

**PRESENÇA DE METAIS PESADOS EM ASAS DE HAMADRYAS FEBRUA HÜBNER, 1823 (Lepidoptera, Nymphalidae, Biblidinae)****PRESENCE OF HEAVY METALS ON WINGS OF HAMADRYAS FEBRUA HÜBNER, 1823 (Lepidoptera, Nymphalidae, Biblidinae)**Lucas Liesak Sant'Ana Santos<sup>1</sup>José Geraldo Gomes de Alvarenga<sup>2</sup>Eduarda Figueiredo Borges<sup>3</sup>Laís Silva<sup>4</sup>Nicole Carvalho Campos<sup>5</sup>Rafael Vitor De Medeiros Costa<sup>6</sup>Nádia Maria Rodrigues De Campos Velho<sup>7</sup>

**Resumo:** *Microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada a Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) tem como princípio de funcionamento a utilização de feixes de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra em estudo e identificar elementos químicos presentes. Borboletas são potenciais bioindicadores da qualidade ambiental, sendo possível observar em algumas espécies o processo de migração, e desta forma, tornam-se vítimas, involuntariamente, de dispersão de metais. O presente estudo teve como objetivo identificar e realizar uma análise semiquantitativa da presença de metais pesados em asas da espécie Hamadryas februa. Os exemplares foram coletados no campus da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, SP, em três locais distintos: borboletário; interior de um fragmento de Mata Atlântica e entorno do Centro de Planejamento e Desenvolvimento da Educação (CEPLADE). Foram selecionados no total, cinco espécimes de borboletas para remoção de um fragmento da asa inferior, e imediatamente, realizada a soltura dos exemplares. Os fragmentos foram fixados em porta amostras, seguindo o processo de secagem, metalizados com ouro e analisados em Microscópio Eletrônico de Varredura. Análises semiquantitativas foram realizadas com base na porcentagem atômica total dos metais encontrados em cada amostra sendo obtidos os seguintes valores: ferro (0,28%), manganês (0,74%), níquel (0,77%), cobalto (2,32%), cobre (4,96%), zinco (11,71%), bromo (12,83%), alumínio (19,57%), chumbo (21,79%) e mercúrio (24,98%). Segundo as análises, as amostras apresentaram concentrações acentuadas de chumbo e mercúrio. Este trabalho pode indicar que borboletas da espécie Hamadryas februa são capazes de acumular em suas escamas, metais pesados.*

**Palavras-chave:** Bioindicadores; MEV; gases tóxicos; borboletas.

**Abstract:** *Scanning electron microscopy (SEM) coupled with X-ray dispersive energy spectroscopy (EDS) has as its operating principle the use of a small diameter electron beam to explore the surface of the sample under study and identify chemical elements present in the samples. Butterflies are potential bioindicators of environmental quality, being possible to observe in some species the migration process, and thus, they unintentionally become victims of metal dispersion. The present study aimed to identify and perform a semiquantitative analysis of the presence of heavy metals in wings of the species Hamadryas februa. The*

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Paraíba – Univap, Brasil. E-mail: lucasliesakss@gmail.com.

<sup>2</sup> Universidade do Vale do Paraíba – Univap, Brasil. E-mail: ge.alvarenga.bio@gmail.com.

<sup>3</sup> Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Paraíba – Univap, Brasil. E-mail: dudafigueiredosjc@gmail.com.

<sup>4</sup> Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Paraíba – Univap, Brasil. E-mail: leallajo@hotmail.com.

<sup>5</sup> Colégio Técnico Opção, Brasil. E-mail: nicole.carvalho15@gmail.com.

<sup>6</sup> Graduando em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Paraíba – Univap, Brasil. E-mail: rvmcosta2@gmail.com.

<sup>7</sup> Doutorado em Biologia pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Brasil. E-mail: nvelho2020@gmail.com.

specimens were collected on the campus of the University of Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, SP, in three distinct locations: butterfly garden; inside a fragment of Atlantic Forest and surrounding the Center for Planning and Development of Education (CEPLADE). A total of five butterfly specimens were selected for removal of a fragment of the lower wing, and the specimens were immediately released. The fragments were fixed in a sample holder, following the drying process, treatment with gold metallization, and analysis under a Scanning Electron Microscope. Semiquantitative analyses were performed based on the total atomic percentage of the metals found in each sample: iron (0.28%), manganese (0.74%), nickel (0.77%), cobalt (2.32%), copper (4.96%), zinc (11.71%), bromine (12.83%), aluminum (19.57%), lead (21.79%) and mercury (24.98%). According to the analyses, the samples showed marked concentrations of lead and mercury. This work may indicate that butterflies from the species *Hamadryas februa* are able to accumulate heavy metals in their scales.

**Keywords:** Bioindicators; SEM; toxic gases; butterflies.

## 1 INTRODUÇÃO

O objeto de estudo desta pesquisa é a borboleta da espécie *Hamadryas februa* (HÜBNER, 1823) (Figura 1). Esta espécie é capaz de manter uma população durante o ano inteiro por usar plantas hospedeiras que perduram as quatro estações e os indivíduos adultos não sofrem com desidratação em temporadas secas e, portanto, não precisam fazer diapausas reprodutivas (YOUNG, 2009). Diferente da maioria das borboletas diurnas, a espécie em questão dispõe de tons em cinza em suas asas, comparada a mosaicos, são facilmente confundidas com líquens, o que funciona como camuflagem em resposta à predação.

São considerados bioindicadores, seres vivos suscetíveis a processos ou poluentes no meio ambiente, produzindo uma resposta que pode ser traduzida como indicação de qualidade do ambiente (MARKERT; BREURE; ZECHMEISTER, 2003). Insetos são considerados indicadores ambientais de ótima qualidade (VIEIRA *et al.*, 2011), nestes animais a ação de metais pesados no exoesqueleto causa danos ao DNA e compromete o desenvolvimento de embriões imaturos (BROTTO; FIRMINO, 2014).

A dispersão de metais pesados por gases tóxicos, descartados indevidamente, flutuam em áreas públicas como parques e praças, arriscando a saúde da população, e se estende para áreas não urbanizadas como rios, matas e campos, afetando a biologia destes locais. Um estudo recente realizado no município de Taubaté propôs que metais pesados como ferro, zinco, cromo e níquel (dentre outros) podem ser encontrados em áreas foliares de bromélias da espécie *Tillandsia recurvata* L. Neste estudo foram usados nove espécimes para análise (LEITE; ROSA; VASQUES, 2012).

O objetivo deste trabalho é identificar e semiquantificar a presença de metais pesados dispersos em asas de borboletas de *Hamadryas februa* por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura acoplada a Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (MEV-EDS).

Figura 1 - *Hamadryas februa* (HÜBNER, 1823), espécime de vida livre em um tronco da árvore.



Fonte: Os autores.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Área de Estudo

Para coleta de borboletas da espécie *Hamadryas februa*, três áreas foram selecionadas, sendo: (1) o Lago da Mata - fragmento de Mata Atlântica da Fazenda Santana do Poço (23°12'40"S e 45°57'35"W), (2) o Borboletário da UNIVAP (23°12'37.7"S e 45°57'56.1"W) e (3) os entornos do CEPLADE (23°12'31.6"S 45°57'05.6"W) (Figura 2).

Figura 2 - Mapa da UNIVAP e locais de coleta, (1) Vista parcial do Lago da Mata, (2) Vista do interior e exterior do Borboletário, (3) Vista externa do CEPLADE.



Fonte: Os autores.

### 2.2 Coleta e transporte

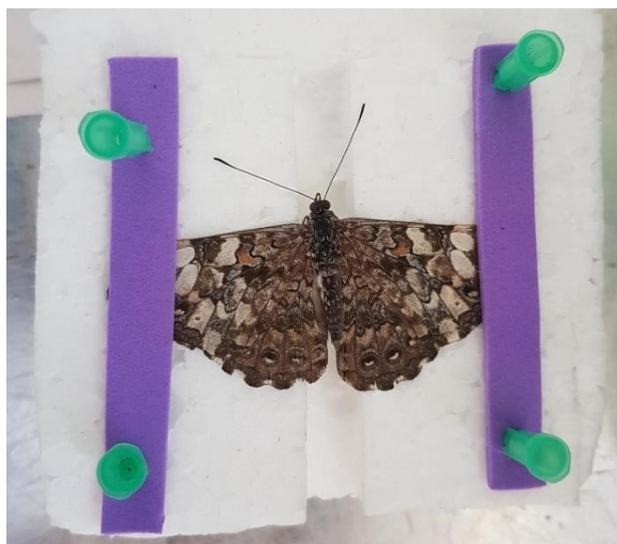
Os exemplares foram coletados no campus da UNIVAP, em três locais distintos: dois espécimes no Borboletário da UNIVAP; dois espécimes no interior de um fragmento de Mata Atlântica e um espécime no entorno do CEPLADE. As borboletas foram coletadas por meio de coleta ativa, utilizando rede entomológica e transportadas até o

laboratório do borboletário em envelopes entomológicos.

### 2.3 Extração da amostra

Os espécimes coletados foram mantidos em uma câmara de resfriamento por dois minutos e meio para que o metabolismo diminuísse, e fosse realizada a extração do fragmento da asa sem machucar ou agitar o espécime. Com uma tesoura esterilizada foi removido um setor circular de 1cm<sup>2</sup> de área da asa inferior direita visando a preservação do estado natural da asa.

Figura 3 - *Hamadryas februa* no suporte de isopor para extração do fragmento da asa.



Fonte: Os autores.

### 2.4 Preparação e análise da amostra

Os cinco fragmentos de tamanho aproximado de 1 cm<sup>2</sup> foram fixados em portas amostras (Figura 4), para a secagem, posteriormente montados em “stubs” e metalizados com ouro (Fig.5). Todas as amostras foram microfotografadas através do Microscópio Eletrônico de Varredura EVO MA10 ZEEIS acoplado com espectrômetro de energia dispersiva de raios-x (EDS) na Central Analítica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da UNIVAP. As análises para encontrar metais pesados nas escamas das asas compreenderam uma área essencialmente igual para todos os cinco fragmentos, representado pelo retângulo “Spectrum 1” da figura 6. Os metais pesados dos fragmentos foram identificados e semiquantificados utilizando o software INCA PONIT and ID.

Figura 4 - Fragmento de asa de *Hamadryas februa* fixado em porta amostra.



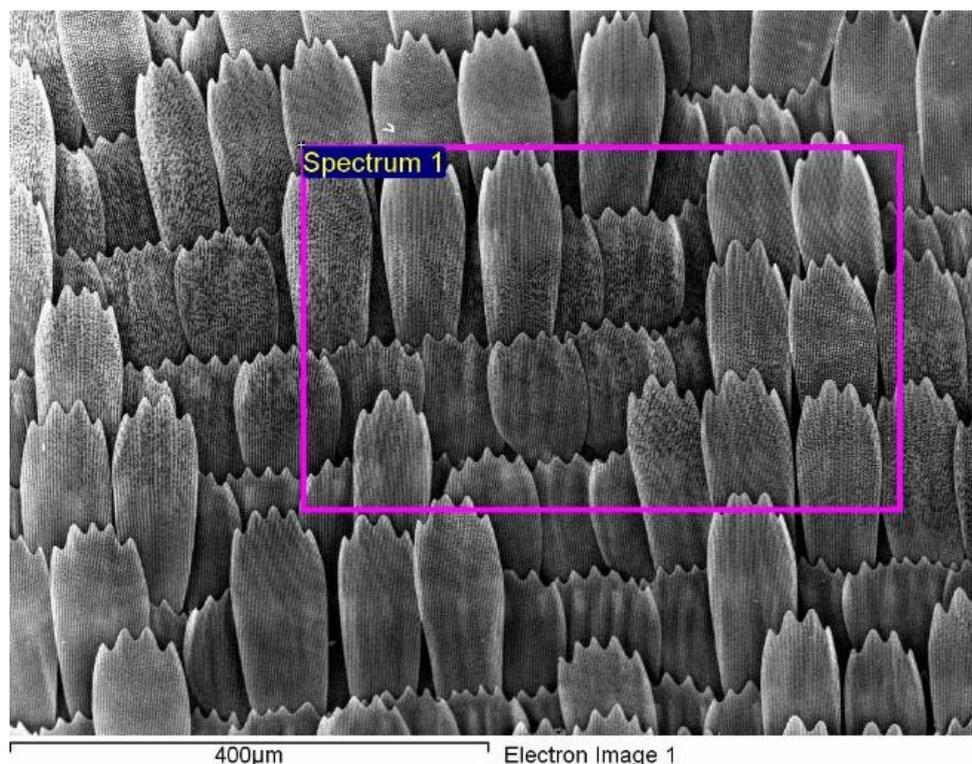
Fonte: Os autores.

Figura 5 - Vista interna do metalizador com suporte dos "Stubs" em que foram fixadas as amostras.



Fonte: Os autores.

Figura 6 - Área delimitada para análise de químicos metálicos.



Fonte: Os autores.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Ordem Lepidoptera

Borboletas e mariposas (Ordem Lepidoptera) são animais que fazem parte do cotidiano popular urbano, sendo possível encontrar populações em cidades, parques e campos. Estes insetos são caracterizados como visitantes florais por se alimentarem do néctar de flores e frutas em decomposição (em fase imago) ou das folhas (em fase larval) (ANTONINI *et al.*, 2005; CRANSTON; GULLAN, 2005; LEMES; MORAIS; RITTER, 2008). Sendo assim, é considerável, portanto, que lepidópteros podem ser usados como bioindicadores (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Estes animais possuem vasto alcance, sendo possível observar em algumas espécies o processo de migração, como por exemplo, a famosa borboleta monarca *Danaus plexippus* (LINNAEUS, 1758; URQUHART; URQUHART, 1978). Desta forma podem ser vítimas de dispersão de metais pesados de maneira involuntária.

O gênero *Hamadryas* contém um grupo de 20 espécies para a região Neotropical e são famosas por produzir sons de cliques altos durante o seu voo ou em perseguições aéreas (MARINI-FILHO; BENSON, 2010), fato este que atribuiu a estas o nome popular de borboletas estaladoras. A hipótese mais aceita é a de que este som é produzido com um conjunto de estruturas situadas no primeiro par de asas das borboletas deste gênero, o órgão de Vorgel, a membrana da célula costal e a base protuberante da veia

costal (NÁJERA; HERNÁNDEZ-CHAVARRIA, 1993).

### 3.2 Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um bioma único do Brasil, considerado um *hotspot*, que após 500 anos de exploração decaiu para restantes 8% de sua área original, além de perda massiva de espécies vegetais e animais em abundância e diversidade. Geralmente classificada como floresta ombrófila densa, semidecidual e estacional decidual, com temperatura média entre 22 e 25 graus Celsius. A poluição atmosférica tem intensificado o impacto ambiental em áreas de Mata Atlântica, evidenciando que mudanças atmosféricas são as novas ameaças que este Bioma enfrenta (COLOMBO; JOLY, 2010).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Considerando a relação da concentração total de cada elemento encontrado nas amostras, na tabela 1, os fragmentos 1 e 2 referem-se aos espécimes coletados no Borboletário da UNIVAP e apresentaram as maiores concentrações de Al, Fe, Zn e Br; o fragmento 3 que se refere ao espécime coletado no CEPLADE, apresentou a maior concentração de Cu e para os fragmentos 4 e 5 os espécimes coletados no Lago da Mata, apresentaram as maiores concentrações de Mn, Co, Ni, Hg e Pb.

Tabela 1 - Porcentagem da quantidade em peso dos metais em cada fragmento de asa.

	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3	Fragmento 4	Fragmento 5	TOTAL
Al K	48,84%	26,34%	19,33%	5,49%	0%	100%
Mn K	5,13%	36,54%	0%	58,33%	0%	100%
Fe K	22,35%	77,65%	0%	0%	0%	100%
Co K	2,36%	0%	0%	70,52%	27,12%	100%
Ni K	8,97%	0%	0%	91,03%	0%	100%
Cu K	5,26%	30,35%	38,93%	25,46%	0%	100%
Zn K	8,92%	49,32%	41,76%	0%	0%	100%
Br L	94,21%	0%	0%	0%	5,79%	100%
Hg M	5,78%	19,04%	19,59%	29,76%	25,84%	100%
Pb M	2,84%	21,17%	23,65%	22,36%	29,97%	100%

Fragmentos 1 e 2: Borboletário da UNIVAP.

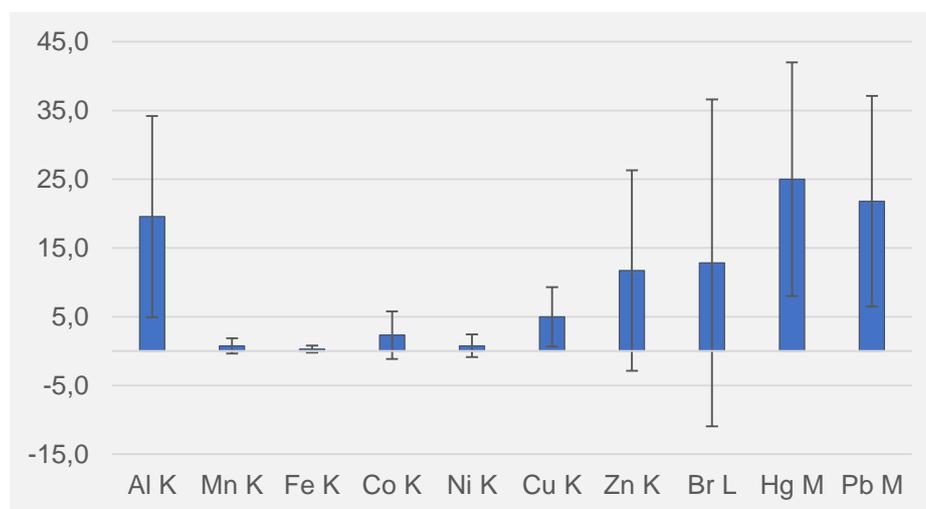
Fragmento 3: CEPLADE.

Fragmentos 4 e 5: Lago da Mata.

Fonte: Os autores.

Os metais encontrados foram quantificados com base na porcentagem atômica total dos mesmos em cada amostra, resultando no gráfico de porcentagem média (Gráfico 1): ferro (Fe) (0,28%), manganês (Mn) (0,74%), níquel (Ni) (0,77%), cobalto (Co) (2,32%), cobre (Cu) (4,96%), zinco (Zn) (11,71%), bromo (Br) (12,83%), alumínio (Al) (19,57%), chumbo (Pb) (21,79%) e mercúrio (Hg) (24,98%). Foi realizado teste t comparando cada porcentagem com o valor “zero”, adotado como padrão, Hg e Pb obtiveram diferença significativa.

Gráfico 1 - Porcentagem atômica média dos metais pesados para todos os fragmentos de asas (1 a 5).



Fonte: Os autores.

Besouros da família Carabidae, apresentam características de elevada acumulação e excreção de taxas de Cádmio e altos níveis de Pb distribuído em maior parcela no exoesqueleto (BUTOVSKY, 2011) e para o presente estudo foi encontrada, em média, baixa concentração de Fe e elevadas concentrações de Pb nos espécimes avaliados.

Um estudo sobre poluição em Himenópteros pertencentes a tribo Bombini revelou a diminuição da diversidade desta população, a redução da abundância e o aumento da mortalidade dos organismos frente à elevada contaminação do pólen por metais pesados, tanto em comunidades selvagens quanto em solitárias. Este estudo ainda aponta os metais pesados como principais motivadores para a perda de espécies de polinizadores (KOSIOR *et al.*, 2007), o que pode indicar a diminuição de abundância de *Hamadryas februa* em áreas mais próximas de ação antrópica.

Um estudo comparativo entre uma área com maior grau de poluição e outra com menor grau de poluição, constatou que as taxas de crescimento larval da espécie *Epirrita autumnata* (BORKHAUSEN, 1794) de diferentes ninhadas diferiram significativamente entre o local contaminado e local não contaminado (VAN OOIK; RANTALA; SALONIEMI, 2006). Comparando a área do Lago da Mata e o CEPLADE, é possível identificar diferenças nas concentrações percentuais de metais, sendo o Cu e o Zn os mais encontrados na área antropizada e as maiores concentrações de Hg e Pb em área com menor antropização.

Segundo Penha *et al.* (2014), corroborada por Santos *et al.* (2012), mercúrio e chumbo são metais considerados perigosos poluentes aquáticos, pela alta toxicidade destes, o que aponta um alarme para as concentrações elevadas de ambos os metais nas amostras coletadas de invertebrados Platelminetes.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo constatou a presença de elementos metálicos considerados pesados, acumulados em escamas de asas de borboletas da espécie *Hamadryas februa*. Segundo as análises semiquantitativas, as amostras apresentaram concentrações acentuadas de chumbo e mercúrio.

## 6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Me. Priscila M. Sarneiro Marciano Leite pelo auxílio no preparo das amostras do MEV na Central Analítica do IP&D e ao professor Dr. Paulo Roxo Barja pelo auxílio nas análises estatísticas. Além disso agradecemos ao editor e revisores anônimos por suas sugestões e revisões valiosas no manuscrito.

## REFERÊNCIAS

- ANTONINI, Y. *et al.* Diversidade e comportamento dos insetos visitantes florais de *Stachytarpheta Glabra* Cham. (Verbenaceae), em uma área de campo ferruginoso, Ouro Preto, MG, **Neotrop. Entomol.**, v. 34, n. 4, p. 555-564, 2005.
- BROTTO, D. de F.; FIRMINO, E. L. B. Insetos como bioindicadores e acumuladores de poluição por metais pesados. *In: ENCONTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO*, 5., 2014. **Anais...**, Dourados: Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2014, p. 1-12.
- BUTOVSKY, R. O., Heavy metals and Carabidae (Coleoptera, Carabidae). **Zookeys**, n. 100, p. 215-222, 2011.
- COLOMBO, A. F.; JOLY, C. A. Brazilian Atlantic Forest *latu sensu*: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot is highly threatened by climate change. **Braz. J. Biol.**, v. 70, n. 3, p. 697-708, 2010.
- CRANSTON, P. S.; GULLAN, P. J. **Os Insetos**: um resumo de entomologia, 3. ed. São Paulo: Roca, 2005.
- KOSIOR, A. *et al.* The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of Western and Central Europe. **Oryx**, 41, n. 1, p. 79-88. 2007.
- LEITE, P.; ROSA, A.; VASQUES, M. Quantificação de metais pesados em *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae) de diferentes áreas do município de Taubaté. *In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 16. 2012. **Anais...**, São José dos Campos: Univap, 2012.
- LEMES, R.; RITTER, C. D.; MORAIS, A. B. B. de. Borboletas (Lepidoptera: Hesperioidea e Papilionoidea) visitantes florais no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. **Biotemas**, v. 21, n. 4, 2008.
- MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G., **Biondicators and biomontiors**: trace Metals and other Contaminants in the Environment. Kidlington/UK: Elsevier. v. 6, 2003.

MARINI-FILHO, O. J.; BENSON, W. W., Use of sound and aerial chases in sexual recognition in Neotropical Hamadryas butterflies (Nymphalidae). **Rev. Journal of Research on the Lepidoptera**, n. 42, p. 5-12, 2010.

NÁJERA, J. M.; HERNÁNDEZ-CHAVARRIA, F. A morphological search for the sound mechanism of Hamadryas butterflies. **J. Res. Lepid.**, v. 30, n. 3-4, p. 196-208, 1993.

OLIVEIRA, M. A. *et al.* Bioindicadores ambientais: insetos como um instrumento desta avaliação, **Rev. Ceres**, v. 61, p. 800-807, 2014.

PENHA, B. R. *et al.* Avaliação dos efeitos da toxicidade em planárias limnáticas expostas a cádmio e cromo. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 20, 2014, p.13-21.

SANTOS, S. *et al.* Poluição Aquática. *In*: ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; MOSCHINI-CARLOS, V. (orgs.). **Meio Ambiente e Sustentabilidade**. Porto Alegre: Bookman, 2012.

URQUHART F. A.; URQUHART N. R., Autumnal migration routes of the eastern population of the monarch butterfly (*Danaus p. plexippus* L.; Danaidae; Lepidoptera) in North America to the overwintering site in the Neovolcanic Plateau of Mexico. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, n. 8, 1978.

VAN OOIK, T.; RANTALA, M.J.; SALONIEMI, I., Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in geometrid moth *Epirrita autumnata*. **Environmental Pollution**, 145, p. 348-354, 2006.

VIEIRA, N. Y. C. *et al.* Diversidade de insetos bioindicadores em área de cultivo de milho transgênico no município de Araçatuba, PR. *In*: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 7., 2011. **Anais...**, Maringá: Editora CESUMAR, 2011, 4 p.

YOUNG, A. M. On the biology of *Hamadryas februa* (Lepidoptera: Nymphalidae) in Guanacaste, Costa Rica. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v. 76., p. 380 - 393, 2009.