

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

QUEILA DAIANE FONSECA DO AMARAL

**ESTUDO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DO
MEXILHÃO DOURADO (*Limnoperna fortunei*) COMO
BIOINDICADOR DE GENOTOXICIDADE PARA
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMBIENTES
AQUÁTICOS CONTAMINADOS COM MERCÚRIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

URUGUAIANA
2017

QUEILA DAIANE FONSECA DO AMARAL

**ESTUDO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DO MEXILHÃO
DOURADO (*Limnoperna fortunei*) COMO BIOINDICADOR DE
GENOTOXICIDADE PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS COM MERCÚRIO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para o grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira

**URUGUAIANA
2017**

QUEILA DAIANE FONSECA DO AMARAL

**ESTUDO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DO MEXILHÃO DOURADO
(*Limnoperna fortunei*) COMO BIOINDICADOR DE GENOTOXICIDADE PARA
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS
COM MERCÚRIO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para o grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmácia

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: 17 de agosto de 2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira
Orientador
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Jacqueline da Costa Escobar Piccoli
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UNIPAMPA

Prof. Dr. Edward Frederico de Castro Pessano
Curso de Ciências da Natureza – UNIPAMPA

*Aos meus pais, José Francisco e Maria Cleni
por serem exemplos de humanidade e
humildade.*

*E ao meu esposo Alex, por todo amor,
parceria e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e por sempre me guiar e proteger em todos os caminhos.

Ao meu orientador, prof. Luís Flávio pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, compreensão e paciência. Uma pessoa de caráter admirável, exemplo de profissional e de pessoa a ser seguido. A minha gratidão e admiração!

Ao prof. Marcus Querol e ao Nupilabru pela parceria na realização deste trabalho, pelas contribuições e viabilização da parte experimental trabalho. O meu agradecimento especial!

Ao querido prof. Michel, pela ajuda, pela amizade, dicas e ensinamentos. Obrigada pelo apoio!

Ao prof. Bruno e Júlia por aceitarem o desafio de realizarem as análises histológicas.

À UNIPAMPA, pela oportunidade e aos professores do PPGCF, pelos ensinamentos, pelas experiências e tudo que de alguma forma contribuiu para minha formação.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular! Obrigada pelo auxílio nos experimentos, pela disponibilidade, pela amizade e parceria. A vocês minha gratidão!

A minha querida amiga Luísa o meu agradecimento especial. Sou muito grata, pela ajuda nos experimentos, pelo incentivo, pelas dicas, pelo apoio... Enfim, obrigada pela amizade e por ser esta pessoal tão especial que tenho o prazer de conviver.

Agradeço também aos colegas TAES em laboratório, Márcio e Tiago, pela ajuda, pelas dicas e pelo socorro sempre que precisei. Obrigada guris!

Aos colegas de trabalho, aos amigos de longe e de perto, obrigada pelo incentivo, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

A meus pais, José Francisco e Maria Cleni, a quem eu serei grata por tudo o que fizeram e fazem por mim! Por todo o apoio, carinho e amor, os quais são combustíveis indispensáveis em minha vida. Ao restante da minha família, minhas avós e irmã obrigada pelas orações, incentivo e torcida.

Ao meu esposo Alex, meu eterno namorado e parceiro de todas as horas, obrigada por me ajudar em todos os momentos, seja me ouvindo, incentivando ou me ajudando nas coletas e no manejo dos “mexilhões”. Esta conquista também é tua! Te amo!

À minha “filha” de quatro patas Bibi, por estar sempre aqui e me receber com toda sua alegria e, mesmo sem conseguir falar, expressando todo seu apoio e amor incondicional.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso estiver nos deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.”

Érico Veríssimo

RESUMO

O *Limnoperna fortunei* (mexilhão dourado) é um molusco bivalve de água doce, invasor e com falta de predadores naturais fazendo com que seja considerado um problema ambiental e econômico. Bivalves como o mexilhão dourado, podem ser considerados organismos potenciais para serem usados como bioindicadores, pois são ativos filtradores, estão imóveis, têm ampla distribuição geográfica e capacidade de acumular altas concentrações de contaminantes, inclusive metais pesados. Dessa forma, o presente estudo apresenta como principal contribuição a avaliação do potencial de uso do *Limnoperna fortunei* como bioindicador de genotoxicidade a metais pesados, mais especificamente ao HgCl_2 , em ambientes aquáticos, avaliando a resposta de exposição a diferentes concentrações de exposição subaguda e aguda ao metal. Grupos de 50 indivíduos expostos à água contaminada com HgCl_2 nas concentrações de 0,001 mg/L, 0,005 mg/L, 0,01 mg/L, 0,02 mg/L e 0,1 mg/L (sendo a concentração de 0,01 mg/L, considerada limite para água residual segundo CONAMA) e foram avaliados durante 7, 15 e 30 dias de exposição; ou após administração injetável (AI) para avaliação aguda no período de 2 horas. A matriz biológica utilizada nos ensaios foi a massa corporal do mexilhão como um todo. Os testes realizados foram ensaios de viabilidade celular, a fim de se avaliar o nível de citotoxicidade e da possibilidade de se seguir com teste genotóxico; teste do cometa alcalino; teste de micronúcleo e avaliação do número de células necróticas. As análises se deram em triplicada e os dados foram tratados pela ANOVA de uma via, complementada com teste de multicomparação de Tukey, aceitando como significativo, $p < 0,05$. Os resultados demonstraram que o mexilhão dourado oferece certa resistência ao dano citotóxico para a exposição subaguda, contudo, demonstrou ser sensível frente à exposição aguda (AI) em todas as concentrações testadas. O teste cometa revelou que a partir das análises do 15º dia começa se observar dano significativo em relação ao controle negativo na maior concentração testada, contudo, no 30º dia, as três maiores concentrações demonstraram causar danos significativos ao DNA. Na avaliação da exposição aguda, todas as concentrações testadas demonstraram ser capazes de induzir danos significativos às células do mexilhão, sendo, inclusive, superiores aos danos observados para o controle positivo. A contabilização de células com micronúcleo revelou que a exposição do mexilhão dourado às concentrações ensaiadas de HgCl_2 não foi capaz de induzir mutagênese. Por fim, a contabilização de células necróticas demonstrou que, em todas as concentrações testadas para a exposição subaguda, houve aumento de processo necrótico, sobretudo, de forma proeminente no grupo exposto à maior concentração. Já para a exposição aguda, apesar de também haver aumento de processo necrótico, não são observadas diferenças entre as quatro maiores concentrações testadas. Tomando os dados conjuntamente, é possível sugerirmos que o mexilhão dourado apresenta potencial para ser considerado como possível bioindicador de genotoxicidade para avaliação da qualidade de ambientes aquáticos, considerando o metal utilizado para os ensaios. Contudo, estudos complementares devem ser realizados para ampliar e confirmar o potencial encontrado no presente estudo, levando em consideração outros agentes toxicantes, reconhecidamente poluentes de corpos d'água.

Palavras-chave: Toxicologia genética, mutagenicidade, bioindicador, mexilhão dourado.

ABSTRACT

The *Limnoperna fortunei* (Golden mussel) is a bivalve freshwater mollusk, invasive and lacking natural predators, making it considered an environmental and economic problem. Bivalves such as the golden mussel can be considered as potential organisms to be used as bioindicators, because they are active filtering agents are immobile, have a wide geographic distribution and the capacity to accumulate high concentrations of contaminants, including heavy metals. That is why, the present study presents like main contribution the evaluation of the potential of use of *Limnoperna fortunei* as bioindicator of genotoxicity to heavy metals, more specifically to HgCl₂, in aquatic environments, evaluating the response of exposure to different concentrations of subacute and acute exposure to metal. Groups of 50 individuals exposed to water contaminated with HgCl₂ at concentration of 0.001 mg/L, 0.005 mg/L, 0.01 mg/L, 0.02 mg/L and 0.1 mg/L (being the concentration of 0.01 mg/L considered limit to residual water according CONAMA) and were evaluated during 7, 15 and 30 days of exposure; or after injectable administration (AI) for acute assessment within 2 hours. The biological matrix used in the trials was the body mass of the mussel as a whole. The tests carried out were cell viability assays, in the order to evaluate the level of cytotoxicity and possibility of following the genotoxic test; alkaline comet test; Micronucleus test and necrotic cell number evaluation. Analyzes were done in triplicate and the data were treated by one-way ANOVA, complemented with Tukey's multicomparison test, accepting as significant when $p < 0.05$. Results demonstrated that the golden mussel offers some resistance to cytotoxic damage by subacute exposure; however, it has been shown to be sensitive to forced exposure (AI) at all concentrations tested. The comet test revealed than from the analysis of the 15th day, significant damage was observed in relation to the negative control at the highest concentration tested, however, on 30th da, three highest concentrations showed significant DNA damage. In the evaluation of the forced exposure, all the concentrations tested were able to induce significant damages to the mussel cells, being even superior to the observed damages to the positive control. Counting of cells with micronucleus revealed exposure of the golden mussel to tested concentrations of HgCl₂ was not able to induce mutagenesis. Finally, necrotic cell counts showed that, in all concentrations tested for subacute exposure, necrotic process increased, especially in the group exposed to the highest concentration. For the acute exposure, although there is also an increase in the necrotic process, no differences were observed between the four higher concentrations tested. Taking the data together, it is possible to suggest that the golden mussel presents potential to be considered as possible genotoxicity bioindicator to evaluate the quality of aquatic environments, considering the metal used for the trials. However, complementary studies should be developed to amplify and confirm the potential found in the present study, taking into account other toxicants known to be pollutants of water bodies.

Key words: Genetic toxicology, mutagenicity, bioindicator, golden mussel.

LISTA DE FIGURAS:

Título	Pá g
FIGURA 1-Vista externa da concha do <i>L. Fortunei</i> com as variações de tamanho encontradas.....	20
FIGURA 2- Colônia de <i>L. Fortunei</i> aderida a um substrato natural- pedra.....	21
FIGURA 3-Vista esquemática dos principais órgãos do <i>Limnoperna fortunei</i>	22
FIGURA 4-Imagem aérea da Barragem Sanchuri, como a marcação do local da coleta.	30
FIGURA 5-Recipiente de transporte dos Mexilhões para o laboratório.....	31
FIGURA 6- Controle da qualidade da água, determinação dos parâmetros físico-químicos.....	33
FIGURA 7- Diferentes classes de dano celular detectados pelo ensaio cometa em células de <i>Limnoperna fortunei</i>	35
FIGURA 8- Viabilidade Celular em células de mexilhão dourado expostos a diferentes concentrações de HgCl ₂ . A, Início- 0 dia; B, 7 dias de tratamento; C, 15 dias de tratamento e D, 30 dias de tratamento.....	41
FIGURA 9- Viabilidade Celular em células de mexilhão dourado expostos sob injeção a diferentes concentrações de HgCl ₂ . A, Início- 0 dia; B, 7 dias de tratamento; C, 15 dias de tratamento; e D, 30 dias de tratamento.....	43
FIGURA 10-Índice de dano nuclear em células de mexilhão dourado expostos a diferentes concentrações de HgCl ₂ . A, Início- 0 dia; B, 7 dias de tratamento; C, 15 dias de tratamento; D, 30 dias de tratamento; e E, após exposição aguda aoHgCl ₂	46
.	
FIGURA 11- Frequência de Micronúcleos em células de mexilhão dourado expostos a diferentes concentrações de HgCl ₂ . A, Início- 0 dia; B, 7 dias de tratamento; C, 15 dias de tratamento; D, 30 dias de tratamento; e E, após exposição aguda aoHgCl ₂	49
.	
FIGURA 12-Células necróticas em mexilhão dourado expostos a diferentes concentrações de HgCl ₂ . A, 15 dias de tratamento; B, 30 dias de tratamento; e C, após exposição aguda aoHgCl ₂	51

LISTA DE TABELAS

Título	Pág
Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros físico-químicos de qualidade da água de exposição monitorados diariamente e semanalmente, durante os tratamentos.....	37
Tabela 2: Valores médios \pm desvio padrão do comprimento e do peso (com a concha e somente tecidos) dos exemplares de <i>L. fortunei</i> usados em cada tratamento (n= 15 indivíduos).....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AI- administração injetável
Ag- Prata
Al- Alumínio
ANOVA – análise de variância
As – arsênio
B- Boro
Ba- Bário
C- Célsius
Ca- Cálcio
Cd- Cádmio
cm- centímetro
CN – controle negativo
CP – controle positivo
Co- Cobalto
CONAMA- Conselho Nacional de Meio Ambiente
Cr- Cromo
CuSO₄- Sulfato de Cobre
DNA – ácido desoxirribonucleico
Fe- Ferro
g- gramas
Hg- Mercúrio
HgCl₂- Cloreto de Mercúrio
H₂O₂- peróxido de hidrogênio
IDN- índice de dano
Ind- indivíduo
Km- quilômetros
Kg – quilogramas
L- litro
Li- Lítio
L. fortunei- *Limnoperna forntunei*
M- Molar
mA- miliampere
MeHg- Metilmercúrio
Mg- Magnésio
mg- miligramas
min- minuto
mL- mililitros
mm- milímetro
Mn- Manganês
MN – micronúcleo
Mo- Molibdênio
MS- Ministério da Saúde
P- Fósforo
Pb- Chumbo
PBS- Tampão Fosfato

pH- Potencial hidrogeniônico

PVC- Policloreto de Vinila

S- Enxofre

Sb – antimônio

Ti- Titânio

V- Vanádio

VPM- Valor máximo permitido

WTD- Quadro de ação comunitária no domínio da água - Diretiva da União Europeia.

Zn- Zinco

µg – microgramas

µL – microlitro

SUMÁRIO

Título	Pág
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVOS GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 MEXILHÃO DOURADO (<i>Limnoperna fortunei</i>)	20
3.2 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL	23
3.3 AGENTES TÓXICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS- METAIS PESADOS.....	25
3.4 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE.....	27
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO	30
4.2 PRIMEIRO TRATAMENTO - EXPOSIÇÃO SUBAGUDA AO HgCl ₂	31
4.3 SEGUNDO TRATAMENTO - EXPOSIÇÃO AGUDA AO HgCl ₂	32
4.4 MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA DE EXPOSIÇÃO.....	33
4.5 ANÁLISE DE PARÂMETROS CITOTÓXICOS, MUTAGÊNICOS E GENOTÓXICOS.....	33
4.6.1 Viabilidade celular.....	33
4.6.2 Teste de Micronúcleos.....	34
4.6.3 Teste cometa	34
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	36
5.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	36
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS	39
5.3 CITOTOXICIDADE	41
5.4 GENOTOXIDADE	45
5.5 MUTAGENICIDADE.....	48
6 CONCLUSÕES.....	53
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

O mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (DUNKER, 1857), é um molusco bivalve de água doce, nativo do sudeste da Ásia. Na década de 1960 foi implantado um projeto de captação de águas entre bacias que tinha como objetivo resolver os problemas de distribuição de recursos hídricos e escassez de água na China. A implantação deste projeto teve como consequência diversos danos ambientais e econômicos, uma delas foi à transferência e disseminação descontrolada de *L. fortunei* entre as bacias hidrográficas. (BARBOSA et al., 2016; XU et al., 2015). Nesta mesma década, esse molusco foi identificado em Hong Kong e na Coreia, e em Taiwan em meados de 1980; já na América do Sul, foi identificado na década de 1990 (BOLTOVSKOY & CORREA, 2015), de onde expandiu sua distribuição rapidamente para a bacia do Rio Paraná, ocupando os grandes rios a uma velocidade de cerca 240 km/ano, o que tem favorecido seu alastramento pelas bacias hidrográficas do Brasil, da Argentina e do Paraguai (BORGES, 2014).

Os mexilhões podem se adaptar e estabelecer densas populações até mesmo em ambientes caracterizados por baixo oxigênio dissolvido, alta velocidade de fluxo e até mesmo alta densidade de poluentes. O *L. fortunei* se adere a substratos naturais ou artificiais se fixando pelos fios do bisso e forma aglomerações consideráveis, as quais podem interferir no equilíbrio físico-químico da água, removendo grande quantidade de partículas da zona fótica e das populações planctônicas, como também a degradação da qualidade da água através do desenvolvimento de fungos nos indivíduos mortos (SANTOS, 2005).

Essa espécie de molusco pode alterar tanto a estrutura quanto a função de ecossistemas, causando um desequilíbrio ecológico (XU et al., 2015), matando espécies locais ou se vinculando a elas, mudando os hábitos alimentares de peixes e alterando a composição de macroinvertebrados (MONTRESOR et al., 2013).

O *L. fortunei*, devido suas características peculiares, tais como viver em habitat único, possuir elevada capacidade de adaptação e reprodução, consegue se estabelecer em comunidades e interferir em diferentes ecossistemas, o que coloca em risco a saúde e equilíbrio dos mesmos, bem como depõe contrariamente à cadeia produtiva relacionada a alimentos (MORTON, 2015).

Inúmeras tentativas para controle das infestações de mexilhões têm sido estudadas e aplicadas, porém não têm sido efetivas, não permitindo o consenso de uma abordagem considerada como efetiva para controlar a propagação de bivalves invasivos. A dificuldade de controle é tão preocupante que nem mesmo o cloro, usado em instalações industriais para matar larvas bivalves, se mostra ineficiente, além de gerar consequências nocivas ao meio ambiente (ULIANO-SILVA et al., 2014).

Por outro lado, a utilização de seres vivos para o monitoramento da qualidade de ambientes permite mostrar a possibilidade de um determinado xenobionte apresentar toxicidade a indivíduos ou ao ambiente como um todo. Os bioindicadores ou organismos sentinela são seres vivos que respondem a estímulos específicos para diagnosticar o impacto ao meio ambiente, indicando o grau de perigo e dando suporte às determinações dos riscos ecológicos. Esses organismos podem ser usados de duas formas: de uma forma passiva, quando são avaliados os seres que habitam na área de estudo; ou de uma forma ativa, quando se expõe espécies previamente preparadas no ambiente (PAZ et al., 2013).

Moluscos bivalves servem como um modelo para o monitoramento da poluição em ambientes aquáticos. Esses animais se destacam por apresentarem ampla distribuição geográfica e ciclo de vida predominantemente sésil, além de serem filtradores ativos, podendo capturar partículas em suspensão e acumular compostos em seus tecidos, atuando, assim, como organismos biomonitoradores (ROCHA et al., 2015). A participação dos bivalves na transferência de poluentes ambientais aos mais altos níveis tróficos é devida principalmente à sua capacidade em acumular compostos tóxicos (BOLOGNESI & FENECH, 2012).

A contaminação ambiental por agentes agudamente tóxicos pode ser detectada rapidamente devido ao seu efeito imediato, tornando mais fácil a identificação da fonte emissora e, por consequência, o seu controle. Já as substâncias tóxicas que atuam de forma crônica produzem danos em longo prazo, impactando na vida dos organismos, causando alterações na reprodução ou modificando o patrimônio genético (VILLELA et al, 2006, BRITO & DA LUZ, 2015).

De acordo com Villela et al. (2006), alterações no genoma celular, induzidas por agentes genotóxicos, podem levar a mutações e formações de tumores. Estes agentes são de difícil detecção por estudos epidemiológicos, pois seus efeitos são lentos de serem identificados, devendo ser continuamente monitorados. Vários compostos e elementos químicos, como os metais pesados, são encontrados nos ecossistemas aquáticos e podem acumular e biomagnificar nos organismos. Muitos metais são considerados agentes citotóxicos e genotóxicos (incluindo os efeitos mutagênicos), causando danos permanentes em longo prazo nos organismos aquáticos (ROCHA & ROCHA, 2016).

Em estudo realizado por Marengoni et al. (2013), foi avaliada a bioacumulação de metais pesados usando o *L. fortunei* como bioindicador em uma área aquícola da usina hidrelétrica de Itaipu Binacional no Paraná. Foram encontrados níveis elevados de alguns metais como Cádmio, Chumbo e Cromo nos tecidos do mexilhão, mostrando que há um expressivo potencial poluente podendo bioacumular através da cadeia trófica. Os resultados obtidos comprovam que moluscos são capazes de remover agentes tóxicos, como metais pesados, agroquímicos e toxinas presentes em ambientes aquáticos e bioacumular em seus tecidos causando lesões reversíveis ou irreversíveis (LI & GAO, 2014).

Atividades antropológicas aliadas ao crescimento da população mundial e a intensificação da aquicultura tem causado um aumento nos níveis de poluição ambiental, causando sérios problemas para a vida humana e animal, bem como para o meio ambiente. O monitoramento da concentração de metais em ambientes aquáticos por meio de organismos vivos tem sido alvo de estudo nos últimos anos, uma vez que as atividades antropológicas são fatores de influência ambiental e sobre comunidades bióticas dependentes da qualidade da água. Neste sentido, o *L. fortunei*, que é um molusco filtrador, surge como proposta de modelo de bioindicador para avaliação da qualidade de águas contaminadas por resíduos antropogênicos, como os metais pesados.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como finalidade avaliar o potencial uso do *L. fortunei* como bioindicador de genotoxicidade para avaliação da qualidade de ambientes aquáticos frente a diferentes concentrações de exposição ao cloreto de mercúrio (HgCl_2).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

Investigar o uso potencial do mexilhão dourado (*L. fortunei*) como bioindicador de genotoxicidade para avaliação da qualidade de ambientes aquáticos expostos ao mercúrio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito citotóxico em tecidos de *L. fortunei* expostos de forma subaguda e aguda a diferentes concentrações de cloreto mercúrio;

Avaliar o efeito genotóxico em tecidos de *L. fortunei* expostos de forma subaguda e aguda a diferentes concentrações de cloreto mercúrio;

Avaliar o efeito mutagênico em tecidos de *L. fortunei* expostos de forma subaguda e aguda a diferentes concentrações de cloreto mercúrio;

Investigar se os efeitos observados sobre o *L. fortunei* após exposição subaguda e aguda ao cloreto de mercúrio são concentração dependente.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MEXILHÃO DOURADO (*Limnoperna fortunei*)

O *L. fortunei* (Dunker 1857), conhecido popularmente como mexilhão dourado, é um molusco bivalve nativo de águas do estuário da China e sudeste da Ásia. A distribuição geográfica desse molusco se restringia a esses locais, porém, no início da década de 1990 foi identificada a presença de indivíduos no Japão e na América do Sul. Na América do Sul, os primeiros registros de sua presença foram no Estuário de La Plata na Argentina, sendo reportados como uma espécie invasora e, desde então, ele vem se espalhando pelas bacias do Rio da Prata, do Rio Paraná e Rio Uruguai (MOLINA et al., 2010).

De acordo com Rückert et al. (2004), o seu ingresso na América do Sul ocorreu principalmente em descargas de águas de lastro de navios transoceânicos vindos da Coreia e de Hong Kong. Acredita-se que essas águas possuíam altas concentrações de moluscos nas formas larval e adulta jovem que colonizaram e multiplicaram devida sua fácil adaptação. Alguns pesquisadores reportam que os primeiros registros da presença do molusco no Brasil aconteceram no ano de 1999 na Bacia do Rio Guaíba, no Rio Grande do Sul. Nos anos seguintes, sua ocorrência se estendeu pela Lagoa dos Patos e sul do Rio Grande do Sul. Já na região da Fronteira Oeste do Estado, os registros iniciais ocorreram no ano de 2008, na região do médio Uruguai, no Município de Quaraí (LIMA et al., 2008).

Atualmente, o mexilhão dourado já infestou o segundo maior reservatório hidrelétrico do mundo, o complexo de Itaipu, na bacia do Rio Paraná causando perdas econômicas e ecológicas. Existe uma grande preocupação com a chegada desses animais na Amazônia, o que representaria um grande impacto na biodiversidade de suas comunidades aquáticas, gerando várias ações para controle da expansão de suas populações nas áreas adjacentes (CALAZANS et al., 2013).

Em recente estudo realizado por Querol et al. (2013) na Bacia do Rio Uruguai, na região de Uruguiana, foi identificada a existência de uma adaptação reprodutiva de *L. fortunei*, indicando que esta espécie está plenamente adaptada na Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul. Também foi sugerido por esse estudo que a migração do molusco é intensificada pelo fluxo de embarcações pesqueiras que realizam o percurso entre os municípios situados às margens dos Rios Uruguai e Rio Quaraí.

O mexilhão dourado é um bivalve pequeno (entre 2 e 3 cm) de coloração amarelada de onde deriva seu nome comum “dourado”, pertencente à família *Mytilidae*, do gênero *Limnoperna*, onde “*Limno*” significa água e “*perna*”, mexilhão (Figura 1). Tem formato triangular com base alongada, a margem anterior é arredondada e baixa com umbos (protuberância dorsal em cada valva). A forma da concha lembra mexilhões marinhos de diferentes tamanhos e, apesar de ter aparência lisa, possui linhas débeis de crescimento que acompanham as bordas. Tem preferência por ambientes lóticos e bem oxigenados, apresenta comportamento invasivo e é transformador do meio ambiente alterando a composição dos bentos e paisagem ribeirinha (MANSUR, 2012).



FIGURA 1- Vista externa da concha do *L. Fortunei* com as variações de tamanho encontradas. Fonte: Próprio autor (2017)

O *L. fortunei* faz parte das espécies invasivas conhecidas, tem dispersão através de larva planctônica, são dioicos e tem capacidade de adesão em substratos duros, como troncos e pedras (Figura 2), através da formação de fios fortes e resistentes pelo bisso. Tem comportamento gregário com crescimento rápido, alcançando altas densidades de suas populações. Ainda, o mexilhão dourado pode se aderir em outros bivalves nativos se fixando pela região posterior, impedindo a inalação; em gastrópodes, fechando o opérculo e os tornando vulneráveis e, em crustáceos, prejudicando ou os levando à morte, interferindo, assim, na biodiversidade aquática. Além destes impactos que causam na biota, eles também são causadores de diversos impactos econômicos através da formação de aglomerações obstruindo encanamentos, reduzindo o diâmetro de tubulações, causando o entupimento dos filtros, bombas, grades, trocadores de calor, principalmente em usinas de energia e estações de tratamento de água (MANSUR, 2012).



FIGURA 2- Colônia de *L. Fortunei* aderida a um substrato natural–Seixo Rochoso. Fonte: Próprio autor (2017).

Morfologicamente, o corpo do mexilhão é revestido pelo manto e vários músculos. Na parte interna do manto existe uma massa visceral que envolve os músculos e órgãos responsáveis pela circulação, reprodução, digestão e filtração (Figura 3). Possuem brânquias que funcionam como órgão de captação e seleção de alimentos, além das trocas gasosas, que é a sua função principal. O canal alimentar desses animais possui um esôfago achatado que se abre em um estômago complexo. O intestino é associado ao saco do estilete e separado apenas pelas duas tiflosoles, dobras que se prolongam para dentro do estômago onde nascem as aberturas para os divertículos digestivos. O coração é composto por um ventrículo único situado dentro da cavidade pericárdica que constitui o espaço do cefaloma que nos bivalves é muito reduzido. O sistema excretor é formado por dois nefrídios alongados situados na massa visceral, acima da base dorsal das brânquias e está associado à glândula pericárdica (MANSUR, 2012).

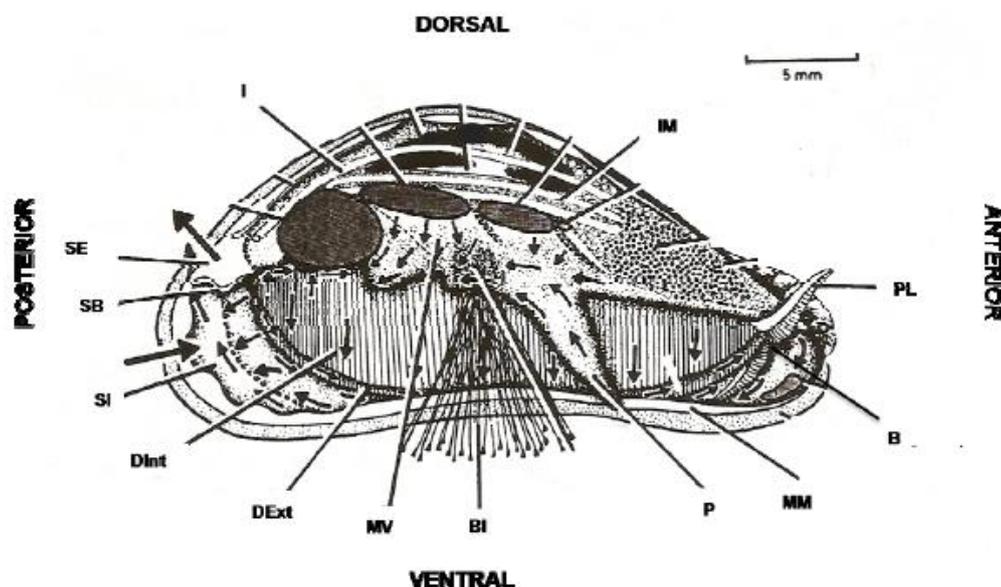


FIGURA 3- Vista esquemática dos principais órgãos do *Limnoperna fortunei*. SE- sifão exalante; SB- septo branquial; SI- sifão inalante; DInt- demibrânquia interna; DExt- demibrânquia externa; MV- massa visceral; BI- bisso; P- pé; MM- margem do manto; B- boca; PL- palpo labial; IM- intestino médio; I- intestino. Fonte: GAZULHA, V., 2010.

O pé dos bivalves possui grande importância no processo de locomoção ativa e fixação temporária, estando presente desde a fase larval como sua primeira estrutura de aderência aos substratos. Também está ligado diretamente à produção do bisso, que é essencial para a manutenção do estilo de vida epifaunal. O bisso consiste em complexo proteínaceo extracelular que ajuda os mexilhões na adesão permanente subaquática. É composto por uma raiz ligada ao tecido, uma haste que emerge a partir dele e placas adesivas nas extremidades. Estudos sugerem que a superfície do pé do mexilhão dourado esteja ligada com sua locomoção no meio aquático, adesão temporária e na produção do bisso, sendo de grande importância para exploração e seleção do local de fixação, característica esta que pode ser intensificada pelo seu comportamento gregário (ANDRADE et al., 2015).

Como mencionado anteriormente, o mexilhão é dioico, apresenta sexos separados. Machos e fêmeas estão separados em iguais proporções, apesar de poder ocorrer casos raros de hermafroditismo (MANSUR, 2012). A reprodução do mexilhão dourado acontece com frequência e as estações reprodutivas duram longos períodos, se estendendo de março até novembro na América do Sul. Tais características possibilitam a disponibilidade desse organismo em praticamente todas as épocas do ano (XU et al., 2015).

De acordo com Girardello et al. (2016), o mexilhão dourado se alimenta através de processo de filtração planctônica que permite retirar substâncias químicas de suspensões aquosas e acumular em seus tecidos. Possuem taxas de filtração que variam de 125 a 359 mL/ind/h, sendo esta uma das mais altas taxas entre os bivalves filtradores. O mexilhão direciona as partículas filtradas em correntes de aceitação ou de rejeição. As aceitas são ingeridas e transportadas pelo sistema digestivo e absorvidas no estômago, podendo ser armazenadas ou transferidas para o sangue (hemolinfa). As rejeitadas são ingeridas e eliminadas na forma de pseudofeces.

O mexilhão dourado tem grande tolerância a uma larga faixa de condições ambientais, como temperatura elevada, altos níveis de poluição, pH baixo, cálcio e oxigênio dissolvido. Esta tolerância tem sido associada à invasividade (SYLVESTER et al., 2013). Sendo assim, o é considerado um invasor bem-sucedido devido a sua fácil adaptação em diferentes ambientes aquáticos e uma taxa de crescimento rápida, alta capacidade de reprodução, além da grande tolerância fisiológica a diversos fatores abióticos (OLIVEIRA et al., 2011). Essas características, aliadas à ausência de predadores naturais, fazem com que esta espécie se reproduza desordenadamente, formando aglomerações que causam impactos ambientais e econômicos (LIMA et al, 2008).

3.2 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL

É bem sabido que diversas substâncias tóxicas, como metais pesados, agroquímicos e toxinas, são lançadas no ambiente aquático, muitas das quais são capazes de interagir com organismos vivos causando danos e/ou bioacumulando na cadeia trófica, podendo trazer graves consequências ao ecossistema e às próximas gerações. Organismos sentinelas, bioindicadores ou biomonitores são organismos capazes de indicar, através de análise de sua saúde, a saúde do ambiente em que vivem (BRITO & DA LUZ, 2015). Esses bioindicadores têm sido usados com a finalidade de alertar à sociedade quanto ao risco de exposição a determinados ambientes.

O monitoramento da toxicidade do ambiente deve ser contínuo, porém, muitas vezes é difícil estabelecer uma ligação entre os efeitos ecológicos da poluição com os efeitos nos seres humanos. Neste sentido, os bioindicadores agem demonstrando precocemente o *stress* ambiental sendo muitas vezes capazes de ser possível detectar alterações da qualidade do ambiente através das alterações ao nível celular desses organismos. Dependendo do nível trófico que se enquadram, podem bioacumular xenobióticos, fornecendo uma informação inicial do impacto e seus efeitos sobre organismos e reprodução (BRITO & DA LUZ, 2015).

A elucidação dos efeitos adversos de poluentes ambientais nos diferentes níveis dos sistemas biológicos e o conhecimento do modo de ação de agentes toxicantes que alteram equilíbrio da biota fazem parte da ecotoxicologia aquática. Alguns métodos ecotóxicológicos, se usados isoladamente para avaliação do estresse em organismos sentinelas, podem fornecer dados incompletos dos efeitos biológicos após a exposição estressante. Por tanto, é necessária uma avaliação simultânea e empregando um conjunto de técnicas, buscando refletir as características reais em que os indivíduos estão expostos (CAPPELLO et al., 2016).

De acordo com Rocha & Rocha (2016), o uso de biomarcadores para medir respostas biológicas em organismos expostos é muito útil para simplificar e reduzir os custos de monitoramento, em especial em ambientes aquáticos. Deste modo, surge a necessidade do desenvolvimento e padronização de testes de biomarcação *in situ*, aos quais, a fim de se fazer uma avaliação eficiente do potencial tóxico dos xenobiontes que se encontram no ambiente aquático, além das análises físico-químicas, deve ser considerado realizar ensaios de genotoxicidade, incluindo os mutagênicos.

O estudo de efeitos genotóxicos de determinados contaminantes isoladamente ou associados pode ser realizado através de diferentes métodos de avaliação. Contudo, se deve ter o cuidado para que os resultados encontrados não sejam assumidos como realidade última do ambiente aquático em questão, mas como importante parâmetro balizador da compreensão da qualidade do ambiente (ROCHA & ROCHA, 2016).

Segundo Pereira (2012), bivalves podem ser usados como bioindicadores de qualidade ambiental devido sua capacidade de bioacumulação de elementos traços em ecossistemas aquáticos. A caracterização deste bioindicador em diferentes locais pode fornecer dados sobre o estado de poluição da região e melhor compreensão dos mecanismos de resposta que tais organismos usam contra os poluentes. Alguns estudos sugerem que moluscos são capazes de remover substâncias tóxicas como metais pesados, agroquímicos e toxinas presentes na água e bioacumular em seus tecidos causando deterioração letal ou subletal (MAREGONI et al, 2013).

O mexilhão dourado é considerado um bom candidato como bioindicador ambiental devido à sua excelente adaptação, metabolismo complexo (o qual combina maturidade sexual precoce ao alto índice de fecundidade e elevada tolerância ambiental), ampla distribuição e disponibilidade em diferentes épocas do ano, associado, ainda à relativa facilidade de coleta (VILLELA et al., 2006; ROMBALDI et al., 2015).

3.3 AGENTES TÓXICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS- METAIS PESADOS

Um grande número de compostos e elementos químicos, como metais pesados, produtos petrolíferos, pesticidas clorados, hidrocarbonetos aromáticos halogenados e outras substâncias tóxicas, têm potencial capacidade causar efeitos danosos em organismos aquáticos. Muitos desses contaminantes ou seus metabólitos ativos apresentam sua toxicodinâmica através de mecanismos que corroboram para o aparecimento de efeitos genotóxicos, podendo conduzir, simultaneamente, à carcinogênese, mutagênese, embrotoxicidade e teratogênese, especialmente quando estiver presente a exposição de longo prazo (ROCHA & ROCHA, 2016).

Os metais pesados, como mercúrio, cobalto, níquel e chumbo são importantes poluentes aquáticos devido ao seu potencial tóxico e bioacumulativo em diferentes espécies do ecossistema aquático. Entre os metais, o mercúrio representa uma ameaça para a saúde dos organismos aquáticos tanto fisiologicamente quanto bioquimicamente (PEREIRA et al., 2012; RAMOS, 2016).

Quanto ao uso de tecidos para análises de contaminantes, os moluscos bivalves possuem algumas vantagens, pois conseguem revelar uma maior variabilidade de metais, uma vez que podem retê-los ao longo da vida e, mesmo após a morte, é possível utilizar homogenatos teciduais para análises qualitativas e quantitativas. É importante apontar que a análise da composição química de tecidos moles do mexilhão representa um indicador de condições ambientais, já a composição da sua concha indica as condições de nascimento até o momento em que a amostra foi coletada (POURANG et al., 2013). Corroborando com essa questão, Pereira et al. (2012) identificaram a presença de 24 elementos traço em *L. fortunei* (Ag, Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mg, Mn, Mo, P, Pb, S, Sn, Sr, Ti, V e Zn), os quais foram determinados nos tecidos enquanto que na concha foram encontrados os mesmos elementos, exceto Ag e Hg, confirmando seu potencial como biomarcador.

Devido à frequente presença de metais e elementos traços em mananciais de abastecimento de água e a possibilidade de lançamento de efluentes nestes mesmos mananciais, a Portaria do MS 2914/2011 estabeleceu o valor máximo permitido (VPM) para elementos químicos em água para consumo humano; e a Resolução do CONAMA 430/2011 estabelece o VPM para contaminantes em lançamentos de efluentes. Essas resoluções estabelecem a concentração máxima de mercúrio de 0,001 mg/L em água para consumo humano e 0,01 mg/L em água residuais.

Em virtude de sua persistência no meio ambiente e alto potencial de toxicidade, o mercúrio é um dos metais pesados considerado mais perigosos para contaminação de ambientes aquáticos com alcance às saúdes humana e animal pelo consumo ou pelo contato com a água destes ambientes. Em consequência disso, a União Europeia classificou o mercúrio como uma das substâncias prioritárias na WTD (*Water Framework Directive*), legislação que estabelece um plano de ação para proteção das águas superficiais e subterrâneas. Essa classificação também foi adotada pela legislação italiana sobre qualidade da água do ecossistema de água doce (DI DONATO et al., 2016).

O mercúrio residual de ambientes aquáticos é originário, principalmente, de processos naturais, como atividade vulcânica, podendo ser encontrado naturalmente em águas superficiais e subterrâneas em concentrações inferiores a 5 µg/L, e também através de atividades antropológicas, como consequência da poluição ambiental e do uso indiscriminado de agroquímicos. Este metal é convertido em três formas primárias: mercúrio elementar, sais inorgânicos e mercúrio orgânico, sendo este último o de grande preocupação quanto a toxicidade ambiental (RAMOS, 2016).

Conforme Sarker et al. (2016), os danos causados pelo mercúrio no ambiente aquático sugerem que o fitoplâncton está diretamente suscetível à sua contaminação. Como o fitoplâncton constitui a base da cadeia trófica ea principal fonte de alimento para outros organismos, como zooplâncton, moluscos aquáticos e peixes, qualquer alteração negativa na qualidade da água pode afetar os níveis tróficos mais elevados.

A toxicidade genética dos compostos de mercúrio ainda é pouco estudada e de acordo Nersesyan et al. (2016), este metal pode estar envolvido em três processos que geram genotoxicidade. O primeiro deles é a geração de radicais livres e estresse oxidativo, pois os compostos de mercúrio podem induzir danos ao DNA e danos celulares; O segundo é a sua ação sobre os microtúbulos do processo mitótico, uma vez que as principais proteínas que os constituem são alvos preferenciais para o mercúrio, levando a redução na divisão celular e endorreduplicação; E o terceiro é sua influência nos mecanismos de reparo do DNA, onde a exposição ao metal, mesmo em baixas concentrações, pode interferir no mecanismo de reparação da excisão da base, mas não nos mecanismos da excisão de nucleotídeos.

O potencial genotóxico das espécies de mercúrio pode variar consideravelmente. Em alguns estudos foi observado que o mercúrio orgânico (MeHg) tem maior efeito tóxico se comparado ao mercúrio inorgânico, isso pode ser explicado pelo fato que o MeHg possui melhor permeabilidade à membrana celular, sendo absorvido mais facilmente (NERSESYAN et al., 2016).

Nos ecossistemas aquáticos, o principal problema toxicológico causado por mercúrio é a exposição da biota ao MeHg, um composto tóxico que bioacumula facilmente. Atualmente, existem estudos sobre a toxicidade do mercúrio, a partir do MeHg, em diversos organismos aquáticos, especialmente peixes e bactérias. Porém, os estudos sobre os efeitos toxicológicos do Hg inorgânico sob condições reais de exposição ainda são escassos (BHOWMIK & PATRA, 2015).

3.4 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

A ecogenotoxicologia usa os princípios e técnicas da toxicologia genética para avaliar os efeitos potenciais da poluição ambiental e a forma que agentes genotóxicos atuam na saúde do ecossistema (HUSSAIN et al., 2017). Um dos interesses na ecotoxicologia é que mutações e tumores podem ser causados por agentes tóxicos presentes nos ambientes, os quais podem

induzir lesões por exposição isolada ou por uma mistura complexa de poluente, especialmente se observada uma perspectiva de cronicidade de exposição (FRENZILLI et al., 2009).

Alguns mecanismos de proteção celular frente à exposição à xenobiontes podem reverter danos, porém, respeitam um limite de capacidade de correção. Quando se exacerba tal limite, ocorrem danos permanentes, que, dependendo do tipo de célula atingida, podem gerar alterações que serão transmitidas às próximas gerações (BRITO & LUZ, 2015).

Testes como o ensaio cometa, o qual detecta o dano primário ao DNA, e teste de Micronúcleos (MN), que avalia indiretamente quebras cromossômicas e disfunções da mitose, são amplamente utilizados para detectar danos em moluscos bioindicadores de ambientes aquáticos. Villela et al. (2006) realizaram um estudo a fim de padronizar as metodologias de ensaio cometa e teste de micronúcleo para o molusco *L. fortunei*, avaliando seu potencial como bioindicador de ambientes aquáticos. Uma exposição de amostra ambiental do molusco confirmou sua sensibilidade de contaminantes da água, como o cobre e pentaclorofenol, detectado tanto pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo. Foi verificada toxicidade do CuSO_4 em concentrações acima de 3×10^{-5} M e dano máximo de pentaclorofenol em indivíduos expostos a 150 $\mu\text{g/L}$.

Uma forma simples e relativamente de fácil execução para avaliar o dano cromossômico *in vitro* é a utilização do ensaio de MN. A formação de MN indica o dano no DNA cromossômico resultante da ruptura ou erros no processo de segregação cromossômica. Diversos estudos usando células de bivalves mostraram um aumento na frequência de MN após a exposição a poluentes. Para realização destes testes existem na literatura pelo menos dois protocolos distintos, um fazendo o uso de hemócitos e o outro fazendo o uso de células branquiais (ROCHA & ROCHA, 2016).

O primeiro protocolo faz uso de hemócitos a partir da hemolinfa retirada do músculo adutor posterior dos bivalves. A hemolinfa é colocada em solução salina e a suspensão é espalhada sobre as lâminas para serem coradas posteriormente. No segundo protocolo, se faz o uso de células branquiais, que são removidas dos arcos branquiais após a dissecação dos bivalves. As células são colocadas em solução de ácido acético e etanol ou ácido acético e metanol e a suspensão celular produzida é colocada sobre as lâminas que, por fim, serão coradas (ROCHA & ROCHA, 2016).

O ensaio de MN aplicado em estudos usando hemócitos e células branquiais de bivalves, principalmente do gênero *Mytillus*, inclui também a marcação de diferentes tipos de células, incluindo células necróticas, apoptóticas e outras anomalias nucleares (BOLOGNESI & FENECH, 2012). Todavia, tais estudos não levaram em consideração a possibilidade de bioacumulação nos outros tecidos dos bivalves, de modo especial o tecido muscular e excretório.

Para identificar a presença de agentes mutagênicos e genotóxicos no ambiente aquático, ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade precisam ser usados de forma aliada à análise química. Esses ensaios permitem o estudo dos efeitos tóxicos de certos contaminantes isolados ou associados, reduzindo a influência de variáveis ambientais. No entanto, os resultados não podem ser transferidos de forma direta para o meio ambiente, precisam de uma leitura interpretativa de inter-relações entre variáveis e parâmetros avaliados. De qualquer modo, corroboram para a construção de conhecimento para ajudar a entender com os fatores interferem na saúde dos organismos do meio ambiente (ROCHA & ROCHA, 2016).

Dentro deste contexto, o presente estudo se propôs avaliar o potencial do *L. fortunei* como bioindicador de genotoxicidade para ambientes aquáticos frente à exposição a diferentes concentrações de HgCl_2 , através das análises de parâmetros, a saber: citotóxicos e genotóxicos (carcinogênico e mutagênico).

4 METODOLOGIA

As análises dos parâmetros toxicológicos, incluindo os citotóxicos e genotóxicos (carcinogênicos e mutagênicos), foram realizadas no Laboratório de Toxicologia e Imunologia (ToxCel), da Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Campus Uruguaiana. Os animais foram mantidos durante o período de aclimação e tratamento no Laboratório de Experimentação do Núcleo de Pesquisas Ictiológicas, Limnológicas e Aquicultura da Bacia do Rio Uruguai (NUPILABRU) da Unipampa, Campus Uruguaiana/RS, entre os meses de janeiro a maio de 2017.

4.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO

Os exemplares de *L. fortunei* foram coletados na Barragem Sanchuri (29,547357 S, 56,812288 W), localizada cerca de 40 km da sede do município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul.



FIGURA 4-Imagem aérea da Barragem Sanchuri, como a marcação do local da coleta. Fonte: Google Earth (2017).

Foram coletados aleatoriamente de colônias fixadas em substratos naturais e artificiais e transportados até o laboratório em recipiente de PVC com água do local da coleta, conforme preconizado por Mansur et al. (2012).



FIGURA 5-Recipiente de transporte dos Mexilhões para o laboratório. Fonte: Próprio autor (2017).

Em laboratório, os exemplares coletados foram lavados com água corrente, separados cuidadosamente e divididos em grupos de 50 indivíduos cada e colocados em aquários de vidro de 37 L de volume com água do local de coleta, sob circulação forçada e aeração, à temperatura controlada de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. A água foi previamente filtrada com filtro para zooplâncton com malha de 68 micra de abertura, para diminuição da quantidade de zooplâncton e fitoplâncton presentes. Foi feita a reposição da água nos aquários cada dois dias para manutenção do volume, com água do local da coleta. Também foi realizado um período de aclimatação de cerca de 15 dias antes da realização dos tratamentos com as concentrações do metal.

4.2 PRIMEIRO TRATAMENTO - EXPOSIÇÃO SUBAGUDAAO HgCl_2

Com base no arrazoado teórico sobre a toxicidade do HgCl_2 , e considerando estar presente no meio ambiente sob diversas formas de contaminação, provenientes como constituinte de produtos utilizados em ações antropogênicas, resolvemos utilizar o mercúrio como agente toxicante e poluidor dos reservatórios aquáticos utilizados nos tratamentos e ensaios utilizados pelo presente estudo, os quais são descritos abaixo. Ainda, para as exposições ao referido metal, se elegeu a concentração de $0,01\text{ mg/L HgCl}_2$ para água de residual, estabelecida pelo Conselho Nacional para o Meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução 430 de 2011 e, a partir dela, concentrações menores até 10 vezes inferior e concentrações maiores até 10 vezes superior a concentração inicial.

Para o tratamento subagudo foram usados 18 aquários, divididos em 6 grupos: Grupo 1, Controle Negativo; Grupo 2 ao 6, onde os mexilhões foram expostos a concentrações de 0,001 mg/L, 0,005 mg/L, 0,01 mg/L, 0,02 mg/L e 0,1 mg/L de HgCl₂ (padrão MERK®). A exposição dos animais foi feita durante 30 dias, realizando a retirada de amostras para análise (12 indivíduos) no primeiro, sétimo, décimo quinto e trigésimo dias de tratamento. Todos os animais retirados para análise foram medidos e pesados.

4.3 SEGUNDO TRATAMENTO - EXPOSIÇÃO AGUDA AO HgCl₂

Como os metais pesados tendem a se depositar nos sedimentos e os mexilhões apresentam propriedade filtrante, resolvemos verificar se após administração injetável de HgCl₂ os animais apresentariam graus diferenciados de lesão frente às diferentes concentrações testadas.

Neste tratamento foram usados 6 aquários, divididos em 6 grupos: Grupo 1, Controle Negativo; Grupo 2 ao 6, os mexilhões foram submetidos a injeções de 20 µL de soluções de HgCl₂ (padrão MERK®) nas concentrações de 0,001 mg/L, 0,005 mg/L, 0,01 mg/L, 0,02 mg/L e 0,1 mg/L, entre as faces superior e inferior da concha do animal, junto ao bisso, com agulha e seringa para aplicação de insulina, marca BD®. Posteriormente, os mexilhões foram colocados nos respectivos aquários sem contaminação com HgCl₂. Os animais foram mantidos nos aquários durante 30 dias, realizando a retirada de amostras para análise (12 indivíduos) no primeiro, sétimo, décimo quinto e trigésimo dias da exposição. Todos os animais retirados para análise foram medidos e pesados.

4.4 MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA DE EXPOSIÇÃO

Para a avaliação dos padrões de qualidade da água durante os dois tratamentos, foram monitorados diariamente o pH, a temperatura, a condutividade e oxigênio dissolvido, com o uso de um aparelho multiparâmetros com sonda, da marca HANNA[®] e, semanalmente, a turbidez, com o uso de um turbidímetro portátil, marca HANNA[®]. As análises de alcalinidade, dureza, teor de amônia e nitrito, foram realizadas através de um kit para controle da qualidade de água, marca Alfakit[®].

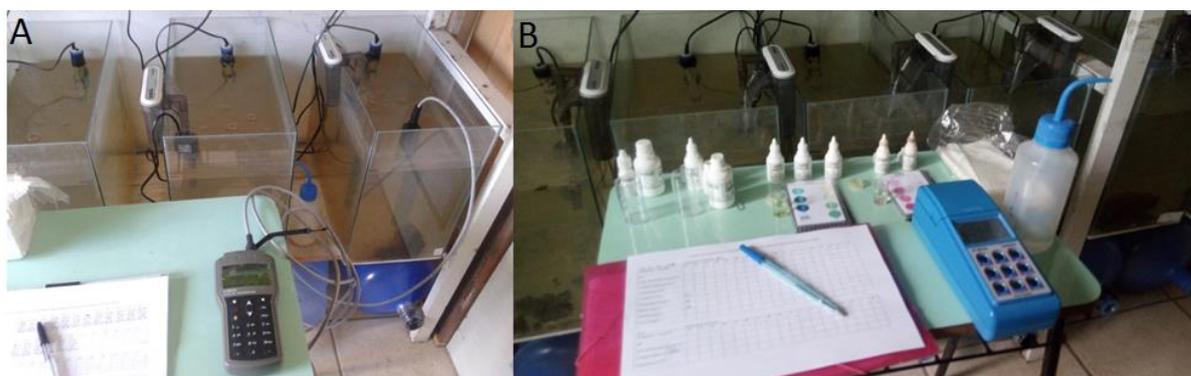


FIGURA 6-Controle da qualidade da água, determinação dos parâmetros físico-químicos. A, Medição com a Sonda multiparamétrica HANNA[®]; B, Análise com uso kit Alfakit[®] e turbidímetro portátil HANNA[®]. Fonte: Próprio autor (2017).

4.5 ANÁLISE DE PARÂMETROS CITOTÓXICOS, MUTAGÊNICOS E GENOTÓXICOS

Para avaliação dos parâmetros supracitados, todas as amostras foram preparadas em triplicata.

4.6.1 Viabilidade celular

O parâmetro de citotoxicidade foi pesquisado através do teste de viabilidade celular segundo o método do Azul de Tripam proposto por Burow et al. (1998), que analisa a diferenciação entre as células vivas e mortas através da coloração azul no citoplasma das células inviáveis. Foi feito um esfregaço com o tecido do mexilhão em lâminas previamente limpas e, sobre o mesmo, adicionado 100 μ L de azul de Tripam. Após 3 minutos, a lâmina foi visualizada no microscópio com aumento de 400X. Foram contabilizadas 100 células por

lâmina analisada. Como controle positivo, foi utilizado H_2O_2 4 mM com o intuito de verificar se os animais demonstravam ser sensíveis a indutores de lesão.

4.6.2 Teste de Micronúcleos

A mutagenicidade foi avaliada através do teste de Micronúcleo, de acordo com a técnica descrita por SCHMID (1975). Foi feito um *print* com tecido dos mexilhões sobre as lâminas, as quais foram coradas com coloração panótica após a secagem. Por fim, essas lâminas foram analisadas em microscópio em um aumento de 1000X e classificadas de acordo com a presença de: células mononucleadas com a presença de um, dois ou três micronúcleos, além de células em necrose ou apoptose (FENCH, 2000). Para esse teste, não foi utilizado nenhum agente indutor de mutagenicidade.

4.6.3 Teste cometa

Para a realização do teste cometa foi feito previamente uma homogeneização dos tecidos do mexilhão a ser analisado, os quais foram colocados em microtubos com 200 μ L de tampão fosfato (PBS), pH 7,4. As amostras foram centrifugadas e foi retirada uma alíquota na interface entre o sobrenadante e o precipitado para análise.

Esta alíquota de amostra foi suspensa em agarose de baixo ponto de fusão 0,75% e a suspensão foi colocada sobre lâminas previamente cobertas com agarose 1,5%. Após, foram imersas em solução de lise e mantidas na geladeira por 7 dias.

Após esse período, as lâminas foram retiradas da cuba e submetidas à corrida eletroforética (20 min, 30 mA, 25 V, em tampão alcalino pH >13). Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas e secas em estufa a 37 °C, por 2h. Após a secagem, as lâminas foram fixadas e secas novamente a temperatura ambiente *overnith*. Após a secagem, as lâminas foram reidratadas e coradas com solução de nitrato de prata 0,1%. Por fim, foram lavadas e secas à temperatura ambiente para posterior leitura em microscópio(SINGH et al., 1998). Os danos ao DNA foram classificados de acordo com o índice de dano (Figura 7), podendo variar de 0 – onde não há dano, até 4 – onde há o máximo de dano. O índice de dano ao DNA foi calculado a partir das células com diferentes classificações de danos, variando de 0 (100

células X 0 quando não ocorreu dano) a 400 (100 células X 4, quando ocorreu o máximo de dano). Como controle positivo, foi utilizado H₂O₂ 4 mM com o intuito de verificar se os animais apresentavam-se sensíveis a indutores de lesão.

Dano observado	Classe de dano
	0
	1
	2
	3
	4

FIGURA 7- Diferentes classes de dano celular detectados pelo ensaio cometa em células de *Limnoperna fortunei*. Fonte: Adaptado de Güz et al., (2012).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em software estatístico específico. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. As análises foram avaliadas por análise de variância de uma via (ANOVA), complementada pelo teste *Post-Hoc* de Tukey. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os valores médios dos parâmetros avaliados são apresentados na tabela 1. Após análises dos valores mensurados para cada amostra durante a aclimação e os 30 dias de exposição, se verificou os valores obtidos não apresentaram diferenças significativas para os resultados de pH, condutividade, oxigênio dissolvido e temperatura. Esses, quando comparados com os valores encontrados na literatura, ficaram dentro dos padrões estabelecidos para qualidade da água de manutenção do mexilhão dourado em laboratório, onde o pH observado variou entre 6,5 e 7,5; a temperatura entre 24 °C e 25 °C (MANSUR et al., 2012); o oxigênio dissolvido apresentou valores entre 6,5 e 8,5 mg/L (CORDEIRO et al., 2016); e a condutividade, valores entre 120 e 140 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (IUMMATO et al., 2013).

Os parâmetros avaliados semanalmente apresentaram valores médios de 5,0 a 11 NTU para a turbidez; 30 a 40 mg de CaCO_3/L para alcalinidade; 40 a 50 mg/L de CaCO_3 para a dureza; 0,1 a 0,2 mg/L para o teor de amônia e 0,01 a 0,03 mg/L para nitrito. A comparação entre as medidas encontradas não apresentara diferenças significativas entre as amostras.

TABELA 1-Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros físico-químicos de qualidade da água de exposição monitorados diariamente e semanalmente, durante os tratamentos.

Aquário	PARÂMETROS DIÁRIOS					PARÂMETROS SEMANAIS			
	Ph	O ₂ Dis. (mg/L)	Condutividade (μ S/cm)	Temperatura (°C)	Turbidez (NTU)	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Dureza (mg/L CaCO ₃)	Amônia (mg/L)	Nitrito (mg/L)
Primeiro Tratamento									
1	7,72 \pm 0,29	6,40 \pm 1,67	89,62 \pm 9,78	24,5 \pm 1,28	10,48 \pm 3,09	34,29 \pm 7,87	44,29 \pm 5,35	0,207 \pm 0,073	0,018 \pm 0,019
2	7,69 \pm 0,31	6,60 \pm 1,51	85,05 \pm 8,89	23,97 \pm 3,40	10,77 \pm 2,95	35,71 \pm 7,87	44,29 \pm 5,35	0,164 \pm 0,080	0,029 \pm 0,017
3	7,70 \pm 0,33	6,47 \pm 1,49	82,14 \pm 9,33	24,37 \pm 1,26	10,82 \pm 2,75	32,86 \pm 7,56	47,14 \pm 4,88	0,164 \pm 0,080	0,039 \pm 0,028
4	7,71 \pm 0,30	6,51 \pm 1,51	82,38 \pm 9,40	24,42 \pm 1,32	9,47 \pm 3,14	34,29 \pm 7,87	44,29 \pm 7,87	0,164 \pm 0,080	0,029 \pm 0,017
5	7,73 \pm 0,30	6,44 \pm 1,44	84,57 \pm 9,73	24,3 \pm 1,28	10,76 \pm 2,92	31,43 \pm 8,99	44,29 \pm 5,35	0,207 \pm 0,073	0,025 \pm 0,014
6	7,79 \pm 0,27	6,41 \pm 1,45	83,10 \pm 8,91	24,02 \pm 1,34	10,60 \pm 3,05	32,86 \pm 11,13	42,86 \pm 4,88	0,185 \pm 0,080	0,029 \pm 0,009
7	7,74 \pm 0,44	6,47 \pm 1,43	82,31 \pm 8,75	23,96 \pm 1,36	10,40 \pm 3,14	30,00 \pm 10,00	41,43 \pm 6,90	0,164 \pm 0,080	0,025 \pm 0,014
8	7,76 \pm 0,26	6,22 \pm 1,37	81,19 \pm 8,46	23,89 \pm 1,34	9,77 \pm 3,19	30,00 \pm 8,16	44,29 \pm 5,35	0,164 \pm 0,080	0,029 \pm 0,009
9	7,78 \pm 0,26	6,17 \pm 1,39	89,71 \pm 11,98	24,41 \pm 1,56	9,76 \pm 3,01	37,14 \pm 9,51	48,57 \pm 6,90	0,143 \pm 0,073	0,025 \pm 0,014
10	7,80 \pm 0,24	6,26 \pm 1,43	86,64 \pm 9,93	24,26 \pm 1,15	11,08 \pm 2,65	32,86 \pm 7,56	48,57 \pm 3,78	0,164 \pm 0,080	0,032 \pm 0,012
11	7,79 \pm 0,24	6,33 \pm 1,48	84,74 \pm 8,56	24,22 \pm 1,08	11,46 \pm 2,52	37,14 \pm 4,88	45,71 \pm 5,35	0,164 \pm 0,080	0,032 \pm 0,012
12	7,78 \pm 0,24	6,14 \pm 1,47	85,64 \pm 9,52	24,79 \pm 1,09	11,15 \pm 2,92	32,86 \pm 4,88	45,71 \pm 5,35	0,143 \pm 0,073	0,032 \pm 0,012
13	7,80 \pm 0,25	6,36 \pm 1,54	83,14 \pm 7,53	24,33 \pm 1,06	10,45 \pm 2,48	31,43 \pm 6,90	42,86 \pm 4,88	0,143 \pm 0,073	0,036 \pm 0,013
14	7,80 \pm 0,25	6,40 \pm 1,55	80,79 \pm 7,54	24,25 \pm 1,14	11,27 \pm 2,48	31,43 \pm 6,90	45,71 \pm 5,35	0,185 \pm 0,080	0,032 \pm 0,012
15	7,77 \pm 0,23	6,33 \pm 1,53	92,07 \pm 7,95	24,33 \pm 1,21	11,17 \pm 2,66	35,71 \pm 7,87	44,29 \pm 5,35	0,185 \pm 0,080	0,029 \pm 0,009
16	7,77 \pm 0,27	6,27 \pm 1,51	83,90 \pm 9,18	24,45 \pm 1,17	10,96 \pm 2,64	31,43 \pm 6,90	44,29 \pm 5,35	0,164 \pm 0,080	0,025 \pm 0,014
17	7,81 \pm 0,22	6,15 \pm 1,46	90,05 \pm 5,92	24,6 \pm 1,12	5,246 \pm 4,14	30,00 \pm 8,16	42,86 \pm 4,88	0,121 \pm 0,057	0,025 \pm 0,0
18	7,85 \pm 0,19	6,22 \pm 1,48	99,86 \pm 8,19	24,52 \pm 1,16	7,50 \pm 4,40	37,14 \pm 9,51	50,00 \pm 10	0,121 \pm 0,057	0,032 \pm 0,012
Segundo tratamento									
1	7,31 \pm 0,17	4,63 \pm 1,32	102,8 \pm 19,21	23,03 \pm 1,07	8,51 \pm 1,04	34,00 \pm 8,94	44,00 \pm 5,48	0,220 \pm 0,067	0,040 \pm 0,033
2	7,40 \pm 0,25	4,54 \pm 1,35	103,5 \pm 17,33	23,51 \pm 0,93	7,68 \pm 3,62	34,00 \pm 5,48	40,00 \pm 0,0	0,350 \pm 0,134	0,035 \pm 0,014
3	7,30 \pm 0,21	4,56 \pm 1,21	102,7 \pm 18,98	23,26 \pm 1,01	5,87 \pm 0,99	34,00 \pm 5,48	42,00 \pm 4,47	0,350 \pm 0,134	0,040 \pm 0,014
4	7,29 \pm 0,17	4,59 \pm 1,18	108,1 \pm 19,06	23,24 \pm 0,84	6,51 \pm 1,34	36,00 \pm 5,48	36,00 \pm 5,48	0,450 \pm 0,112	0,035 \pm 0,014
5	7,25 \pm 0,15	4,60 \pm 1,12	105,4 \pm 21,54	23,05 \pm 1,01	5,08 \pm 1,26	34,00 \pm 5,48	40,00 \pm 7,07	0,400 \pm 0,134	0,040 \pm 0,014
6	7,20 \pm 0,10	3,96 \pm 0,96	124,8 \pm 21,88	23,31 \pm 1,27	5,62 \pm 1,28	34,00 \pm 5,48	42,00 \pm 4,47	0,417 \pm 0,144	0,042 \pm 0,015

Cabe ressaltar que não houve mortes de nenhum exemplar de *L. fortunei* durante o período de experimentação (aclimatação e tratamento) no tratamento subagudo, expostos a água contaminada com as concentrações de HgCl₂ avaliadas. No entanto, durante o tratamento agudo, após o quinto dia da administração injetável das soluções do metal houve morte de dezoito animais expostos à maior concentração de HgCl₂ (0,1 mg/L); e no décimo sétimo dia, a morte de mais 5 indivíduos, totalizando 23 mortes em 17 dias de tratamento. Com os tratamentos de menor concentração (0,001 mg/L, 0,005 mg/L, 0,01 mg/L e 0,02 mg/L) também houveram mortes, que se iniciaram no sétimo dia de tratamento se estendendo até o último dia de tratamento. A quantidade de mexilhões mortos por tratamento foi: nove, na concentração de 0,001 mg/L; dez, nas concentrações de 0,005 mg/L e 0,02 mg/L; e onze concentração de 0,01 mg/L de HgCl₂.

O efeito do mercúrio sobre organismos aquáticos, especialmente moluscos, é pouco conhecido. No entanto, se sabe que o acúmulo desse metal pode causar anormalidades comportamentais, danos neurotóxicos e danos genotóxicos em *Chelus fimbriata* (quelhônio de água doce) na concentração média de $0,27 \pm 45$ µg/g de tecido animal (CUNHA, 2015). Soares et al., (2009), ao investigarem sobre a toxicidade do CuSO₄ em mexilhão dourado, verificaram que a exposição aguda às concentrações de 2,16 e 4,86 mg/L causou 90,8% de mortalidade dos animais. Em estudo anterior realizado por Villela (2006), o qual testou concentrações de 1,88, 3,75, 7,50, 15 e 20 µg/L de CuSO₄ por um período de exposição de 48 h, não registrou morte dos indivíduos, contudo, observou dano genotóxico e mutagênico, concentração-dependente.

Durante todo nosso experimento, a água de teste somente foi adicionada para a manutenção dos níveis dos aquários e não foi adicionado alimento aos animais. Mesmo assim, não foi verificada a mortalidade dos mexilhões no grupo controle, demonstrando a resistência do animal à falta de alimento. Segundo Soares et al. (2009), o *L. fortunei* é uma espécie bastante resistente a condições extremas, chegando a sobreviver em condições de laboratório por até 63 dias sem alimentação.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS

A tabela 2 mostra a média dos tamanhos (cm) e dos pesos dos mexilhões com a casa e somente do tecido dos animais usados no experimento. Os animais empregados para as análises apresentaram tamanho médio de $13,19 \pm 1,76$ a $20,22 \pm 1,75$ mm, sendo considerados indivíduos adultos a partir de 5 mm (SANTOS et al., 2008). O peso médio apresentado dos mexilhões com a concha foi de $0,2825 \pm 0,1704$ a $0,7316 \pm 0,1603$ g; e o peso dos tecidos, de $0,0603 \pm 0,0154$ a $0,3698 \pm 0,4433$ g. Não houve diferença significativa estatística entre os grupos nos parâmetros avaliados.

TABELA 2-Valores médios \pm desvio padrão do comprimento e do peso (com a concha e somente tecidos) dos exemplares de *L. fortunei* usados em cada tratamento (n= 15 indivíduos).

Aquário	0 dias			7 dias			15 dias			30 dias		
	Comprimento (mm)	Peso com concha (g)	Peso do tecido (g)	Comprimento (mm)	Peso com concha (g)	Peso do tecido (g)	Comprimento (mm)	Peso com concha (g)	Peso do tecido (g)	Comprimento (mm)	Peso com concha (g)	Peso do tecido (g)
Primeiro Tratamento												
1	20,22 \pm 1,75	0,6980 \pm 0,2033	0,1560 \pm 0,0360	17,09 \pm 3,92	0,4832 \pm 0,2565	0,1697 \pm 0,1116	16,48 \pm 1,12	0,4189 \pm 0,1118	0,0936 \pm 0,0290	14,78 \pm 0,92	0,3136 \pm 0,1025	0,0767 \pm 0,0391
2	20,21 \pm 2,20	0,6924 \pm 0,2094	0,1434 \pm 0,0234	17,38 \pm 2,59	0,4834 \pm 0,1620	0,1267 \pm 0,0381	17,47 \pm 2,51	0,5492 \pm 0,2060	0,1829 \pm 0,0581	16,88 \pm 2,34	0,4339 \pm 0,1694	0,1569 \pm 0,0487
3	19,94 \pm 1,36	0,7316 \pm 0,1603	0,3698 \pm 0,4433	17,43 \pm 2,13	0,5042 \pm 0,1992	0,1142 \pm 0,0402	16,64 \pm 2,27	0,4612 \pm 0,1646	0,1452 \pm 0,0266	14,33 \pm 2,71	0,3271 \pm 0,1763	0,1333 \pm 0,0086
4	19,10 \pm 1,24	0,6039 \pm 0,1039	#	18,96 \pm 2,10	0,6229 \pm 0,1751	0,1703 \pm 0,0260	17,17 \pm 2,85	0,4629 \pm 0,1460	0,1460 \pm 0,0157	16,02 \pm 3,08	0,3879 \pm 0,2147	0,1610 \pm 0,0240
5	#	#	#	19,52 \pm 2,19	0,6758 \pm 0,2212	0,2227 \pm 0,0622	17,14 \pm 2,25	0,4680 \pm 0,2223	0,1337 \pm 0,0453	16,79 \pm 2,57	0,4598 \pm 0,2603	0,1687 \pm 0,0591
6	#	#	#	17,66 \pm 2,69	0,5440 \pm 0,2975	0,1245 \pm 0,0420	18,20 \pm 3,52	0,5645 \pm 0,2748	0,1611 \pm 0,0525	16,79 \pm 4,28	0,4326 \pm 0,2493	0,2369 \pm 0,0509
7	19,64 \pm 2,09	0,7162 \pm 0,1960	#	17,23 \pm 2,71	0,4955 \pm 0,2295	0,0861 \pm 0,0179	17,27 \pm 3,01	0,5538 \pm 0,2877	0,1623 \pm 0,0502	14,11 \pm 2,81	0,2791 \pm 0,1500	0,1165 \pm 0,0185
8	#	#	#	17,76 \pm 2,55	0,5281 \pm 0,2308	0,1549 \pm 0,0226	15,98 \pm 0,87	0,3903 \pm 0,0669	0,0684 \pm 0,0228	13,81 \pm 2,13	0,2468 \pm 0,0814	0,0584 \pm 0,0097
9	#	#	#	17,12 \pm 2,71	0,4923 \pm 0,2430	0,1318 \pm 0,0197	17,65 \pm 2,07	0,5080 \pm 0,1767	0,1295 \pm 0,0448	14,82 \pm 2,85	0,3465 \pm 0,1990	0,1050 \pm 0,0269
10	18,66 \pm 2,65	0,5993 \pm 0,2641	#	18,18 \pm 2,07	0,5397 \pm 0,2127	0,1539 \pm 0,0236	16,49 \pm 2,31	0,4135 \pm 0,1736	0,1305 \pm 0,0265	16,50 \pm 2,29	0,4361 \pm 0,1614	0,1468 \pm 0,0255
11	#	#	#	16,50 \pm 1,84	0,4452 \pm 0,1338	0,0810 \pm 0,0248	18,35 \pm 2,88	0,6101 \pm 0,3138	0,1886 \pm 0,0974	19,12 \pm 2,50	0,6344 \pm 0,1725	0,1372 \pm 0,0506
12	#	#	#	18,75 \pm 2,72	0,6536 \pm 0,2862	0,2429 \pm 0,0533	17,42 \pm 2,14	0,5424 \pm 0,2412	0,1727 \pm 0,0291	17,34 \pm 2,63	0,4959 \pm 0,2363	0,1723 \pm 0,0582
13	19,10 \pm 1,08	0,6286 \pm 0,0686	#	16,80 \pm 2,03	0,4700 \pm 0,1802	0,1197 \pm 0,0524	16,44 \pm 2,39	0,4581 \pm 0,2203	0,1314 \pm 0,0267	15,04 \pm 2,84	0,3562 \pm 0,1999	0,0956 \pm 0,0526
14	#	#	#	16,21 \pm 1,97	0,4440 \pm 0,1372	0,1173 \pm 0,0533	15,02 \pm 2,50	0,3400 \pm 0,1571	0,1067 \pm 0,0308	14,86 \pm 3,19	0,3248 \pm 0,1575	0,1105 \pm 0,0198
15	#	#	#	17,31 \pm 2,18	0,5231 \pm 0,3014	0,2314 \pm 0,1525	18,07 \pm 2,31	0,5454 \pm 0,2332	0,2125 \pm 0,0122	15,51 \pm 3,21	0,4209 \pm 0,2641	0,1487 \pm 0,0140
16	17,29 \pm 1,59	0,4210 \pm 0,0734	#	18,72 \pm 3,62	0,5908 \pm 0,2495	0,2200 \pm 0,0923	16,16 \pm 3,08	0,4371 \pm 0,2440	0,1173 \pm 0,0187	17,80 \pm 2,86	0,5894 \pm 0,2868	0,1561 \pm 0,0358
17	#	#	#	17,20 \pm 2,03	0,4844 \pm 0,1882	0,1579 \pm 0,0628	16,68 \pm 1,70	0,4637 \pm 0,1575	0,0988 \pm 0,0520	17,68 \pm 1,61	0,5047 \pm 0,1516	0,1080 \pm 0,0056
18	#	#	#	18,99 \pm 1,68	0,6155 \pm 0,1688	0,1705 \pm 0,0195	15,14 \pm 1,96	0,3380 \pm 0,1260	0,1068 \pm 0,0549	13,82 \pm 2,40	0,2825 \pm 0,1704	0,0782 \pm 0,0273
Segundo Tratamento												
1	18,24 \pm 0,84	0,5026 \pm 0,1007	0,1566 \pm 0,0360	21,01 \pm 1,71	0,4924 \pm 0,2735	0,1697 \pm 0,1116	18,24 \pm 1,80	0,4208 \pm 0,1677	0,0396 \pm 0,0290	18,79 \pm 1,93	0,3453 \pm 0,1120	0,0767 \pm 0,0391
2	15,50 \pm 3,20	0,3821 \pm 0,2495	0,1805 \pm 0,1063	13,19 \pm 1,76	0,2381 \pm 0,1023	0,0803 \pm 0,0250	17,37 \pm 3,47	0,6676 \pm 0,3435	0,0963 \pm 0,0396	13,92 \pm 2,88	0,2774 \pm 0,1722	0,0609 \pm 0,0245
3	16,92 \pm 2,74	0,4511 \pm 0,2049	0,1802 \pm 0,0366	17,09 \pm 2,42	0,4800 \pm 0,2279	0,1829 \pm 0,0583	16,61 \pm 2,36	0,4689 \pm 0,0988	0,1710 \pm 0,0332	16,24 \pm 1,69	0,3981 \pm 0,1388	0,0922 \pm 0,0053
4	18,08 \pm 2,94	0,5630 \pm 0,3150	0,2512 \pm 0,0934	17,43 \pm 2,13	0,5042 \pm 0,1992	0,1142 \pm 0,0402	18,51 \pm 2,10	0,5549 \pm 0,1682	0,1058 \pm 0,0197	16,89 \pm 1,11	0,4035 \pm 0,0819	0,1032 \pm 0,0249
5	17,67 \pm 2,24	0,5258 \pm 0,2586	0,1812 \pm 0,0735	17,08 \pm 1,70	0,4697 \pm 0,1824	0,0966 \pm 0,0069	18,67 \pm 4,51	0,5081 \pm 0,2090	0,1396 \pm 0,0347	17,66 \pm 1,63	0,4451 \pm 0,0966	0,0603 \pm 0,0154
6	18,15 \pm 1,93	0,5561 \pm 0,1846	0,1758 \pm 0,0569	18,85 \pm 2,70	0,6027 \pm 0,2787	0,1345 \pm 0,0332	15,54 \pm 0,79	0,3820 \pm 0,0654	0,0670 \pm 0,0338	#	#	#

Parâmetro não determinado; Não houve diferença significativa entre os grupos.

5.3 CITOTOXICIDADE

Os resultados obtidos a partir do ensaio de viabilidade celular de células do mexilhão dourado expostos à água com diferentes concentrações de mercúrio mostram que o metal foi capaz de induzir uma baixa citotoxicidade na maior concentração testada (0,1 mg/L) de HgCl_2 , após sete dias de exposição subaguda (Figura 8B). O percentual de células viáveis para essa concentração foi de $85,56 \pm 1,24\%$, que foi significativamente menor quando comparado ao percentual encontrado para o controle negativo, que foi de $98,67 \pm 0,87\%$ ($p < 0,05$). Entretanto, se observou que a citotoxicidade diminuiu gradativamente, seestabilizando a partir do 15º dia (Figura 8C) e se mantendo até o final do tratamento (30º dia – Figura 8D), sem diferença significativa em relação ao controle negativo ($96,11\% \pm 1,69$ de células viáveis).

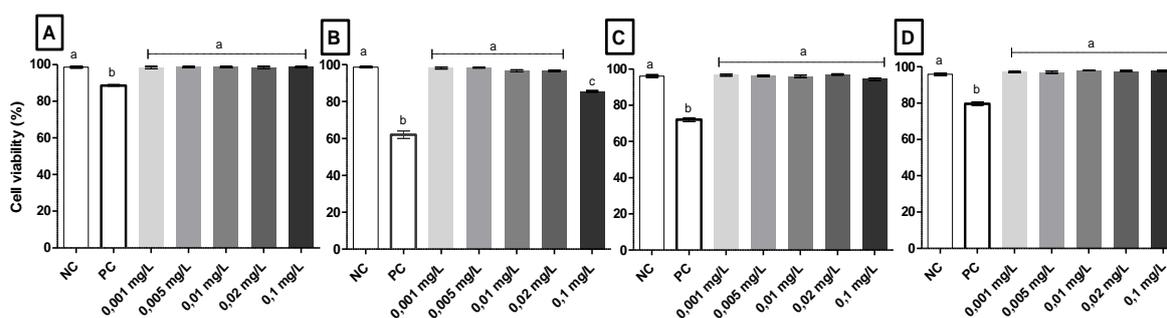


FIGURA 8- Viabilidade Celular em células de mexilhão dourado expostos a diferentes concentrações de HgCl_2 . A, Início- 0 dia; B, 7 dias de tratamento; C, 15 dias de tratamento; E, 30 dias de tratamento. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$, considerando resultados significativos com $p < 0,05$. ^{a b c} Representam diferenças estatísticas entre as concentrações. NC= Controle Negativo; PC= Controle Positivo.

A partir desses dados, é possível sugerir que o mexilhão pode se adaptar e desenvolver processo de regeneração a partir de um período de exposição ao HgCl_2 mais prolongado. Segundo Villela et al. (2007), mexilhões em ambientes poluídos desenvolvem mecanismos adaptativos, dificultado a interpretação dos resultados de monitoramento. A presença de enzimas antioxidantes e proteínas da família HSP 70, encontrados também em outros bivalves, está presente no *L. Fortunei* e pode ser responsável por sua adaptação a ambientes extremos e sua tolerância a contaminantes (ULIANO-SILVA et al., 2014).

As Proteínas de choque térmico (HSPs) são uma família de proteínas que possuem efeitos citoprotetivos quando os organismos são submetidos a condições de estresse ambiental, como variações bruscas de temperatura, baixas concentrações de oxigênio, presença de metais pesados, dentre outros (Xu et al., 2016). De acordo com Uliano-Silva et al. (2014), a HSP70 pode aumentar cerca de 15 vezes quando o *L. fortunei* foi exposto a grandes variações de oxigênio dissolvido, temperatura ou metais pesados.

Já a viabilidade celular relacionada ao tratamento agudo, após administração injetável das diferentes concentrações do metal nos mexilhões, apresentou uma redução significativa na maior concentração testada (1mg/L) após 2 h da administração injetável (Figura 9A), quando comparada ao controle negativo ($98,67\% \pm 0,58$) ($p < 0,05$), mas semelhante ao controle positivo ($88,67\% \pm 0,58$). Após 7, 15 e 30 dias da administração injetável e mantidos em água sem contaminação, se observou um aumento da citotoxicidade (maior que 50%) em todas as concentrações testadas, que foi maior que a verificada para o controle positivo ($p < 0,05$) (Figura 9B, 9C e 9D).

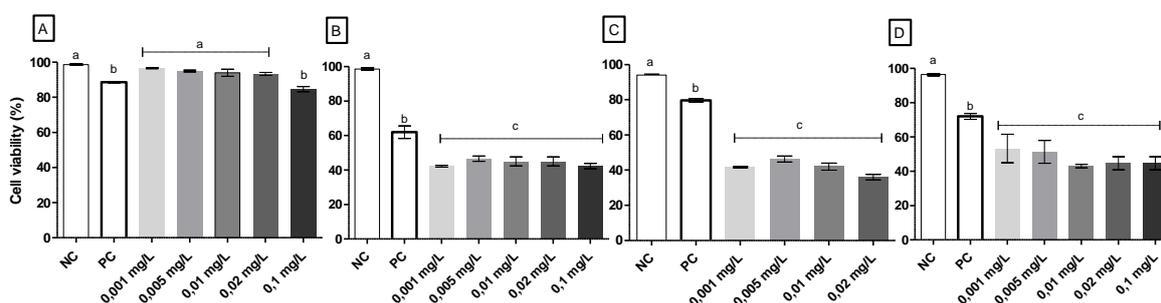


FIGURA 9-Viabilidade Celular em células de mexilhão dourado expostos sob injeção a diferentes concentrações de $HgCl_2$. A, Início- 2 h; B, 7 dias de tratamento; C, 15 dias de tratamento; e D, 30 dias de tratamento. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$, considerando resultados significativos com $p < 0,05$, (ANOVA - teste de *Post-Hoc* de Tukey). ^{a b c} Representam diferenças estatísticas entre as concentrações. NC= Controle Negativo; PC= Controle Positivo.

As diferentes formas de mercúrio existentes no ambiente podem causar variados níveis de citotoxicidade para a saúde humana e animal. Olsvik et al., (2016) analisaram a citotoxicidade do mercúrio (Hg^{+2}) sobre hepatócitos de salmão do Atlântico. Após 48 h de exposição às concentrações estudadas de 0,2 e 20,05 mg/L do metal não foi observado efeito significativo sobre a viabilidade celular, porém, houve diminuição de 11,8 % na quantidade de células normais na concentração de 20,05 mg/L.

O mercúrio é um poluente ambiental reconhecidamente tóxico. Em ambientes aquáticos, uma das formas presentes é o cloreto de mercúrio, que pode sofrer biotransformação em cloreto de metilmercúrio (CH_3HgCl). Pereira et al. (2005) avaliaram as alterações induzidas *ex vivo* por HgCl_2 e CH_3HgCl (0,1 a 1000 $\mu\text{g/L}$) em cultura de linfócitos humanos, onde foi observado que os dois compostos de mercúrio apresentaram citotoxicidade, mesmo nas menores concentrações do metal, porém a forma orgânica apresentou maior citotoxicidade em relação à forma inorgânica. Também foi observado que o efeito citotóxico do mercúrio aparece antes dos efeitos genotóxicos, sendo considerado uma indicação anterior da presença de danos celulares.

Sabe-se que em bivalves, os hemócitos circulantes são os principais responsáveis pela sua defesa frente a xenobiontes através de processo fagocitário. Rault et al. (2013) avaliaram a citotoxicidade *ex vivo* de HgCl_2 em hemócitos de *Mytilus edulis* nas concentrações de 0,0002, 0,002, 0,02, 0,2, 2, 20 e 200 mg/L e verificaram diminuição da viabilidade de forma concentração dependente, a partir da concentração de 0,02 mg/L de Hg. Esses resultados diferem, em parte, dos encontrados em nosso trabalho. Entretanto, não se pode deixar de considerar as diferentes condições experimentais entre os estudos, como o tipo celular, que no estudo dos autores supracitados foi utilizado hemócitos e, no nosso estudo, usamos vários tecidos (massa tecidual do indivíduo), além do tempo de exposição ao HgCl_2 ser mais prolongado em nosso estudo.

Outrossim, olhando exclusivamente para os resultados provenientes do teste de viabilidade de Bruow em exposição subaguda, sem a administração injetável, o *L. fortunei* parece não ser um bom indicador de citotoxicidade. Complementarmente, com os resultados advindos da administração injetável e submissão à exposição aguda, podemos observar que o *L. fortunei* se mostra sensível a concentrações elevadas do metal quando em contato direto em seus tecidos, o que faz refletir de que se a citotoxicidade fosse avaliada de outra forma ou o uso de concentrações e tempo de exposição maior que os avaliados neste estudo, talvez houvesse resultados de citotoxicidade já na exposição subaguda.

Todavia, interessante observar que, no caso de haver lesão significativa precoce, como a ocorrida no tratamento de exposição forçada (injetável), contrariamente do tratamento anterior, os mecanismos de recuperação parecem não responder adequadamente.

5.4 GENOTOXIDADE

Para investigação da genotoxicidade foi realizado o teste cometa alcalino. A figura 10 demonstra o índice de dano de DNA gerado pelo ensaio cometa alcalino para células de *L. fortunei* submetidos a diferentes concentrações de HgCl₂, com avaliação no tempo zero, após 7, 15 e 30 dias de exposição (exposição subaguda) e em 2 h após administração injetável (exposição aguda).

A figura 10A indica o índice de dano ao DNA (ID) observado nos animais sem tratamento. Aos 7 dias de tratamento não se observou ID significativo em todas as concentrações testadas (0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,1 mg/L de HgCl₂), se comparados ao grupo controle negativo (Figura 10 B). No entanto, aos 15 dias de exposição (Figura 10 C), houve ID significativo na maior concentração testada (0,1 mg/L), se comparado ao controle negativo ($p < 0,05$), porém menor que o ID encontrado para o controle positivo; e, em 30 dias (Figura 10 D), foi observado ID maior que o encontrado para o controle negativo nas concentrações de 0,01, 0,02 e 0,1 mg/L de forma concentração dependente ($p < 0,05$), porém, com danos menores que o controle positivo. Entretanto, após 2 h da administração injetável das soluções de HgCl₂, houve um aumento significativo do ID em todas as concentrações testadas (cerca de 10 vezes) tanto em relação ao controle negativo ($p < 0,05$) quanto ao controle positivo ($p < 0,05$).

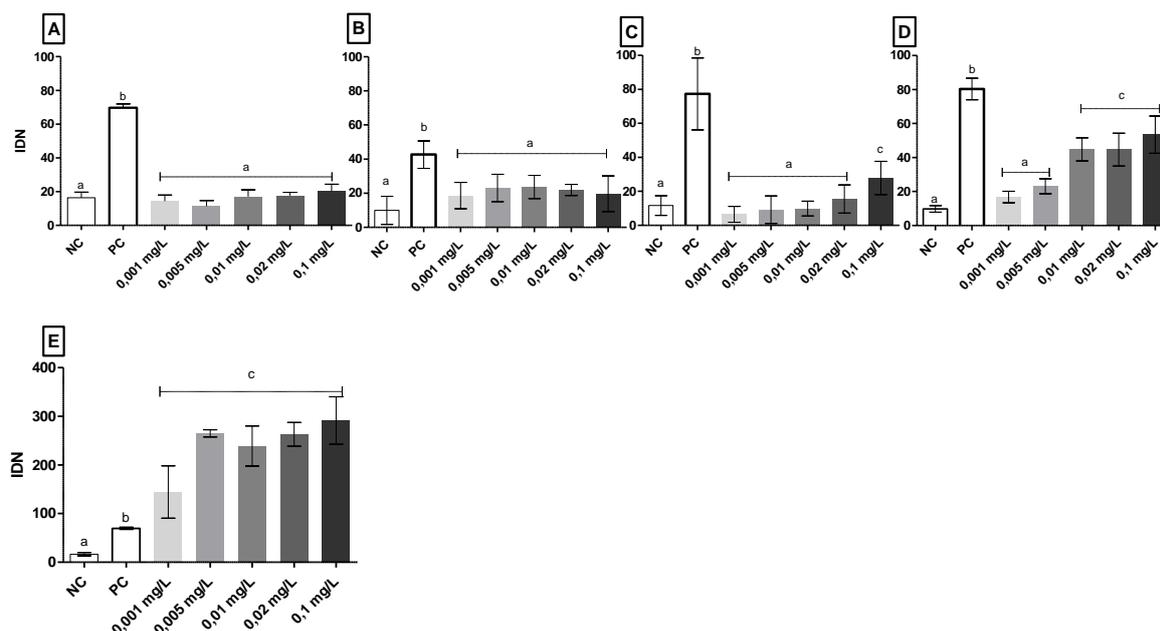


FIGURA 10- Índice de dano ao DNA em células de mexilhão dourado expostos a diferentes concentrações de HgCl_2 . A, Início- 0 dia; B, 7 dias de tratamento; C, 15 dias de tratamento; D, 30 dias de tratamento; e E, 2h- tratamento agudo. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$, considerando resultados significativos com $p<0,05$, (ANOVA; teste de *Post-Hoc* de Tukey).^{a b c} Representam diferenças estatísticas entre as concentrações. NC= Controle Negativo; PC= Controle Positivo.

O teste cometa tem como princípio básico a análise do comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização dentro do núcleo. O teste cometa alcalino ($\text{pH} > 13$) desenvolvido por Singh et al. (1998), torna possível a identificação de danos diretos e indiretos à estrutura do DNA, como lesões por metilação e aductos que, quando alcalilábeis, se apresentam como quebras simples.

Resultados encontrados por Di Dontato et al. (2015) para hemócitos de *gammarus elvirae*, um crustáceo de água doce, verificaram que a exposição por 24, 48 h, 7 e 15 dias a $0,1 \mu\text{g/L}$ de HgCl_2 levou a danos significativos ao DNA, os quais aumentaram com o aumento do tempo de exposição. Também foi verificado um pico na concentração de $0,5 \mu\text{g/L}$ seguido por uma redução no dano na concentração mais elevada testada $1 \mu\text{g/L}$. A esse fenômeno foi sugerida a possibilidade de ter acontecido excisão de bases de DNA (BER). Como pode ser observado, nossos resultados mantiveram-se estáveis no tocante ao dano de DNA a partir da concentração $0,005 \text{ mg/L}$ de HgCl_2 .

O mercúrio pode induzir dano ao DNA através de vários mecanismos. Um deles é o dano oxidativo de moléculas relevantes, devido à geração de radicais livres e ou espécies reativas de oxigênio (EROS), que são formados quando os compostos de mercúrio sofrem influxo celular e passam a interagir com vários tipos moleculares ou ainda, interagir diretamente com proteínas de forma a desnaturá-las ou inviabilizar seu papel fisiológico. Outro mecanismo é através da interação do metal com os processos de reparação do DNA (NERSESYAN et al., 2016).

Resultados encontrados por Villela et al. (2006), que avaliaram a exposição por 24 h do mexilhão ao CuSO_4 nas concentrações de 0,00188, 0,00375 e 0,00750 mg/L, demonstraram um aumento no dano de DNA (teste cometa) nos hemócitos do mexilhão dourado nas mesmas concentrações que induziram um aumento significativo na frequência de MN.

Em estudo realizado por Sarker et al. (2016) sobre cultura de diatomáceas marinhas (algas protistas), em uma faixa de concentração de 30 a 120 ng/L demonstrou que o mercúrio inorgânico (HgCl_2) induziu dano genotóxico a partir do 16º dia (em 20 dias) de exposição, nas concentrações de 90 e 120 ng/L de HgCl_2 .

Os resultados encontrados em nosso estudo corroboram com as observações anteriores de que o dano do DNA em células é um indicador sensível de riscos ambientais. Achados de Bhowmik & Patra (2015) também demonstram que a exposição crônica a concentrações de 2 mg e 5 mg/L de HgCl_2 produziu efeito genotóxico. Também foi observado que o uso combinado de ensaio citogenético e cometa proporcionou uma melhor avaliação da genotoxicidade do HgCl_2 .

Resultados similares aos nossos foram encontrados por Bhagat & Ingole (2013), os quais avaliaram a genotoxicidade do HgCl_2 em células de um molusco marinho (*Planaxis sulcatus*), usando concentrações de 0,01, 0,02, 0,05 e 0,1 mg/L por 24, 48 e 96 horas de exposição *in vivo*. O aumento do dano ao DNA aumentou com o aumento da concentração do metal em todas as concentrações testadas e teve um incremento significativo com o passar do tempo de exposição, a partir da concentração de 0,02 mg/L.

Com base nos resultados obtidos em nosso estudo podemos verificar que o *L. fortunei* pode ser considerado um bom candidato como indicador de genotoxicidade em ambientes contaminados por metais pesados. O *L. fortunei* foi sensível genotoxicamente à contaminação pelo HgCl_2 , pois apresentou danos ao DNA concentração dependente a partir do 15º dia de exposição. Também podemos verificar que quando houve uma exposição drástica ao metal, no caso da administração injetável (exposição aguda), o molusco apresentou ID ao DNA após 2h de exposição, superiores até mesmo ao controle positivo, indicando que o dano ao DNA ocorre de forma precoce, logo após a exposição ao agente genotóxico.

De forma inovadora, demonstramos que a análise dos tecidos do mexilhão dourado se mostrou uma alternativa viável para a avaliação genotóxica, sem contar que seu acesso é muito mais simples que o realizado para utilizar hemolinfa como matriz biológica para as análises. Não obstante, soma-se o fato de que não há preocupação sobre conduta predatória da espécie quanto ao acesso à massa corpórea do mexilhão, uma vez que, como citado anteriormente, é considerado invasivo ao meio (praga).

5.5 MUTAGENICIDADE

As contagens de MN (Figura 11) para a exposição subaguda (0, 7, 15 e 30 dias de exposição à água contaminada com HgCl_2 -Figura 11 A, 11B, 11C e 11D) e para o tratamento agudo (2 h após a administração injetável de solução de HgCl_2 - Figura 11 E), não apresentaram diferenças estatisticamente significativa quando comparadas ao controle negativo, bem como não houve diferença significativa entre os grupos e concentrações testadas.

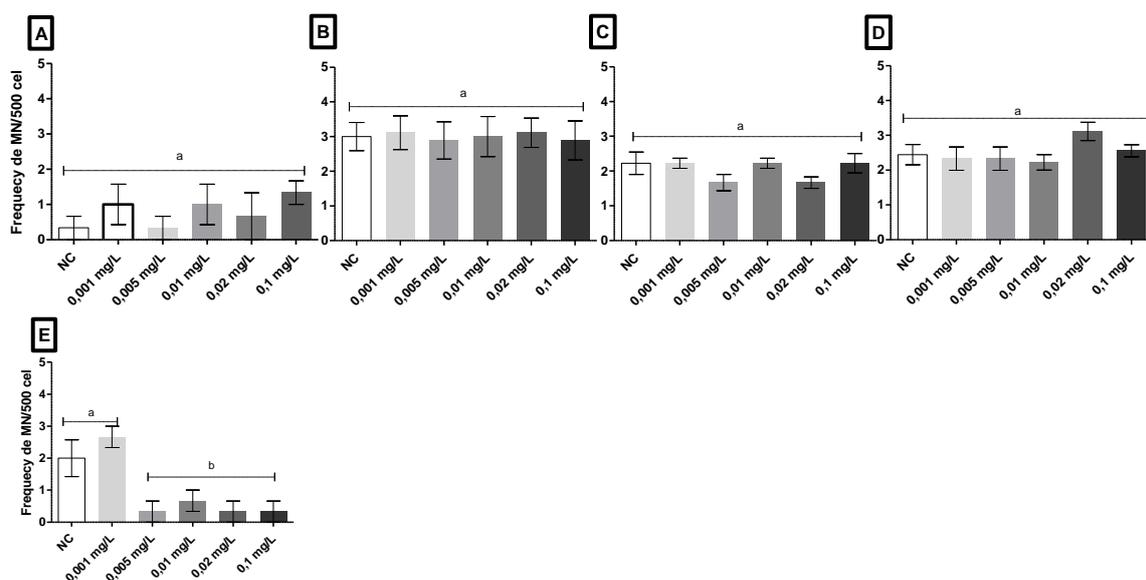


FIGURA 11- Frequência de Micronúcleos em células de mexilhão dourado expostos a diferentes concentrações de HgCl_2 . A, Início- 0 dia; B, 7 dias de tratamento; C, 15 dias de tratamento; D, 30 dias de tratamento; e E, tratamento agudo- 2h. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão, n=3, considerando resultados significativos com $p < 0,05$, (ANOVA - teste de *Post-Hoc* de Tukey). ^{a b c}Representam diferenças estatísticas entre as concentrações. NC= Controle Negativo.

O ensaio de MN é um método simples e rápido, amplamente usado para avaliar o dano cromossômico *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. A técnica consiste na observação das células com um ou vários núcleos citoplasmáticos de menor tamanho e separados do núcleo principal (ROCHA & ROCHA, 2016).

Alguns estudos usando células bivalves mostraram aumento na frequência de MN após exposição laboratorial a diferentes poluentes (BRITO & DA LUZ, 2015; LIU et al., 2014 & VILLELA et al., 2006). Porém, Girardelo et al. (2016) testaram a mutagenicidade de nanopartículas de óxido de titânio em *L. fortunei* e verificaram que o agente tóxico não foi capaz de aumentar a frequência de MN nas concentrações testadas (1 µg/mL a 50 µg/mL de TiO₂), durante 24 h de exposição.

A capacidade de o mercúrio induzir a formação de aberrações cromossômicas (AC), micronúcleos (MN) e danos oxidativos em linfócitos humanos foi abordada por Nersesyan et al. (2016). O nível de efeito mais baixo observado para o mercúrio inorgânico foi de 0,2 mg/L para AC, 0,4 mg/L para MN e 2 mg/L de Hg para danos oxidativos.

Já em experimento testando a toxicidade do CuSO_4 , em 48 h de exposição, a frequência de MN estava diminuída na maior concentração testada (7,5 mg/L). Doses superiores a 7,5 mg/L de CuSO_4 durante 24 e 48 h foram tóxicas, matando todos os animais expostos (VILLELA et al., 2006).

Sabe-se que compostos à base de mercúrio causam estresse oxidativo, que desempenha um papel fundamental para a ativação em cascata durante a lesão celular induzida por mercúrio em diferentes tipos de células e órgãos. Porém, os mecanismos precisos que levam à morte celular e a discriminação das vias envolvidas nos processos de apoptose e necrose induzida por HgCl_2 ainda são desconhecidos (CHEN et al., 2010).

A presença de células necróticas foi identificada no primeiro tratamento após 15 dias de exposição (Figura 12 A). A quantidade de necrose foi significativa em todas as concentrações testadas em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$). Após 30 dias de exposição a quantidade de células necróticas duplicou e, na maior concentração (0,1 mg/L), o número foi triplicado (Figura 12 B).

Já quando sofreu a injeção de metal, no segundo tratamento (Figura 12 C), a existência de células necróticas foi encontrada em todas as concentrações testadas de forma significativa comparada ao controle negativo ($p < 0,05$) e, a partir da concentração de 0,005 mg/L de HgCl_2 similares ao controle positivo.

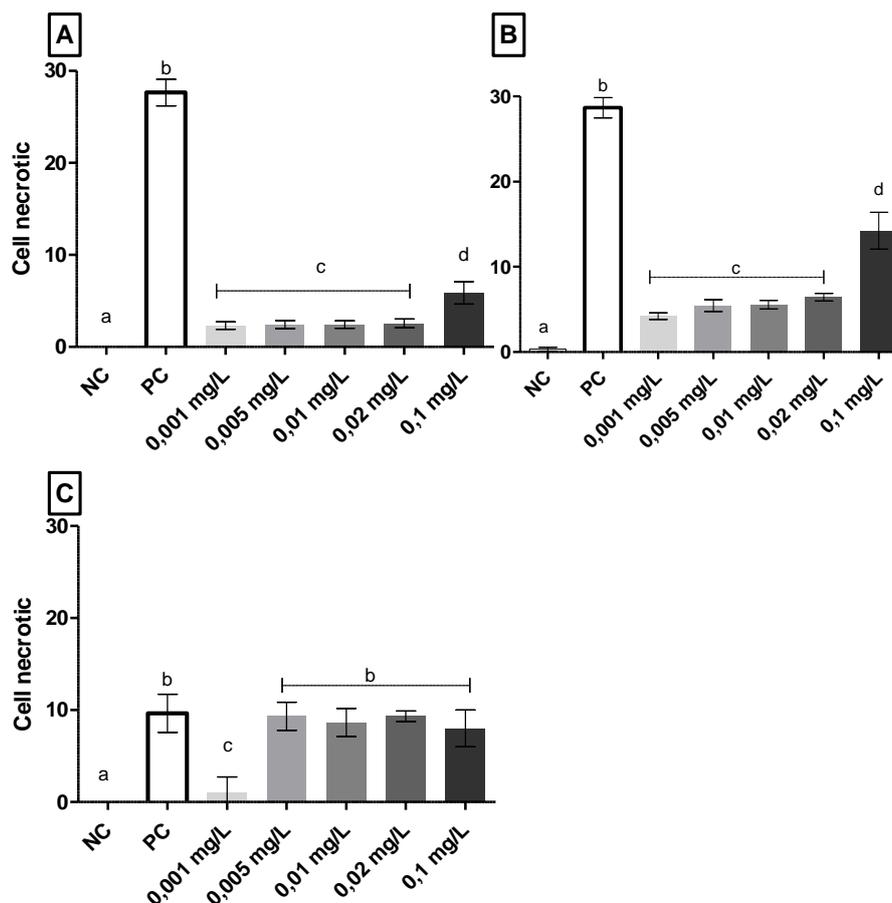


FIGURA 12- Células necróticas em mexilhão dourado expostos a diferentes concentrações de HgCl_2 . A, 15 dias de tratamento; B, 30 dias de tratamento; e C, tratamento agudo- 2 h. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$, considerando resultados significativos com $p<0,05$, (ANOVA - teste de *Post-Hoc* de Tukey). ^{a b c} Representam diferenças estatísticas entre as concentrações. NC= Controle Negativo; PC= Controle Positivo.

A necrose é caracterizada por um inchaço celular e ruptura da célula em que a membrana é o principal sítio do dano (KIM & SHARMA, 2004, CHEN et al, 2010). Chen et al. (2010), demonstraram que a exposição a 0,27 mg/L e 5,43 mg/L de HgCl_2 , foi capaz de induzir apoptose e necrose em cultura de células derivadas de células pancreáticas. Foi sugerido que a alta liberação de ATP, seguida pela diminuição de níveis de ATP sob o dano da membrana plasmática foi responsável pela morte celular por necrose. Os autores também sugeriram que a liberação de lactato desidrogenase das células pode ser um marcador de danos de membrana celular.

Em trabalho realizado por Liu et al. (2014), foram investigados os efeitos genotóxicos de compostos perfluorados (PFC) em mexilhões marinhos. Os resultados demonstraram que os PFC foram capazes de induzir danos ao DNA e apoptose em concentrações superiores a 0,1 mg/L. No entanto, a partir da concentração de 1 mg/L, ocorreu a necrose em detrimento à apoptose.

A ausência de mutagenicidade (Figura 11) nas células de mexilhão dourado, avaliada pelo teste de MN, indica que o HgCl_2 não foi capaz de induzir mutações cromossômicas. Porém, foi capaz de induzir dano ao DNA, avaliados pelo ensaio cometa (Figura 10), já identificado em 7 dias de exposição (exposição subaguda) e após 2 h da exposição forçada ao metal, que aumentou com o aumento da concentração do HgCl_2 . Também foi capaz de induzir citotoxicidade após a injeção das soluções de HgCl_2 nos mexilhões (Figura 9), a qual aumentou proporcionalmente ao tempo de exposição, porém, não induziu citotoxicidade significativa quando os animais foram expostos à água contaminada com o HgCl_2 (Figura 8).

Os resultados da contabilização do número de células em processo necrótico apontam para presença de citotoxicidade e, à primeira impressão, parecem ser conflitantes com os dados gerados da análise da viabilidade celular. Nesse sentido, há necessidade de outros ensaios de forma a complementar esses dados iniciais, contudo, talvez a diferença encontrada esteja relacionada ao número de células que são contabilizadas em cada experimento, sendo 100 células por cada amostra no teste de viabilidade, e 500 células por cada amostra para a contabilização de células em processo necrótico, ambos os testes em triplicata.

6 CONCLUSÕES

A avaliação do potencial toxicológico de amostras ambientais é uma ferramenta importante na avaliação da contaminação ambiental. A padronização de *L. fortunei* como organismo sentinela para o biomonitoramento da genotoxicidade de HgCl_2 nas concentrações de 0,001, 0,005, 0,01, 0,02 e 0,1 mg/L, durante 0, 7, 15 e 30 dias de exposição subaguda e aguda, permite concluir que:

O Hg induziu uma baixa citotoxicidade nas células de *L. fortunei* na maior concentração testada após 7 dias de exposição subaguda. Porém esta citotoxicidade diminuiu gradativamente como o aumento do tempo de exposição até a obtenção de resultados de viabilidade celular semelhantes em todas as concentrações testadas no 30º dia de exposição. Com a exposição aguda do *L. fortunei*, houve a presença de citotoxicidade em todas as concentrações testadas após 2h e aumentou após 7, 15 e 30 dias de exposição ao metal.

O Hg não induziu genotoxicidade no *L. fortunei* em 7 dias de tratamento subagudo em todas as concentrações testadas; Porém, foi verificado um IDN ao DNA significativo na maior concentração testada (0,1 mg/L) em 15 dias e nas concentrações de 0,01, 0,02 e 0,1 mg/L em 30 dias de exposição. Já na exposição aguda ao Hg, houve um aumento de dano (cerca de 10 vezes) em todas as concentrações testadas.

O metal não causou mutagenicidade no *L. fortunei* após 7, 15 e 30 dias de exposição subaguda e também não houve a presença significativa de micronúcleos após a exposição aguda em todos os grupos testados. Já a presença de células necróticas foi identificada em todas as concentrações testadas após 15 dias; e após 30 dias de exposição subaguda, a quantidade de células necróticas teve um incremento de 2x nas concentrações de 0,001 a 0,02 mg/L e de 3x na concentração de 0,1 mg/L. Na exposição aguda ao Hg, a existência de células necróticas foi encontrada em todas as concentrações testadas.

O *L. fortunei* se mostrou um organismo com potencial biomonitor de genotoxicidade causada por metais pesados em ambientes aquáticos, sendo sensível as diferentes concentrações de HgCl_2 . Porém, não foi capaz de induzir resposta quanto à citotoxicidade nas concentrações de Hg testadas, sob exposição semelhante às condições de exposição ambiental. Sendo necessário testes complementares com concentrações superiores de HgCl_2 utilizadas neste trabalho para avaliação da possível utilização como organismo biomonitor de citotoxicidade em ambientes aquáticos.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Quantificar a concentração de Hg presente na água de exposição, antes do tratamento e após os tratamentos com o HgCl₂;
- Avaliar se houve redução na concentração do Hg na água de exposição após os tratamentos com HgCl₂;
- Determinar a quantidade de mercúrio depositada nos tecidos moles do *L. fortunei*, após os tratamentos com HgCl₂;
- Realização de análise morfológica e histológica dos indivíduos antes e após os tratamentos com HgCl₂.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, G. R.; DE ARAÚJO, J. L. F.; NAKAMURA FILHO, A.; GUAÑABENS, A. C. P.; DE CARVALHO, M. D.; CARDOSO, A. V. Functional Surface of the golden mussel's foot: morphology, structures and the role of cilia on underwater adhesion. **Materials Science and Engineering: C**, v. 54, p. 32-42, 2015.
- BARBOSA, N. P.; SILVA, F. A.; OLIVEIRA M. D.; SANTOS NETO, M. A.; CARVALHO, M. D.; CARDOSO, A. V. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae): first record in the São Francisco River basin, Brazil. **Check List**, v.12, n.1, p.1846, 2016.
- BHAGAT, J.; INGOLE, B. S. Genotoxic potency of mercuric chloride in gill cells of marine gastropod *Planaxis sulcatus* using comet assay. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n.14, p. 10758, 2015.
- BHOWMIK, N.; PATRA, M. Assessment of genotoxicity of inorganic mercury in rats in vivo using both chromosomal aberration and comet assays. **Toxicology and industrial health**, v. 31, n. 7, p. 588-594, 2015.
- BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v.7, n.6, p. 1125-1137, 2012.
- BOLTOVSKOY, D.; CORREA, N. Ecosystem impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (golden mussel) in South America. **Hydrobiologia**, v.746, n.1, p.81-95, 2015.
- BORGES, P. D. *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) e o setor elétrico brasileiro: distribuição, impactos, estudo de caso da dispersão no Rio Iguaçu e teste de protocolo de uso de larvas na caracterização do perfil genético de populações- Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Universidade Federal do Paraná, 2014.
- BRASIL, CONAMA Resolução. 430/2011-“Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes”. **Publicação DOU**, n. 92, 2014
- BRASIL, Portaria No. 2914/2011, do Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, v. 12.
- BRITO, L. O.; LUZ, L. D. AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DA QUALIDADE DAS ÁGUAS: USANDO ANÁLISES MOLECULARES. **Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais**, v.3, n.2, p.076-090, 2015.
- BUROW, M. E.; WELDON, C. B.; TANG, Y.; NAVAR, G. L.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C.; HAMMOND, T. G.M.; CLEJAN, S.; BECKMAN, B. S. Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor α -induced Apoptosis among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants. **Cancer Research**, v. 58, n. 21, p. 4940-4946. 1998.

CALAZANS, S. H. C.; AMERICO, J. A.; DA COSTA FERNANDES, F.; ALDRIDGE, D. C.; DE FREITAS REBELO, M. Assessment of toxicity of dissolved and microencapsulated biocides for control of the Golden Mussel *Limnoperna fortunei*. **Marine environmental research**, v. 91, p. 104-108, 2013.

CAPPELLO, T.; PEREIRA, P.; MAISANO, M.; MAUCERI, A.; PACHECO, M.; FASULO, S. Advances in understanding the mechanisms of mercury toxicity in wild golden grey mullet (*Liza aurata*) by ¹H NMR-based metabolomics. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 139-148, 2016.

CHEN, Y. W.; HUANG, C. F.; YANG, C. Y.; YEN, C. C.; TSAI, K. S.; LIU, S. H.; Inorganic mercury causes pancreatic β -cell death via the oxidative stress-induced apoptotic and necrotic pathways. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n.3, p.323-331, 2010.

CORDEIRO, N.; ANDRADE, J.; MONTRESOR, L.; LUZ, D.; ARAÚJO, J.; MARTINEZ, C.; PINHEIRO, J.; VIDIGAL, T. Physiological response of invasive mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Bivalvia: Mytilidae) submitted to transport and experimental conditions. **Brazilian Journal of Biology**, n.AHEAD, p.0-0, 2016.

CUNHA, F. A. G., Biomagnificação do mercúrio na cadeia de um quelônio de água doce (*Chelus fimbriata*) e seu perfil genotóxico em ambientes fluviais do médio rio Negro, Amazonas, Brasil, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior BADPI/INPA, 2015.

DI DONATO, G.; DE MATTHAEIS, E.; RONCI, L.; SETINI, A. Genotoxicity biomarkers in the amphipod *Gammarus elvirae* exposed in vivo to mercury and lead, and basal levels of DNA damage in two cell types. **Chemistry and Ecology**, v. 32, n. 9, p. 843-857, 2016.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 80–92, 2009.

GAZULHA, V., O mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) na presença de cianobactérias: taxas de filtração, comportamento alimentar e sobrevivência. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

GIRARDELLO, F.; LEITE, C. C.; VILLELA, I. V.; DA SILVA MACHADO, M.; JUCHEM, A. L. M.; ROESCH-ELY, M.; SALVADOR, M., HENRIQUES, J. A. P. Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p.223-228, 2016.

GÜEZ, C. M.; WACZUK, E. P.; PEREIRA, K. B.; QUEROL, M. V. M.;ROCHA, J. B. T. D.;OLIVEIRA, L. F. S. In vivo and in vitro genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n.3, p.461-467, 2012.

HUSSAIN, B.; SULTANA, T.; SULTANA, S.; AL-GHANIM, K. A.; MASOOD, S.; ALI, M.; MAHBOOB, S. Microelectrophoretic study of environmentally induced DNA damage in fish and its use for early toxicity screening of freshwater bodies. **Environmental monitoring and assessment**, v. 189, n.3, p.115, 2017.

IUMMATO, M. M.; DI FIORI, E.; SABATINI, S. E.; CACCIATORE, L. C.; COCHÓN, A. C.; DE MOLINA, M. D. C. R.; JUÁREZ, Á. B. Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 95, p. 123-129, 2013.

KIM, S. H.; SHARMA, R. P. Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 196, n.1, p. 47-57, 2004.

LI, P.; GAO, X. Trace elements in major marketed marine bivalves from six northern coastal cities of China: concentrations and risk assessment for human health. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 109, p. 1-9, 2014.

LIMA, L. L.; QUEROL, E.; OLVEIRA, E. Ocorrência de *Limnoperna fortunei* (dunker,1857) (mollusca, mytilidae) no Rio Quaraí, município de Barra do Quaraí, Rio Grande do Sul, Brasil, **Biodiversidade Pampeana**, v. 6, n. 1, p. 50-52, 2008.

LIU, C.; CHANG, V. W.; GIN, K. Y.; NGUYEN, V. T. Genotoxicity of perfluorinated chemicals (PFCs) to the green mussel (*Perna viridis*). **Science of the Total Environment**, v. 487, p. 117-122, 2014.

LIU, H. H.; HE, J. Y.; CHI, C. F.; SHAO, J. Differential HSP70 expression in *Mytilus coruscus* under various stressors. **Gene**, v. 543, n.1, p. 166-173, 2014.

MANSUR, M. C. D. et al, Moluscos Límnicos invasores no Brasil- Biologia, prevenção e controle. **Porto Alegre: Redes Editora**, 2012.

MARENGONI, N. G.; KLOSOWSKI, E. S.; OLIVEIRA, K. P.; CHAMBO, A. P. S.; GONÇALVES JR, A. C. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu binacional. **Quim. Nova**, v. 36, n. 3, p. 359-363, 2013.

MOLINA, F. R.; PAGGI, J. C.; DEVERCELLI, M. Zooplanktophagy in the natural diet and selectivity of the invasive mollusk *Limnoperna fortunei*, **Biol Invasions**, v.12, n. 6, p. 1647–1659, 2010.

MONTRESOR, L. C.; MIRANDA-FILHO, K. C.; PAGLIA, A.; LUZ, D. M.; ARAÚJO, J. M., SILVA; M. J. D. S., GERHARD, L.; MARTINEZ, C. B.; VIDIGAL, T. H. Short-term toxicity of ammonia, sodium Hydroxide and a commercial biocide to golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 92, p. 150-154, 2013.

MORTON, B. The Biology and Anatomy of *Limnoperna fortunei*, a Significant Freshwater Bioinvader: Blueprints for Success. *Limnoperna Fortunei*.**Springer**, p.3-41, 2015.

NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; WALDHERR, M.; SETAYESH, T.; MIŠÍK, M.; WULTSCH, G.; KNASMUELLER, S. Results of micronucleus assays with individuals who are occupationally and environmentally exposed to mercury, lead and cadmium. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v.770, p. 119-139, 2016.

OLIVEIRA, M. D.; CALHEIROS, D. F.; JACOBI, C. M.; HAMILTON, S. K. Abiotic factors controlling the establishment and abundance of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei*. **Biol Invasions**, v. 13, n.3, p. 717–729, 2011.

OLSVIK, P. A.; WAAGBØ, R.; HEVRØY, E. M.; REMØ, S. C.; SØFTELAND, L.. In vitro Assessment of Hg Toxicity in Hepatocytes from Heat-Stressed Atlantic Salmon. **Biological trace element research**, v. 174, n.1, p. 226-239, 2016.

PAZ, Y. M.; DE MACEDO ALMEIDA, M.; EL-DEIR, S. G. Monitoramento de efluentes industriais através do uso da carpa-comum (*Cyprinus carpio Linnaeus, 1758*) como bioindicador. **XXXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção, Enegep**, 2013.

PEREIRA, E. R.; SOARES, B. M.; VIEIRA, P. J.; MAI, A. C. G.; PICOLOTO, R. S.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M.; DUARTE, F. Assessment of Inorganic Contaminants in Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*) in Southern Brazil, **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n.5, p. 846-853, 2012.

PEREIRA, L. P.; SILVA, F. E. B.; FLORES, E. M. M.; SCHREKKER, H. S.; MACHADO, M. M.; OLIVEIRA, L. F. S. *In vitro* ZnCl₂ cytotoxicity and genotoxicity in human leukocytes: Zero-order kinetic cellular zinc influx, **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.37, n.1, p. 63-68, 2015.

POURANG, N.; RICHARDSON, C. A.; CHENERY, S. R. N.; NASROLLAHZEDEH, H. Assessment of trace elements in the shell layers and soft tissues of the pearl oyster *Pinctada radiata* using multivariate analyses: a potential proxy for temporal and spatial variations of trace elements. **Environ Monit Assess**, v.186, n.4, p. 2465-2485, 2014.

QUEROL, M. V. M.; PESSANO, E. F. C.; GRALHA, T. S.; MULLER, I. T. G.; MANSUR, M. C. D. Ocorrência de *Limnoperna fortunei* (Mollusca, Mytilidae), no rio Uruguai, município de Uruguaiana, Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, Pampa Brasileiro, **Biotemas**, v.26 n.3, p. 249-254, 2013.

RAMOS, A. M., Determinação de metais em águas de abastecimento público: um estudo de caso, município de Ouro Preto, Dissertação de Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, 2016.

RAULT, P.; FORTIER, M.; PÉDELUCQ, J.; LACAZE, E.; BROUSSEAU, P.; AUFFRET, M.; FOURNIER, M. Immunotoxicity of heavy metals (silver, cadmium, mercury and lead) on marine bivalve *Mytilus edulis*: in vitro exposure of hemocytes. **Journal of Xenobiotics**, v.3, n.1S, p-8, 2013.

ROCHA, S. M.; ROCHA, C. A. M., Micronucleus test in bivalve mollusks as an important tool for xenobiotic exposure risk assessment. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.4, n.1, p. 70-79, 2016.

ROCHA, T. L.; GOMES, T.; SOUSA, V. S.; MESTRE, N. C.; BEBIANNO, M. J. Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: an overview. **Marine environmental research**, v. 111, p. 74-88, 2015.

ROMBALDI, C.; DE OLIVEIRA ARIAS, J. L.; HERTZOG, G. I.; CALDAS, S. S.; VIEIRA, J. P.; PRIMEL, E. G. New environmentally friendly MSPD solid support based on golden mussel shell: characterization and application for extraction of organic contaminants from mussel tissue. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 16, p. 4805-4814. 2015.

RÜCKERT, G.; CAMPOS, M. C. S.; ROLLA, M. E. Alimentação de *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857): taxas de filtração com ênfase ao uso de Cyanobacteria, **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.26, n.4, p. 421-429, 2004.

SANTOS, C. P. Avaliação da densidade e crescimento populacional do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) em suas diferentes fases de vida no lago Guaíba, município de Porto Alegre, RS, como subsídios ao controle do bivalve invasor- Dissertação de Mestrado- Programa de Pós- Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

SANTOS, C. P. dos; MANSUR, M. C. D.; WÜRDIG, N. L. Variações no comprimento dos indivíduos de uma população do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae), ao longo do ano, na praia do Veludo, Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 3, p. 389-396, 2008.

SARKER, S.; DESAI, S. R.; VERLECAR, X. N.; SARKER, M. S.; SARKAR, A. Mercury-induced genotoxicity in marine diatom (*Chaetoceros tenuissimus*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n.3, p. 2770-2777, 2016.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v.31, n.1, p. 9-15, 1975.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental cell research**. v.175, n.1, p.184–191, 1998.

SOARES, M. DE F.; PEREIRA, D.; DOS SANTOS, C. P.; MANSUR, M. C. D.; PIRES, M.; BREINTENBACH, J. O.; GRESPAN, C. Toxicidade do sulfato de cobre ao mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), em água bruta., **J. Braz Soc. Ecotoxicol** v. 4, n. 1-3, p.37-48, 2009.

SYLVESTER, F.; CATALDO, D. H.; NOTARO, C.; BOLTOVSKOY, D. Fluctuating salinity improves survival of the invasive freshwater golden mussel at high salinity: implications for the introduction of aquatic species through estuarine ports. **Biological invasions**, v. 15, n. 6, p. 1355-1366, 2013.

ULIANO-SILVA, M.; AMERICO, J. A.; BRINDEIRO, R.; DONDERO, F.; PROSDOCIMI, F.; DE FREITAS REBELO, M. Gene discovery through transcriptome sequencing for the invasive mussel *Limnoperna fortunei*. **PloS one**, v. 9, n.7, p. e102973, 2014.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; DA SILVA, J; HENRIQUES, J. A. P. DNA damage and

repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, n.1, p. 78-86, 2006.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; DIAS, J. F.; HENRIQUES, J. A. P.; DA SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 628, n. 2, p. 76-86, 2007.

XU, M.; WANG, Z.; ZHAO, N.; PAN, B. Growth, reproduction, and attachment of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*) in water diversion projects. **Acta Ecologica Sinica**, v.35, n.4, p. 70-75, 2015.