



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V – MINISTRO ALCIDES CARNEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

AMANDA MARIA GOMES DOS SANTOS

**EFEITO DA OXIBENZONA NO TEOR DE HIDRATAÇÃO TECIDUAL DA
ANÊMOMA-DO-MAR *Bunodosoma cangicum***

**JOÃO PESSOA
2021**

AMANDA MARIA GOMES DOS SANTOS

**EFEITO DA OZIBENZONA NO TEOR DE HIDRATAÇÃO TECIDUAL DA
ANÊMOMA-DO-MAR *Bunodosoma cangicum***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba do Campus V, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia Animal Comparada.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Enelise Marcelle Amado.

**JOÃO PESSOA
2021**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S237e Santos, Amanda Maria Gomes dos.
Efeito da oxibenzona no teor de hidratação tecidual da anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum* [manuscrito] / Amanda Maria Gomes dos Santos. - 2021.
24 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2021.

"Orientação : Profa. Dra. Enelise Marcelle Amado, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."

1. *Bunodosoma cangicum*. 2. Oxibenzona. 3. Teor hídrico.
4. Osmoconformador. I. Título

21. ed. CDD 593

AMANDA MARIA GOMES DOS SANTOS

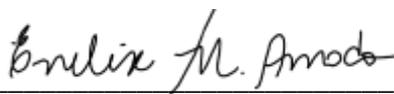
EFEITO DA OZIBENZONA NO TEOR DE HIDRATAÇÃO TECIDUAL DA
ANÊMOMA-DO-MAR *Bunodosoma cangicum*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Coordenação Curso de graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba
do campus V, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

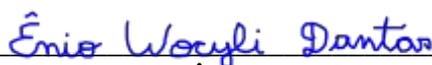
Área de concentração: Fisiologia Animal
Comparada

Aprovada em: 01 / 10 / 2021.

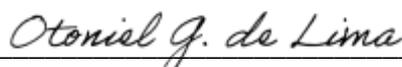
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Enelise Marcelle Amado (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Ênio Wocyli Dantas
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Me. Otoniel Gonçalves de Lima
Universidade de São Paulo (USP)

A minha família, por todo seu amor e
companheirismo, DEDICO.

“Só se pode alcançar um grande êxito
quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”
Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	07
2	METODOLOGIA	09
2.1	Área de Estudo	09
2.2	Coleta e Manuseio dos Exemplos	11
2.3	Experimento <i>in vivo</i>	12
2.3.1	<i>Exposição dos animais à água do mar com e sem oxibenzona</i>	12
2.3.2	<i>Exposição dos animais à variação de salinidade com e sem oxibenzona</i>	12
2.3.3	<i>Teor de Hidratação Tecidual</i>	13
2.4	Análise Estatística	13
3	RESULTADOS	14
4	DISCUSSÃO	16
5	CONCLUSÃO	18
	REFERÊNCIAS	18

EFEITO DA OXIBENZONA NO TEOR DE HIDRATAÇÃO TECIDUAL DA ANÊMOMA-DO-MAR *Bunodosoma Cangicum*

Amanda Maria Gomes dos Santos

RESUMO

As anêmonas-do-mar pertencentes ao filo Cnidária, podem ser facilmente encontradas na região mesolitoral, entre fendas e frestas e fixas em rochas e recifes de arenito ou corais. Devido a sua baixa capacidade de locomoção, as anêmonas estão sujeitas a diversos fatores bióticos e abióticos. A espécie *Bunodosoma cangicum* é amplamente distribuída no litoral paraibano, sendo encontrada na zona entre-marés numa área sujeita à variação de salinidade e ao acesso de banhistas. O filtro solar é um dos produtos mais utilizados por banhistas para proteger-se dos raios solares e possui em sua composição muitos compostos químicos, dentre eles a oxibenzona. Esses compostos quando dissolvidos na água podem afetar a biota aquática, alterando as condições fisiológicas dos organismos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da oxibenzona na regulação hídrica das anêmonas *Bunodosoma cangicum* coletadas na Praia Formosa em Cabedelo-PB. Afim desse objetivo, os animais foram expostos à água do mar (35‰) sem ou com oxibenzona (1 µM). Também, os animais foram submetidos à salinidade diminuída (25‰) e salinidade aumentada (45‰) na ausência e presença de oxibenzona. Após a exposição a capacidade de manutenção do teor de hidratação do disco podal e dos tentáculos foi analisada. Os resultados demonstram que as anêmonas apresentam uma boa capacidade de regulação de água tecidual em ambos os tecidos mesmo na presença de oxibenzona, e que esse composto portanto não interfere nos mecanismos de regulação de água tecidual, ao menos na concentração testada no presente estudo.

Palavras-chave: *Bunodosoma cangicum*. Oxibenzona. Teor Hídrico. Osmoconformador.

ABSTRACT

Sea anemones belonging to the phylum Cnidaria, can be easily found in the mesolittoral region, between crevices and fixed in rocks and sandstone or coral reefs. Due to their low mobility capacity, anemones are subject to several biotic and abiotic factors. The species *Bunodosoma cangicum* is widely distributed along the Paraíba coast of, being found in the intertidal zone in an area subject to salinity variation and accessible by bathers. Sunscreen is one of the products most used by bathers to protect themselves from the sun's rays, in its composition it has many chemical compounds, including oxybenzone. These compounds when dissolved in water can affect aquatic biota, changing the physiological conditions of organisms. This study aimed to evaluate the effect of oxybenzone on tissue water regulation of *Bunodosoma cangicum* anemones collected at Praia Formosa in Cabedelo-PB. For this purpose, the animals were exposed to seawater (35‰) without or with oxybenzone (1 µM). Also, the animals were subjected to decreased (25‰) and increased (45‰) salinity in the absence and presence of oxybenzone. After exposure, the ability to maintain the hydration content of the pedal disc and tentacles was analyzed. The results show that anemones have a good capacity to regulate tissue water content in both pedal disc and tentacles, even in the presence of oxybenzone, and that this compound, therefore, does not interfere with tissue water regulation mechanisms, at least at the concentration tested.

Keywords: *Bunodosoma cangicum*. Oxybenzone. Water content. Osmoconforming.

1 INTRODUÇÃO

As anêmonas-do-mar são pólipos solitários pertencentes à Classe Anthozoa e a Ordem Actiniaria ou Corallimorpharia (FAUTIN & ALLEN, 1992). De grande importância para o meio marinho devido as interações ecológicas que exercem, as anêmonas-do-mar habitam diferentes ambientes, desde regiões de entre-marés, recifes costeiros rasos, costões rochosos e até mesmo ilhas oceânicas e atóis (e.g. MELO & AMARAL, 2005). Por serem animais bentônicos, as anêmonas-do-mar estão sujeitas a fatores externos como o tipo de substrato, assoreamento, ação das ondas e mudanças de maré, entre outros, fatores estes que vão, em grande parte, condicionar a sua distribuição (GOMES, *et al.*, 1998; AMADO, *et al.* 2011). A anêmona *Bunodosoma cangicum* Belém & Preslercravo 1973, é uma espécie geralmente encontrada no mesolitoral entre fendas e frestas, em áreas parcialmente cobertas por sedimento e fixas ao substrato rochoso (MELO & AMARAL, 2005).

Nos ambientes que estão sujeitos às variações diárias das marés relativas ao ciclo lunar, quando a maré está baixa existem períodos de condições hiperosmóticas (alta salinidade), devido à evaporação da água das poças que se formam nas rochas e da água nas fendas, e também períodos de condições hiposmóticas (baixa salinidade) devido às chuvas, que diluem a água do mar dessas poças (WILLMER *et al.*, 2000). Assim, os animais que ali vivem são capazes de tolerar essas variações de salinidade. As anêmonas são animais osmoconformadores, ou seja, apresentam osmolaridade do fluido corporal em conformidade com a osmolaridade do meio externo. As espécies que vivem em locais com flutuação de salinidade apresentam variação da concentração osmótica do seu fluido do celentêro de acordo com a salinidade ambiental, e enfrentam tal desafio regulando água e osmólitos em seus tecidos (AMADO *et al.*, 2011).

O fato de não sustentarem gradientes significativos entre seu líquido extracelular e o meio externo, significa que os animais osmoconformadores possuem alta permeabilidade osmótica e iônica nos seus epitélios de contato com o meio, e ausência de transporte ativo de sal através destes epitélios. Por isso, se varia a salinidade da água do mar, varia também a osmolalidade/concentração do líquido extracelular, o que expõe as células desses animais à desafios osmóticos. Deste modo, o volume celular é regulado de maneira que a célula retorne ao seu volume normal após um distúrbio osmótico, e permaneça relativamente estável, para poder desempenhar suas diferentes funções. Quando a célula, depois de inchar, utiliza mecanismos para diminuir seu volume, este processo é chamado de redução regulatória de volume (RVD). Tais mecanismos envolvem o transporte de solutos osmoticamente ativos para fora da célula e assim a água segue por osmose. Por outro lado, mecanismos utilizados para restabelecer o volume perdido - devido a um choque hiperosmótico – envolvem o acúmulo de osmólitos no meio intracelular e recebem o nome de aumento regulatório de volume (RVI) (HOFFMANN & DUNHAM, 1995).

Portanto, nos invertebrados osmoconformadores a capacidade de regular o volume das células é muito importante, e determinante do seu grau de eurihalinidade. (FREIRE *et al.* 2008; VEIGA *et al.*, 2016; MUCCILOLO *et al.*, 2021). Os osmoconformadores eurihalinos podem tolerar mudanças significativas de salinidade do ambiente externo e podem sobreviver a diluição ou concentração do líquido extracelular através da regulação dos osmólitos orgânicos e inorgânicos em seus tecidos (RIOS, 2017).

Estudos já foram realizados em anêmonas a respeito das suas respostas à variação de salinidade, mostrando que diferentes espécies de anêmonas do mar osmoconformam em meio hiperosmótico e hiposmótico. Em muitas espécies, quando as anêmonas são expostas à variação de salinidade, seu fluido do celentêro rapidamente (dentro de 6 h) se equilibra com o novo meio (PIERCE e MINASIAN, 1974; BURSEY e HARMER, 1979; BENSON-RODENBOUGH e ELLINGTON, 1982). Por sua vez, a diluição ou concentração do fluido do celentêro representa

um desafio de regulação do volume celular para células e conseqüentemente de hidratação tecidual (KIRSCHNER, 1991; SCEMES *et al.*, 1991; RUIZ e SOUZA, 2008). Podemos assim, esperar que as espécies osmoconformadoras que sobrevivem em habitats caracterizados por mudanças rápidas de salinidade, como o habitat entre marés, possuam a capacidade de ativar mecanismos eficientes de regulação de volume celular, o que mantém o teor de água em seus tecidos (KIRSCHNER, 1991; FOSTER *et al.*, 2010). Sabe-se que anêmonas, quando submetidas a estresse osmótico, utiliza mobilização de osmólitos orgânicos para manter seus volumes celulares (BENSON-RODENBOUGH E ELLINGTON, 1982; HOWARD *et al.*, 1987; DEATON e HOFFMANN, 1988).

Além de desafios osmóticos, muitas vezes animais que vivem em ambientes rasos como as poças de marés devem também lidar com interferências humanas nesses ambientes. Atualmente o mercado de produção e o consumo de dermocosméticos e itens de higiene pessoal estão aumentando de forma significativa em todo o mundo, atingindo de forma inesperada altos níveis, trazendo assim, conseqüências de importância elevada para a contaminação do meio ambiente. O lançamento desses produtos também está relacionado com a rápida expansão do turismo nas áreas costeiras marinhas (WILKSON, 2004). Foi demonstrado que os compostos químicos contidos em filtros solares e outros produtos de cuidados pessoais atingem níveis detectáveis em sistemas de água doce e salgada (DAUGHTON & TERNES 1999; GIOKAS *et al.* 2007).

Como os filtros solares são lipofílicos, seus filtros UV podem bioacumular em animais aquáticos (GIOKAS *et al.* 2007) e causar efeitos semelhantes aos relatados para outros compostos xenobióticos (BALMER *et al.* 2005). Estudos identificaram filtros UV, como oxibenzona, octocrileno, octinoxato e salicilato de etilhexila em quase todas as fontes de água ao redor do mundo e indicam que esses filtros não são facilmente removidos por técnicas comuns de estação de tratamento de águas residuais (SCHNEIDER & LIM, 2018). Em algumas regiões marinhas, a oxibenzona foi encontrada em concentrações como 2200 ng/L (BRAT. *et al.*, 2015), 580µg/L e em ponto específico na Ilhas Virgens chegou a 1395 mg/L (DOWNS *et al.*, 2016). Vários estudos testaram os efeitos tóxicos da oxibenzona, bem como de filtros solares que contém oxibenzona em sua composição, em organismo marinhos, principalmente corais, e encontraram alterações no crescimento populacional (MCCOSHUM *et al.*, 2016), deformações morfológicas e toxicidade celular (DOWNS *et al.*, 2016), efeitos genotóxicos e mutagênicos (ZHAO *et al.*, 2013; DOWNS *et al.*, 2016), distúrbios endócrinos (WEISBROD *et al.*, 2007) e muitos outros efeitos nocivos. Compostos como a oxibenzona estão impactando negativamente corais, algas e até micro-organismos. Em anêmonas-do-mar os efeitos da oxibenzona ainda são pouco estudados e envolvem distúrbios do comportamento (MCCOSHUM *et al.*, 2016).

A presença dos filtros UV no meio ambiente, essencialmente os orgânicos, é preocupante, principalmente por apresentarem propriedades críticas como bioacumulação (DÍAZ-CRUZ *et al.*, 2008). Vários filtros UV estão atualmente em uso, entretanto sua segurança, eficácia e perfil toxicológico ainda não estão claros. De acordo com a literatura publicada, os efeitos toxicológicos dos filtros UV levantam preocupações sobre sua segurança a longo prazo (UREK *et al.*, 2013). Alguns estudos têm demonstrado que alguns poluentes impactam negativamente a resposta de invertebrados marinhos à variação de salinidade, inclusive alterando a capacidade de regulação de volume celular e manutenção do teor de hidratação tecidual (AMADO *et al.*, 2012; MORABITO *et al.*, 2013; PATEL & BIELMYER-FRASER 2015). No entanto, nada se sabe a respeito do impacto da oxibenzona na tolerância à salinidade de espécies osmoconformadoras. Desta forma, é importante conhecer o modo que estes organismos reagem frente à exposição por poluentes, visto que são animais de pouca mobilidade que não possuem a capacidade de fuga das adversidades, ficando expostos à poluição.

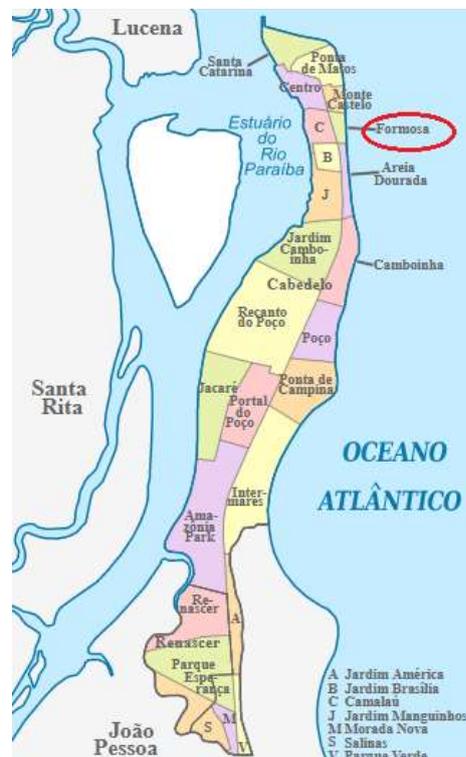
A anêmona *Bunodosoma cangicum* por permanecerem em áreas costeiras sofrem com o passar do tempo com a ação antropológica com o grande fluxo de turismo e desenvolvimento de atividades recreativas nos litorais e estão sujeitas a variadas formas de contaminação que podem afetar suas atividades fisiológicas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi analisar se a substância oxibenzona, em uma concentração ambientalmente realística, tem alguma influência na capacidade de regulação hídrica da espécie *Bunodosoma cangicum* exposta ou não à variação de salinidade.

2 METODOLOGIA

2.1 Área de Estudo.

O presente estudo foi realizado na região entre - marés da Praia Formosa, município de Cabedelo, no Estado da Paraíba, Brasil ($6^{\circ}58'25''S34^{\circ}49'41''W$) (figura 1 e 2). Os exemplares foram coletados de alguns substratos artificiais presentes na faixa de areia chamados de “gabiões” (figura 3). Estes “gabiões” são estruturas artificiais de granito amontoado em blocos, presos dentro de uma armação de ferro, com a finalidade de diminuir a dinâmica de sedimentos na praia (SANTOS, 2020). Cerca de oito “gabiões” foram selecionados de forma aleatória para as coletas dos animais.

Figura 1: Localização da Praia Formosa (círculo vermelho) no mapa da cidade de Cabedelo - PB.



Fonte: Google Imagens, 2020.

Figura 2: Praia Formosa – Cabedelo, PB.



Fonte: Fotografia da autora.

Figura 3: Visualização dos “gabiões”, onde os exemplares ficavam localizados para as coletas.



Fonte: Fotografia da autora.

2.2 Coleta e Manuseio dos Exemplos

As anêmonas foram coletadas no ano de 2019 e no de 2021, em meses alternados em cada ano, durante as marés baixas onde ficavam expostas na faixa de areia da praia, em elevações entre 0,1 e 0,6 cm. Os animais foram coletados de forma manual e de maneira aleatória onde eram retirados os animais adultos, com um auxílio de uma pequena faca e martelos. Em cada “gabião” (total de 08 ao todo) eram retiradas cerca de 02 a 03 anêmonas, que ficavam aderidas as pedras (figura 04). Eram coletadas de 12/18 anêmonas a cada ida ao campo. Ao final da fase experimentos, foram totalizadas 06 coletas na região de Praia Formosa.

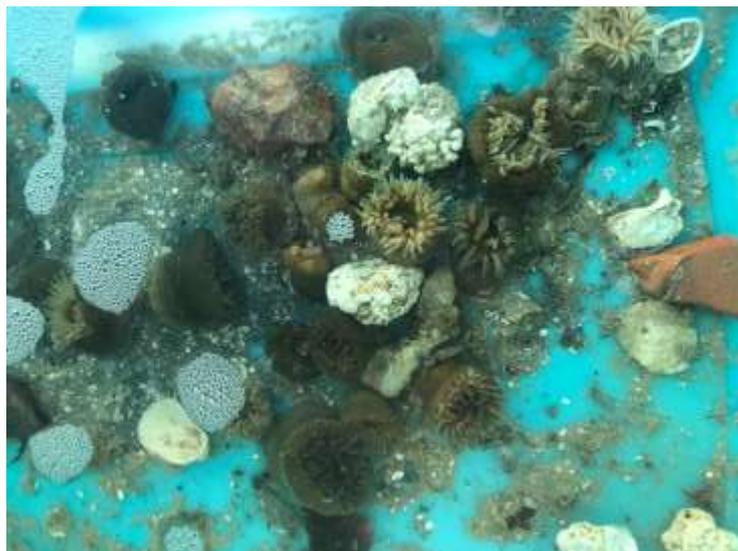
Figura 04: Exemplar de *Bunodosoma Canguicum*, aderida ao substrato.



Fonte: Fotografia da autora.

Posteriormente, os animais foram transferidos em recipientes plásticos com água do mar para o Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA), do Curso de Ciências Biológicas, no campus V da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Onde os exemplares foram dispostos em aquário, conferida a salinidade (33-35‰) e colocados aeradores (CX – 1000 AQUARIUM AIR PUMP) e filtros, mantidos em temperatura ambiente (25-26 °C). As anêmonas eram alimentadas até a saciedade com filé de peixe uma vez por semana. Ficavam cerca de 4 dias em período de aclimação para posteriores experimentos. (Figura 05)

Figura 05: Animais em laboratório.



Fonte: Fotografia da autora.

2.3 Experimento In Vivo

2.3.1 *Exposição dos animais a água do mar com e sem oxibenzona.*

Neste primeiro experimento as anêmonas foram expostas à água do mar em béqueres de 2L. Foram utilizados dois béqueres como simuladores de aquários, onde as anêmonas foram expostas por 6 horas à água do mar com salinidade controle 35‰ e também expostas em outro aquário à oxibenzona na concentração de $1\mu\text{M}$ ($228\mu\text{g/L}$). Esta concentração foi escolhida baseado nas concentrações utilizadas em estudos anteriores com diversos organismos marinhos (BLÜTHGEN *et al.*, 2012; ZHONG *et al.*, 2019; CONWAY *et al.*, 2021). Após o tempo predito, os animais foram sujeitos a retirada de fragmentos do disco podal e dos tentáculos para a análise do teor de hidratação tecidual. A fim de otimizar o uso de animais em experimento no laboratório, o presente experimento foi realizado em paralelo com o experimento de outro projeto do nosso grupo de pesquisa que analisava a atividade do mecanismo de resistência à multixenobióticos (MXR) nas anêmonas expostas à oxibenzona. Portanto, além da oxibenzona, as anêmonas neste experimento foram também submetidas ao fluorescente rodamina b a concentração de ($1\mu\text{M}$), uma substância não citotóxica que é utilizada como substrato para estudar o mecanismo MXR (BARD, 2000; SKJOLDING *et al.*, 2021).

2.3.2 *Exposição à variação de salinidade na presença e ausência de oxibenzona.*

Para o experimento de variação de salinidade, foi utilizado três águas construídas a diferentes valores de salinidade, com o uso de água destilada e sal marinho próprio para aquarismo nas proporções adequadas. Foram obtidas as salinidades 25‰, 35‰ (considerada a salinidade controle) e 45‰. Para o preparo dessas águas, cada litro de água destilada recebia respectivamente 25,35 e 45 gramas de sal marinho para aquarismo. Cada água foi conferida com o refratômetro e colocadas em Beckers de 2L como um aquário experimental, onde cada um recebeu aeradores (Figura 06). Foram distribuídos cerca de 6 animais em cada aquário, e ficaram expostos por cerca de 6 horas. Após o tempo de exposição foram retirados os seus

tecidos que foram armazenados para posterior determinação do teor de hidratação. O experimento foi realizado duas vezes, na primeira sem o composto químico e na segunda foi adicionada a oxibenzona na concentração de 1 μ M. Tais experimentos eram independentes e foram realizados com animais diferentes em cada bateria experimental.

Figura 06: Experimento com variação de salinidade



Fonte: Fotografia da autora.

2.3.3 Teor de Hidratação Tecidual

Após a exposição dos animais às condições experimentais relatadas acima, foi medido o teor de hidratação tecidual dos fragmentos de tecido coletados. Para a análise do teor de hidratação tecidual, foram retirados fragmentos de duas estruturas anatômicas dos animais: o disco podal e os tentáculos. O disco podal é a base de sustentação das anêmonas, e os tentáculos são as estruturas responsáveis pela captura de alimentos e presas. Duas partes importantes dos animais a serem estudadas. No experimento foram retiradas partes dessas estruturas com um auxílio de uma tesoura e colocados em microtubos de 1,5ml, que anteriormente foram pesados e identificados. Em seguida os tubos agora com parte dos tecidos dos animais foram pesados novamente em balança analítica com 0,1 de precisão (SHIMADZU AUY 220) o que resultou no peso úmido (Pu). Posteriormente foram desidratados em estufa a temperatura de 60 °C graus por 24 horas, depois pesados novamente e obtendo o peso seco (Ps). Desta forma para obter a fórmula do teor de hidratação tecidual (Th), o valor do peso do eppendorf foi subtraído do Pu (peso úmido) e Ps (peso seco), expressa da seguinte forma:

$$\text{Th (\%)} = \frac{(\text{Pu} - \text{Ps})}{\text{Pu}} \times 100$$

2.4 Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Os dados apresentaram distribuição normal e homogênea e foram comparados com teste t ou ANOVA

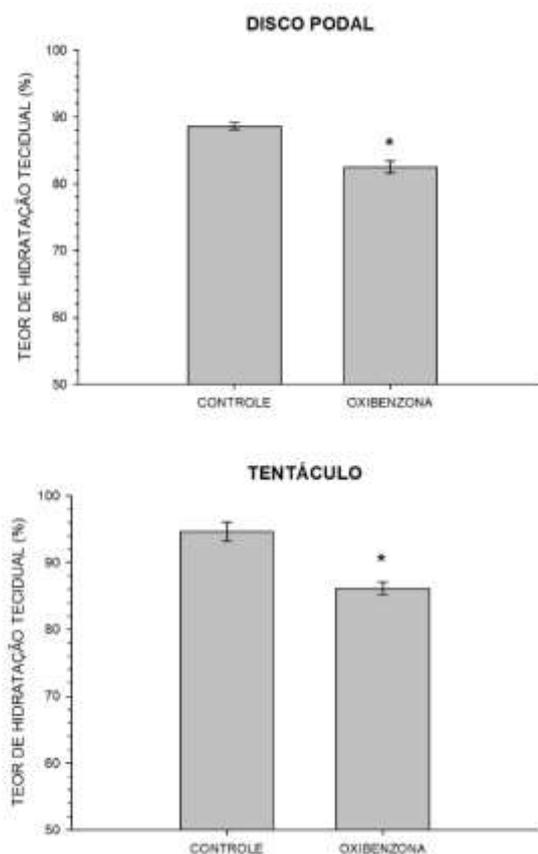
de uma via, seguido de Holm-Sidak como pós teste. Tanto para as análises estatísticas como para o desenvolvimento dos gráficos foi utilizado o software SIGMAPLOT 11.0.

3 RESULTADOS

3.1 Exposição dos animais a água do mar com e sem oxibenzona.

Quando às anêmonas foram submetidas à água do mar com ou sem oxibenzona ($1\mu\text{M}$) houve redução no teor de hidratação tecidual quando a oxibenzona estava presente (Gráfico 01). O valor médio de hidratação nos organismos controles (água do mar era de $88,60 \pm 0,52\%$ para o disco podal e de $94,63 \pm 1,39\%$ para os tentáculos e quando submetidos a oxibenzona, o percentual baixou para $82,47 \pm 0,91\%$ de hidratação no disco podal ($p=0,001$) e $86,15 \pm 0,94\%$ nos tentáculos ($p<0,001$).

Gráfico 01: Teor de hidratação tecidual de *Bunodosoma Canguicum* submetida à água do mar (35‰) com ou sem oxibenzona por 6 horas. As barras indicam a porcentagem de água nos tecidos. * indica diferença significativa entre as condições experimentais (teste t, $p < 0,05$, $n = 5-15$).



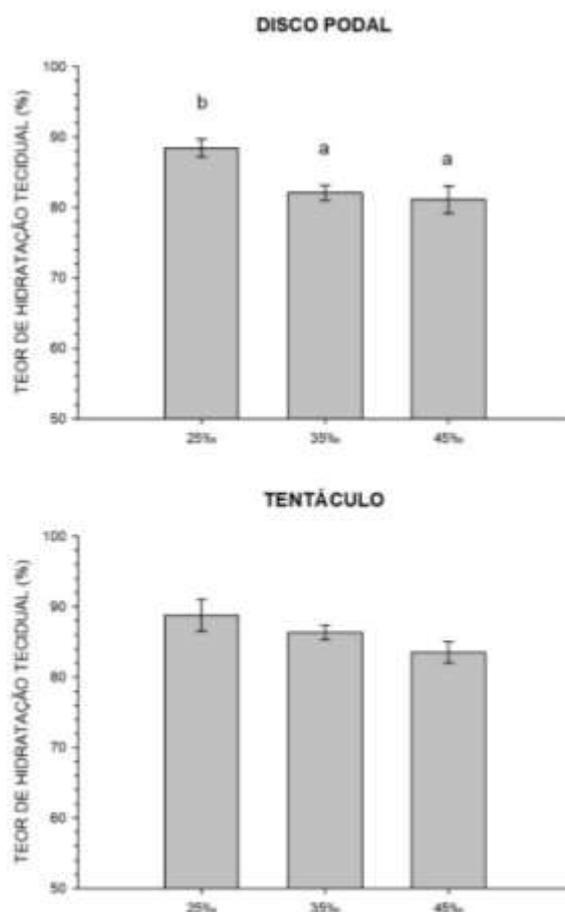
3.2 Exposição à variação de salinidade na presença e ausência de oxibenzona.

Os resultados do teor de hidratação tecidual das anêmonas expostas às diferentes salinidades estão apresentados em dois gráficos, no primeiro (Gráfico 02) nos mostram os

valores para o experimento sem adição da oxibenzona e no segundo gráfico (Gráfico 03) os resultados são com a ação da oxibenzona..

Na ausência da oxibenzona houve um aumento de hidratação tecidual no disco podal das anêmonas expostas à salinidade mais baixa, 25‰ ($F=7,274$, $p=0,006$). O teor de hidratação tecidual na salinidade 25‰ foi $88,42 \pm 1,24\%$, na salinidade 35‰ (controle) foi de $82,05 \pm 1,09\%$ e na salinidade 45‰ foi de $81,09 \pm 1,94\%$. Em relação aos tentáculos, não houve diferença significativa e o teor de hidratação tecidual na salinidade 25‰ foi de $88,81 \pm 2,27\%$, na salinidade 35‰ (controle) foi de $86,31 \pm 1,04\%$ e na salinidade 45‰ o valor foi $83,51 \pm 1,54\%$.

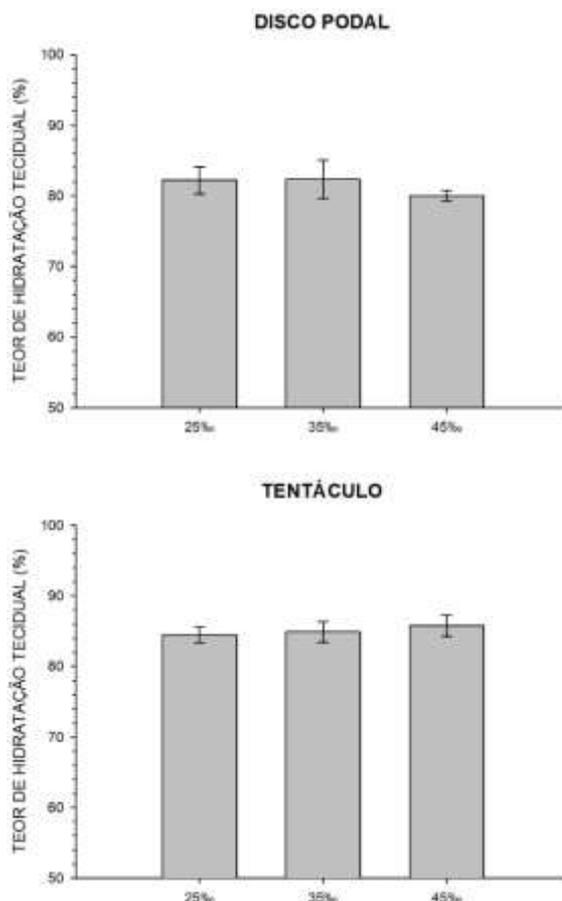
Gráfico 02: Teor de hidratação tecidual de *Bunodosoma Canguicum* submetida às salinidades experimentais 25‰, 35‰ e 45‰ por 6 horas sem oxibenzona. As barras indicam a porcentagem de água nos tecidos. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as condições experimentais (One Way ANOVA, $p < 0,05$, $n = 6$).



Com a presença da oxibenzona na concentração de ($1\mu\text{M}$), não houve alteração no teor de hidratação tecidual em nenhuma das diferentes salinidades. No disco podal, na salinidade 25‰ a porcentagem foi de $82,20 \pm 1,94\%$, na salinidade 35‰ (controle) foi de $82,34 \pm 2,72\%$ e na

salinidade 45‰ foi $79,99 \pm 0,77\%$. Já nos tentáculos, na salinidade 25‰ o valor foi $84,45 \pm 1,11\%$, na salinidade 35‰(controle) o valor foi $84,88 \pm 1,43\%$ e na 45‰ foi de $85,79 \pm 1,52\%$.

Gráfico 03: Teor de hidratação tecidual de *Bunodosoma Canguicum* submetida às salinidades experimentais 25‰, 35‰ e 45‰ com oxibenzona ($1\mu\text{M}$) por 6 horas. As barras indicam a porcentagem de água nos tecidos. Não houve diferença significativa entre as condições experimentais (One Way ANOVA, $p > 0,05$, $n = 3-6$).



4 DISCUSSÃO

As anêmonas são habitantes frequentes das zonas entre-marés e por possuírem superfícies corporais altamente permeáveis, a exposição ao ar ou às variações de salinidade que ocorrem naturalmente nesses ambientes por si só representam um grande desafio fisiológico. Além dos fatores naturais, a presença de poluentes representa um desafio ainda maior, e requer o desenvolvimento de estratégias de tolerância a esses fatores.

As anêmonas são pouco utilizadas como modelo biológico para estudos de contaminação aquática, onde, na maioria das vezes, os estudos visaram analisar a utilização e propriedade das toxinas presentes nos nematocistos, a relação simbiótica desses animais com as zooxantelas, em alguns casos utilizando contaminantes a fim de observar se há diminuição da simbiose ou bioacumulação (HARLAND & NGANRO, 1990; CLINE *et al.*, 1995; MARTÍNEZ *et al.*, 2002; GREENWOOD *et al.*, 2003; MITCHELMORE *et al.*, 2003a; MITCHELMORE *et al.*, 2003b, HOMNA *et al.*, 2003; KUO *et al.*, 2010; WOLENSKI *et al.*, 2013). Embora a resposta de várias espécies de anêmonas à variação de salinidade esteja bem caracterizada (PIERCE & MINASIAN 1974; BURSEY e HARMER, 1979; BENSON-

RODENBOUGH, & ELLINGTON, 1982; DEATON & HOFFMAN 1988; AMADO et al., 2011; GLON et al., 2019), pouco se sabe sobre a influência de poluentes na tolerância desses animais à variação de salinidade.

O teor de hidratação pode refletir a nível tecidual o volume celular, pois a quantidade de água dentro de cada célula altera o peso do tecido como um todo (GALVÃO *et al.*, 2009b). A manutenção do teor hídrico constante é sinal de que as funções de regulação de volume celular operam satisfatoriamente (LANG, 1987; 2007). Tipicamente, invertebrados marinhos osmoconformadores quando submetidos a um estresse osmótico não alteram seu teor de hidratação tecidual ou apresentam mudanças menores do que as esperadas se nenhum mecanismo de regulação estivesse envolvido (PIERCE & MINASIAN, 1974; DEATON & HOFFMAN 1988; FOSTER et al., 2010; AMADO et al., 2015; CASTELLANO et al., 2018). Distúrbios na regulação de volume celular ou na manutenção do teor de hidratação tecidual já foram registrados em cnidários, crustáceos e moluscos na presença de poluentes como metais pesados (AMADO et al., 2006; AMADO et al., 2012; MORABITO et al., 2013; DAVID et al., 2018), indicando que tais substâncias podem romper o equilíbrio de água nesses animais e que distúrbios da regulação hídrica pode ser um bom biomarcador de contaminação aquática (DAVID et al., 2018).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que quando as anêmonas foram submetidas à oxibenzona sem o desafio salino (gráfico 1) houve uma redução no teor de hidratação tanto do disco podal como dos tentáculos. No entanto, esse resultado deve ser interpretado com cautela, pois como mencionado na seção materiais e métodos nos primeiros experimentos, as anêmonas eram submetidas também ao fluorescente rodamina B. As rodaminas e seus derivados são corantes muito utilizados em microscopia de fluorescência (FREDERICE, 2009) e também para avaliação da atividade do mecanismo MXR (mecanismo de resistência à multixenobióticos) (KURELEC 1992; KURELEC et al., 2000). Embora seja utilizada há décadas nesses ensaios, e considerada não citotóxica, recentemente um estudo avaliou o uso seguro dessa substância em ecotoxicologia aquática e encontrou certa toxicidade da rodamina B para organismos aquáticos, porém em uma concentração de 30 a 50 vezes mais alta do que a usada nesse experimento (SKJOLDING et al., 2021). Apesar da não toxicidade na concentração utilizada, o corante pode sim ter influenciado nos valores do teor de hidratação tecidual dos dois tipos de tecidos. Essa influência fica evidente quando comparamos os valores de hidratação tecidual da condição controle do Gráfico 1 (ou seja, salinidade 35‰ sem oxibenzona) com os valores de hidratação tecidual da salinidade 35‰ do Gráfico 2 (também sem oxibenzona). O resultado dessa comparação é que os valores de hidratação são significativamente mais altos quando a rodamina está presente (Gráfico 1). Ou seja, o tecido não perdeu água na presença de oxibenzona, mas sim está mais hidratado na condição controle (sem oxibenzona), o que leva à interpretação errônea que houve redução de hidratação tecidual na condição experimental. Isso fica ainda mais evidente porque não houve diferença estatística quando comparamos o teor de hidratação da condição oxibenzona (Gráfico 1) como o teor de hidratação da salinidade 35‰ com oxibenzona (Gráfico 3). Logo, a hidratação tecidual dos animais “controle” do experimento 1 pode estar alterada pela presença de rodamina que ao entrar na célula cria um gradiente osmótico para a entrada de água.

Como as anêmonas são osmoconformadores (a osmolalidade do fluido corporal do animal varia conforme a osmolalidade do meio externo) bentônicos, de pouca mobilidade, que habitam desde regiões intermarés, recifes costeiros rasos, costões rochosos a ilhas oceânicas e atóis (MELO & AMARAL, 2005), possuem habilidades que as fazem serem resistentes as diversas variações de salinidades, como podemos observar nos resultados dos dados da segunda parte dos experimentos. O teor de hidratação tecidual das anêmonas diante de variações de salinidades não sofreu grandes alterações. E mesmo com a adição da oxibenzona, a capacidade

de hidratação dos seus tecidos foram mantidos e não houveram diferenças estatísticas significantes.

No experimento de variação de salinidade, a intensidade do choque osmótico foi de cerca de 30% tanto para cima quanto para baixo. A salinidade 25‰ representa uma diluição de 28,57% em relação a água do mar (salinidade 35‰). Do mesmo modo a salinidade 45‰ representa uma concentração também de 28,57%. Olhando por esse lado, mesmo que o teor de hidratação do disco podal das anêmonas submetidas à salinidade 25‰ esteja elevado quando comparado com o teor de hidratação das anêmonas submetidas à salinidade 35‰ (Gráfico 2), ainda assim esses animais demonstram uma boa capacidade de regulação de água tecidual diante de uma diluição da água do mar, uma vez que a variação no conteúdo de água (~7% de aumento) do tecido foi muito menor que a intensidade do choque osmótico (~30%) indicando que os animais possivelmente realizaram regulação parcial de volume celular. Se não houvesse nenhum mecanismo envolvido, seria esperado um aumento de cerca de 30% no teor de hidratação tecidual. De fato, esse fenômeno já foi observado anteriormente. Segundo Deaton & Hoffmann (1988) durante a aclimação da anêmona do mar *Metridium senile* à água do mar diluída, houve aumento na hidratação tecidual. Entretanto, esse aumento foi menor do que a intensidade da mudança de salinidade do ambiente, indicando que essas anêmonas regulam volume parcialmente.

É importante também destacar que no presente estudo essa regulação parcial ocorreu na salinidade mais baixa e apenas em um tecido, o disco podal. Nos tentáculos a regulação foi total, visto que é provável que o mecanismo de liberação do veneno pelos nematocistos presentes nesse tecido seja muito sensível às alterações de volume de celular, e de fato estudos anteriores indicam que essas células apresentam uma boa capacidade de regulação de volume celular (MORABITO et al., 2013). Já na salinidade mais alta 45‰ os animais não apresentaram dificuldade em manter seu teor de hidratação em ambos os tecidos.

Quando os animais foram desafiados com a variação de salinidade na presença de oxibenzona, não houve em nenhum dos tecidos analisados dificuldade de regulação de água tecidual. As anêmonas responderam mantendo seu teor de hidratação em ambos os tecidos o que indica que a oxibenzona, ao menos na concentração utilizada (1µM) e no tempo experimental de 6 horas, não apresenta nenhum efeito sobre a capacidade de regulação de água tecidual nesses animais.

5. CONCLUSÃO

As anêmonas *Bunodosoma cangicum* mostraram-se bons animais osmoconformadores, mantendo suas atividades fisiológicas a condições adversas. A ação da oxibenzona na concentração utilizada nos experimentos não trouxe prejuízos para a regulação hídrica dos animais durante um desafio salino. As anêmonas quando expostas as salinidades diferentes se mantiveram em boas condições, mesmo com a adição do composto químico. Faz-se necessário novos estudos com concentrações diferentes de oxibenzona e com outros compostos presentes nos protetores solares, como o dióxido de titânio também encontrados em águas marinhas. É importante observar a ação desses compostos químicos em anêmonas e em demais invertebrados marinhos fundamentais para a manutenção dos ecossistemas.

REFERÊNCIAS

AMADO, E. M., Souza-Bastos, L. R., Vidal, E. A. G., Leite, T. S., & Freire, C. A. (2015). Different abilities to regulate tissue hydration upon osmotic challenge in vitro, in the

cephalopods *Octopus vulgaris* and *O. insularis*. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, 48(3), 205-211.

AMADO, E. M., Freire, C. A., & Souza, M. M. (2006). Osmoregulation and tissue water regulation in the freshwater red crab *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Decapoda), and the effect of waterborne inorganic lead. *Aquatic Toxicology*, 79(1), 1-8

AMADO, Enelise M. et al. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 158, n. 4, p. 542-551, 2011.

AMADO, Enelise Marcelle. **Adaptação de anêmonas do mar a variação de salinidade—evidências de mecanismos regulatórios**. 2006. Tese de Doutorado. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

ANJOS, Vanessa Abelaira dos. **Fenótipo MXR na anêmona do mar *Bunodosoma cangicum*: mecanismo de efluxo de cobre e influência da temperatura e salinidade**. 2017.

ANJOS, Vanessa Abelaira dos. **Células de anêmonas *Bunodosoma cangicum* expostas ao cobre: citotoxicidade, defesa e dano de DNA**. 2013. Dissertação de Mestrado.

BARD, S. M. (2000). Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 357-389.

BENSON-RODENBOUGH, B., & Ellington, W. R. (1982). Responses of the euryhaline sea anemone *Bunodosoma cavernata* (Bosc)(Anthozoa, Actinaria, Actiniidae) to osmotic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 72(4), 731-735

BLÜTHGEN, N., Zucchi, S., & Fent, K. (2012). Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and applied pharmacology*, 263(2), 184-194.

BORGES, Jocelayne T. et al. Densidade, uso do hábitat e distribuição de *Bunodosoma cangicum* Corrêa, 1964 (Cnidaria, Anthozoa, Actiniidae) nos recifes do Cabo Branco (João Pessoa, PB). In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu**. 2007.

BORGES, Vinícius Dias. **Parâmetros do metabolismo oxidativo na anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum*: variação sazonal e efeitos da exposição ao ar**. 2013. Dissertação de Mestrado.

BRATKOVICS, S., Wirth, E., Sapozhnikova, Y., Pennington, P., & Sanger, D. (2015). Baseline monitoring of organic sunscreen compounds along South Carolina's coastal marine environment. *Marine pollution bulletin*, 101(1), 370-377.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. Segunda edição. 2007

BURSEY, C.R., Harmer, J.A., 1979. Induced changes in the osmotic concentration of the coelenteron fluid of the sea anemone *Condylactis gigantea*. **Comp. Biochem. Physiol. A** 64, 73–76.

CASTELLANO, G. C., Santos, I. A., & Freire, C. A. (2018). Maintenance of ionic gradients and tissue hydration in the intertidal sea cucumber *Holothuria grisea* under hypo-and hypersalinity challenges. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 98(2), 325-332.

CLINE, E.I.; Wiebe, L.I.; Young, J.D.; Samuel, J. 1995. **Toxic effects of the novel protein UPI from the sea anemone *Urticina piscivora***. *Pharm. Res.* 32, 309-314.

CONWAY, A. J., Gonsior, M., Clark, C., Heyes, A., & Mitchelmore, C. L. (2021). Acute toxicity of the UV filter oxybenzone to the coral *Galaxea fascicularis*. ***Science of The Total Environment***, 796, 148666.

CORONADO, Michael et al. Atividade estrogênica e efeitos reprodutivos do filtro UV oxibenzona (2-hidroxi-4-metoxifenil-metanona) em peixes. ***Aquatic Toxicology***, v. 90, n. 3, pág. 182-187, 2008.

DANOVARO, Roberto et al. Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. ***Environmental health perspectives***, v. 116, n. 4, p. 441-447, 2008.

DAUGHTON, Christian Gaei; TERNES, Thomas A. Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal no meio ambiente: agentes de mudanças sutis. ***Perspectivas de saúde ambiental***, v. 107, n. suplemento 6, pág. 907-938, 1999.

DAVID, D. D., Lima, O. G., de Sousa Nóbrega, A. M. C., & Amado, E. M. (2018). Capacity of tissue water regulation is impaired in an osmoconformer living in impacted estuaries ?. ***Ecotoxicology and environmental safety***, 166, 375-382.

DEATON, L. E., & Hoffmann, R. J. (1988). Hypoosmotic volume regulation in the sea anemone *Metridium senile*. ***Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology***, 91(1), 187-191.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. ***TrAC Trends Analytical Chemistry***, v. 28, p. 708–717, 2009.

DOWNS, C. A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., ... & Loya, Y. (2016). Toxicopathological effects of the sunscreen UV filter, oxybenzone (benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the US Virgin Islands. ***Archives of environmental contamination and toxicology***, 70(2), 265-288.

FREDERICE, Rafael. **Fluorescência molecular em nanopartículas de sílica marcadas com quercetina e rodamina B**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FREIRE, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P., Vitule, J. R., Souza, M. M., & Prodocimo, V. (2008). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. ***Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology***, 149(4), 435-446.

GALVÃO, P. M. A. et al. Metals bioaccumulation in bivalve mollusks: evolutive and ecological aspects to be concerned in marine biomonitoring. **Brazilian Journal of Aquatic Science & Technology**, v. 13, n. 2, p. 59-66, 2009.

GLON, H., Haruka, Y., Daly, M., & Nakaoka, M. (2019). **Temperature and salinity survival limits of the fluffy sea anemone**, *Metridium senile* (L.), in Japan. *Hydrobiologia*, 830(1), 303-315.

HART, C.E., Crowe, J.H., 1977. **The effect of attached gravel on survival of intertidal anemones**. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 96, 28–41

HOEGH-GULDBERG, Ove. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. **Marine and freshwater reserach**, s 50, no.8, p839-866, 1999.

HOFFMANN, E. K.; DUNHAM, P. B. **Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation**. In: KWANG, J. W. *International Review of Cytology*, v.161, p.172-262, 1995.

KURELEC, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. **Critical reviews in toxicology**, 22(1), pp.23-43.

MARTÍNEZ, D.; Morera, V.; Alvarez, C.; Tejuca, M.; Pazos, F.; García, Y.; Raida, M.; Padrón, G.; Lanio, M.E. 2002. Identify between cytolysins purified from two morphos of the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**. 40, 1219-1221.

MCCOSHUM, Shaun M.; SCHLARB, Alicia M.; BAUM, Kristen A. Direct and indirect effects of sunscreen exposure for reef biota. **Hydrobiologia**, v. 776, n. 1, p. 139-146, 2016.

MELO K.V., Amaral F.D. 2005. **Ampliação da distribuição das anêmonas-do-mar (Cnidaria, Actiniaria) no estado de Pernambuco, Brasil**. *Trop. Ocean.* 33, 19-31.

MENDES, E.G. 1976. **Chemical mediation in Coelenterata**. *Acad. Bras. Ciênc.* 47, 101-104.

MORABITO, R., Marino, A., & La Spada, G. (2013). Heavy metals affect regulatory volume decrease (RVD) in nematocytes isolated from the jellyfish *Pelagia noctiluca*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 165(2), 199-206.

MOYES, C. D.; Schulte, P. M. 2009. **Principios de fisiología animal**. 2 ed. São Paulo. Artmed Editora.752p.

MUCCILOLO, S., Desiderato, A., Leal, S. M., Mastrodonato, M., Lana, P., & Freire, C. A. (2021). Variability in the degree of euryhalinity of neotropical estuarine annelids. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 544, 151617.

Oxibenzona: composto tóxico está presente no protetor solar. eCycle, 2014. Disponível em : <https://www.ecycle.com.br/oxibenzona/>.

RABELO, Emanuelle Fontenele. **Distribuição espacial e interações competitivas em zoantídeos (CNIDARA: ZOANTHIDAE) em um ambiente de recifes de arenito no Nordeste do Brasil.** 2007.

RIOS, Leonardo de Paula. **A expressão muscular de HSP70 reflete estresse salino nos cristáceos braquiúros callinectes danae e Callinectes ornatus (osmorreguladores) e Hepatus pudibundus (osmoconformador)?.** 2017

PATEL, P. P., & Bielmyer-Fraser, G. K. (2015). The influence of salinity and copper exposure on copper accumulation and physiological impairment in the sea anemone, *Exaiptasia pallida*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 168, 39-47.

PAREDES, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J.B. and Beiras, R., 2014. **Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels Isochrysis galbana, Mytilus galloprovincialis, Paracentrotus lividus, and Siriella armata.** *Chemosphere*, 104, pp.44-50.

PIERCE, S.K., Minasian, L.L., 1974. Water balance of a euryhaline sea anemone, *Diadumene leucolena*. **Comp. Biochem. Physiol. A** 49, 159–167.

PIERCE JR, S. K., & Minasian Jr, L. L. (1974). Water balance of a euryhaline sea anemone, *Diadumene leucolena*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 49(1), 159-167.

SANTOS, Henrique Bezerra dos et al. **Distribuição espaço-temporal e estresse termo-salino na anêmona-do-mar Anthopleura krebsi (Cnidaria: Actiniidae).** 2020.

SCHNEIDER, Samantha L.; LIM, Henry W. Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 266-271, 2019.

SHERWOOD, L.; Klandorf, H.; Yancey, P. 2012. Fluid and Acid–Base Balance. In L. Sherwood (ed.) **Animal physiology: from genes to organisms**, pp. 612-654. Brooks/Cole, Thomson Learning, Belmont, USA.

SKJOLDING, L. M., Dyhr, K. S., Köppl, C. J., McKnight, U. S., Bauer-Gottwein, P., Mayer, P., ... & Baun, A. (2021). **Assessing the aquatic toxicity and environmental safety of tracer compounds Rhodamine B and Rhodamine WT.** *Water Research*, 197, 117109.

UREK, S. Y.; BILGIN, M.; HALLI, B. U. Toxicological Profile of Homosalate as Cosmetic Ingredients. **Global Journal of Pathology and Microbiology**, v. 1, p. 7– 11, 2013.

VEIGA, Marcos PT; KLÖH, Aline S.; FREIRE, Carolina A. Fisiologia como ferramenta de análise e predição de impactos de bioinvasão costeira. IN: **Simpósio IBEROAMERICANO de Biodiversidad marina y cambio climático red cyted BIODIVMAR: 410RT0396.** P 60

VEIGA, M. P. T., Gutierrez, S. M., Castellano, G. C., & Freire, C. A. (2016). Tolerance of high and low salinity in the intertidal gastropod *Stramonita brasiliensis* (Muricidae): behaviour and maintenance of tissue water content. **Journal of Molluscan Studies**, 82(1), 154-160.

WILKINSON, Clive. **Status dos recifes de coral do mundo: 2000**. Instituto Australiano de Ciência Marinha, 2000.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. **Environmental Physiology of Animals**. Oxford: Blackwell Science, 2000.

ZHONG, X., Downs, C. A., Che, X., Zhang, Z., Li, Y., Liu, B., ... & Gao, H. (2019). The toxicological effects of oxybenzone, an active ingredient in sunscreen personal care products, on prokaryotic alga *Arthrospira* sp. and eukaryotic alga *Chlorella* sp. *Aquatic Toxicology*, 216, 105295.

AGREDECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a meu bom Deus por sua infinita misericórdia em minha vida, por ser meu sustento em dias difíceis e por ter me concebido a graça de chegar até aqui mesmo com todas as dificuldades. Sem Ele eu não sou nada.

Agradeço ao meu pai Agmar (*in memoriam*), minha maior saudade, por ter me amado durante 16 felizes anos da minha vida, e por ter sido o melhor e tão querido pai. Por sempre me incentivar nos estudos e me encher de tanto carinho. Sei que lá de cima está feliz e orgulhoso em me ver concluir minha graduação. Obrigada por tanto, amarei você daqui até a eternidade.

Agradeço a minha mãe Luiza e ao meu irmão Henrique, por nunca terem me deixado desistir, por me apoiarem em todas as minhas escolhas, por sempre me incentivarem a buscar um futuro melhor, por me aguentarem diariamente e por tudo que fazem por mim. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui, vocês são tudo em minha vida. Para vocês dois, toda minha gratidão e amor.

A Rafael, meu namorado e companheiro de sonhos, muito obrigada por tanta paciência e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, e por sempre me entender e me apoiar. Amo você.

Agradeço a toda minha família, principalmente a minhas queridas avós que tanto amo e que sinto tanta falta: Maria da Natividade (*in memoriam*) e Alzira (*in memoriam*), sei que se estivessem comigo hoje estariam radiantes e cheias de orgulho, e ao meu avô Severino por ser um grande exemplo, a todas as minhas tias e tios amados e todos os meus primos que amo de coração. Vocês são essenciais.

Um agradecimento especial a minha Tia Adelsita, por ser sempre tão especial, cuidadosa, dona dos melhores conselhos e ser um anjo em nossas vidas. Por nunca ter desistido da nossa família e sempre ajudar a todos. A senhora é luz, amo-te.

Obrigada as pessoas maravilhosas que a vida me presenteou e que deixaram as coisas mais leves, como a minha prima/irmã Vanessa e minha grande amiga Sarah pelas conversas diárias, por uma incentivar a outra e compartilhar dos mesmos dramas, mesmos sonhos e conquistas. Juntas somos mais fortes. Vocês são muito incríveis.

Agradeço aos meus futuros compadres Elielma e Luiz, por estarem comigo a tantos anos, por todo companheirismo, puxões de orelhas e tantas risadas compartilhadas. Obrigada por tudo, vocês são muito especiais pra mim.

E obrigada a aos meus queridos amigos: Vitor, Mônica, Dudu, Thalita, Valéria, Lettycia e Dayanne e a todos que tanto quero bem.

Agradeço a minha querida orientadora Enelise Marcelle Amado, por ter me recebido no LEFA e por ter compartilhado um pouco de seu vasto conhecimento. Obrigada por ser tão

paciente, por toda ajuda, por ser compreensiva e tão dedicada em tudo que faz. A senhora é um exemplo de profissional e de pessoa. Minha eterna gratidão.

Agradeço também aos membros da minha banca, por terem aceitado o meu convite de avaliar meu trabalho de conclusão de curso. Ao querido professor Ênio Wocyli, grande profissional, inspiração de vida e de dedicação, obrigada por todo conhecimento e por ser sempre tão amigo de todos os alunos. E ao mestre Otoniel Lima, que mesmo na correria do doutorado abraçou meu pedido e irá contribuir demais em meu trabalho, meu muitíssimo obrigada.

Minha gratidão aos guerreiros Hianka, Kamila, Mika e Misael, por me aguentarem durante esses anos de graduação diariamente na UEPB reclamando, sendo mal-humorada, e muito chata, obrigada por compartilhar dramas, por toda companhia, por me ajudarem nas coletas, nos experimentos, e por terem me proporcionado tanto amor e muitas gargalhadas, sem vocês concluir esse curso seria ainda mais difícil. E no final, deu tudo certo.

Obrigada aos discentes do curso de Biologia da UEPB por todo conhecimento compartilhado e por cada aprendizado diário.

E a todos que de alguma forma torceram por mim, meu muitíssimo OBRIGADA!!