, D., 2004. Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in the Eastern Oyster. *Science* 304, 297–300. <https://doi.org/10.1126/science.1090506>
- Naji, A., Nuri, M., Vethaak, A.D., 2018. Microplastics contamination in molluscs from the northern part of the Persian Gulf. *Environ. Pollut.* 235, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.046>
- Reichert, J., Arnold, A.L., Hammer, N., Miller, I.B., Rades, M., Schubert, P., Ziegler, M., Wilke, T., 2022. Reef-building corals act as long-term sink for microplastic. *Glob. Change Biol.* 28, 33–45. <https://doi.org/10.1111/gcb.15920>
- Roda, J.F.B., Lauer, M.M., Risso, W.E., Bueno dos Reis Martinez, C., 2020. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 242, 110659. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110659>
- Rogevich, E.C., Hoang, T.C., Rand, G.M., 2008. The Effects of Water Quality and Age on the Acute Toxicity of Copper to the Florida Apple Snail, *Pomacea paludosa*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 690–696. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9106-1>

- Rozman, U., Turk, T., Skalar, T., Zupančič, M., Čelan Korošin, N., Marinšek, M., Olivero-Verbel, J., Kalčíková, G., 2021. An extensive characterization of various environmentally relevant microplastics – Material properties, leaching and ecotoxicity testing. *Sci. Total Environ.* 773, 145576. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145576>
- Sillanpää, J.K., Sundh, H., Sundell, K.S., 2018. Calcium transfer across the outer mantle epithelium in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285, 20181676. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1676>
- Simkiss, K., Mason, A.Z., 1983. Metal Ions: Metabolic and Toxic Effects. The work was supported by a NERC grant No. GR3/3063., in: *The Mollusca*. Elsevier, pp. 101–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751402-4.50011-X>
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., Huvet, A., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 2430–2435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113>
- Tang, Y., Rong, J., Guan, X., Zha, S., Shi, W., Han, Y., Du, X., Wu, F., Huang, W., Liu, G., 2020. Immunotoxicity of microplastics and two persistent organic pollutants alone or in combination to a bivalve species. *Environ. Pollut.* 258, 113845. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113845>
- Thompson, R.C., 2004. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science* 304, 838–838. <https://doi.org/10.1126/science.1094559>
- von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A., 2012. Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11327–11335. <https://doi.org/10.1021/es302332w>
- Waite, H.R., Donnelly, M.J., Walters, L.J., 2018. Quantity and types of microplastics in the organic tissues of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and Atlantic mud crab *Panopeus herbstii* from a Florida estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 129, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.026>
- Watabe, N., 1983. Shell Repair, in: *The Mollusca*. Elsevier, pp. 289–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751404-8.50015-3>
- Watts, A.J.R., Urbina, M.A., Goodhead, R., Moger, J., Lewis, C., Galloway, T.S., 2016. Effect of Microplastic on the Gills of the Shore Crab *Carcinus maenas*. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5364–5369. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01187>
- Wetzel, P., Kleinke, T., Papadopoulos, S., Gros, G., 2002. Inhibition of muscle carbonic anhydrase slows the Ca^{2+} transient in rat skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 283, C1242–C1253. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00106.2002>
- Wilbur, K.M., Saleuddin, A.S.M., 1983. Shell Formation, in: *The Mollusca*. Elsevier, pp. 235–287. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751404-8.50014-1>
- Yang, S., Ni, L., Zhao, L., Yang, J., Liu, Q., Zhang, J., He, Z., Peng, S., 2016. Repair process and enzymatic activity associated with induction of shell regeneration in the invasive

species *Pomacea canaliculata*. Molluscan Res. 36, 207–212.
<https://doi.org/10.1080/13235818.2015.1128603>

Zebral, Y.D., da Silva Fonseca, J., Marques, J.A., Bianchini, A., 2019. Carbonic Anhydrase as a Biomarker of Global and Local Impacts: Insights from Calcifying Animals. Int. J. Mol. Sci. 20, 3092. <https://doi.org/10.3390/ijms20123092>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados indicam que 20µg/L de microplásticos MPs de polietileno (PE) podem alterar os biomarcadores da biomineralização, Ca^{2+} ATPase, anidrase carbônica (AC) e concentração de cálcio da hemolinfa de *Pomacea canaliculata*. Além disso, no primeiro *set* experimental, com os animais sem lesão, não foram observados padrões nas respostas da glândula digestiva. Por outro lado, para a borda do manto, os resultados apresentaram padrões opostos entre os *sets* experimentais. O aumento da atividade de ambas as enzimas no primeiro, associada à diminuição da hemolinfa de cálcio, indica que os MPs promovem a via da biomineralização de *P. canaliculata*, possivelmente envolvendo o aprisionamento de partículas no manto externo e na concha. Em relação ao segundo *set*, a inibição das atividade enzimáticas em ambos os epitélios sugere a utilização de uma outra via para regenerar a concha lesionada. Para a glândula digestivas, os resultados possivelmente se relacionam com a captação de cálcio via alimentação. Por fim, embora a regeneração tenha sido promovida após a exposição, o custo deste processo permanece incerto.

Estudos envolvendo MPs e moluscos estão ganhando popularidade, como mencionado anteriormente, no entanto pesquisas envolvendo tais contaminantes e a biomineralização ainda estão surgindo. Especificamente, a literatura ainda é mais escassa em relação a espécies de água doce bem como gastrópodes, em comparação com as pesquisas do ambiente marinho. Nesse sentido, o presente trabalho contribui com informações relevantes a respeito das interações dos MPs em alguns biomarcadores da biomineralização. Aparentemente, tais efeitos ainda não foram reportados para gastrópodes, especialmente dulcícolas, e com certeza abrem precedentes para futuras pesquisas que aprofundem o entendimento não só nestas variáveis mas também nas especificidades do processo de formação de conchas e partes mineralizadas.