

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação

**ESTUDOS GENOTÓXICOS EM *PERNA PERNA* (MOLLUSCA, BIVALVIA)  
COMO INDICADORES DA QUALIDADE AMBIENTAL E SUA IMPORTÂNCIA  
NA MALACOCULTURA**

Juan Manuel Gutiérrez Moreno

2017



UFRJ

**ESTUDOS GENOTÓXICOS EM *PERNA PERNA* (MOLLUSCA, BIVALVIA)  
COMO INDICADORES DA QUALIDADE AMBIENTAL E SUA IMPORTÂNCIA  
NA MALACOCULTURA**

Juan Manuel Gutiérrez Moreno

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-Orientadores: Maurício Mussi Molisani e Moisés Basilio da Conceição

Macaé

Março, 2017

**ESTUDOS GENOTÓXICOS EM *PERNA PERNA* (MOLLUSCA, BIVALVIA)  
COMO INDICADORES DA QUALIDADE AMBIENTAL E SUA IMPORTÂNCIA  
NA MALACOCULTURA**

Juan Manuel Gutiérrez Moreno

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-Orientadores: Maurício Mussi Molisani e Moisés Basilio da Conceição

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovado por:

---

Presidente, Profa. Laura Isabel Weber da Conceição - UFRJ

---

Titular interno, Prof. Aricelso Maia Limaverde Filho

---

Titular externo, Prof. Manildo Marcião de Oliveira- IFF

Macaé, RJ

Março, 2017

Juan Manuel Gutiérrez Moreno

Estudos genotóxicos em *Perna perna* (mollusca, bivalvia) como indicadores da qualidade ambiental e sua importância na malacocultura/ Juan Manuel Gutiérrez Moreno – Macaé: 2016.

99 f.:29,7 cm.

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-Orientadores: Maurício Mussi Molisani e Moisés Basilio da Conceição

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, 2017.

Referências Bibliográficas: f. 83-99.

1. Ensaio cometa. 2. Teste do micronúcleo. 3. *Perna perna* 4. Malacocultura. 5. Rio de Janeiro.

I. Weber, Laura Isabel da Conceição. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação. III. Estudos genotóxicos em *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia) como indicadores da qualidade ambiental e sua importância na malacocultura.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Coordenadoria de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de Mestrado; ao Projeto E-26/010.001977/2014, apoio a temas prioritários para o Governo do Estado de Rio de Janeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ e a Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa – PROAP/UFRJ, pelo financiamento de parte deste estudo e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais e Conservação – PPGCIAC.

Agradeço especialmente a minha orientadora Dra, Laura Weber e meus co-orientadores: Dr. Maurício Mussi Molisani e Dr. Moisés Basilio da Conceição, pela dedicação e entusiasmo com que me orientaram durante todo o meu mestrado, proporcionando todos os meios para a realização deste estudo, além da relação de amizade e os bons momentos vividos.

Agradeço aos diferentes trabalhadores das fazendas de malacocultura, que me proporcionaram os mexilhões para desenvolver este trabalho.

Por último, agradeço aos colegas e amigos do NUPEM que tive o prazer de conhecer nestes dois anos de mestrado.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iv
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
RESUMEN .....	xvi
I. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1 Toxicologia ambiental .....	1
1.2 Genética toxicológica .....	2
1.3 Indicadores biológicos de poluição .....	4
1.4 Biomarcadores de genotoxicidade.....	5
1.5 Mexilhões como bioindicador de poluição.....	7
1.6 Espécie alvo de estudo.....	8
1.7 Bioensaios com organismos da espécie <i>Perna perna</i> .....	10
1.7 Objetivo Geral .....	11
II. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE GENOTÓXICA DO MEXILHÃO <i>PERNA PERNA</i> EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.....	12
2.1 INTRODUÇÃO.....	12
2.1.1 Importância dos bioensaios na genotoxicidade .....	12
2.1.2 Fatores fisiológicos dos mexilhões e sua relação com os poluentes .....	12
2.1.3 Metil metanosulfonato.....	14
2.1.4 Objetivo específico .....	14
2.2 MATERIAS E MÉTODOS .....	15
2.2.1 Experimento I – Avaliação da sensibilidade e do tempo de resposta do mexilhão <i>Perna perna</i> e quando exposto a diferentes concentrações de MMS.....	15
2.2.2 Experimento II – Determinação da sensibilidade de diferentes classes de tamanho do mexilhão <i>Perna perna</i> ao MMS (metil metanosulfonato).....	16
2.2.3 Coleta de hemolinfa dos mexilhões.....	17
2.2.4 Ensaio do cometa (EC) .....	17
2.2.5 Teste do micronúcleo (MN) .....	18
2.2.6 Análises estatísticas .....	18

2.3 RESULTADOS .....	19
2.3.1 Experimento I – Sensibilidade e tempo de resposta do mexilhão <i>Perna perna</i> e em diferentes concentrações de MMS.....	19
2.3.2 Experimento II – Sensibilidade ao MMS por classe de tamanho em adultos do mexilhão <i>Perna perna</i> . .....	25
III. AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DE MEXILHÕES <i>PERNA PERNA</i> CULTIVADOS EM DIFERENTES FAZENDAS DE MALACOCULTURA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. ....	31
3.1 INTRODUÇÃO.....	31
3.1.1 Malacocultura .....	31
3.1.2 Malacocultura no estado do Rio de Janeiro.....	32
3.1.3 Armação dos Búzios .....	33
3.1.4 Arraial do Cabo .....	34
3.1.5 Niterói.....	35
3.1.6 Objetivos específicos.....	36
3.2 MATÉRIAS E MÉTODOS .....	37
3.2.1 Áreas de estudo.....	37
3.3 RESULTADOS .....	38
IV. AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DE MEXILHÕES <i>PERNA PERNA</i> EM DIFERENTES COSTÕES ROCHOSOS DA CIDADE DE MACAÉ. ....	43
4.0 INTRODUÇÃO.....	43
4.1.1 Estudos de biomonitoramento genotóxico com mexilhões .....	43
4.1.2 Macaé.....	44
4.1.3 Estuário do Rio Macaé .....	44
4.1.4 Praia Campista.....	45
4.1.5 Praia das Pedrinhas .....	46
4.1.6 Ilha do francês .....	47
4.1.7 Objetivos específicos.....	47
4.2 METODOLOGIA.....	48
4.2.1 Coleta e processamento dos organismos .....	48
4.3 RESULTADOS .....	49

V. DISCUSSÃO GERAL.....	56
5.1 Bioensaios e sua importância em reconhecer efeitos genotóxicos.....	56
5.2 Efeito do tamanho e do gênero na sensibilidade a agentes genotóxicos .....	58
5.3 Avaliação da qualidade das águas nas fazendas de cultivo a través de análise genotóxico .....	59
5.4 Utilização ensaios genotóxicos em estudos de biomonitoramento de ambientes naturais .....	61
VI. CONCLUSÕES.....	64
VII. REFÊRENCIAS.....	65



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Diferentes níveis de dano no material genético observados como cometas (nucleóides) com caudas de diferente comprimento em hemócitos do mexilhão *P. perna*. Aumento X400, corado com DAPI e visualizado com fluorescência. Fotos correspondentes ao atual trabalho..... 6
- Figura 2. Hemócitos do mexilhão *P. perna*. Em destaque um hemócito com dois micronúcleos. Aumento X400; corado com brometo de etídio e visualizado com fluorescência. Fotos correspondentes ao atual trabalho. .... 7
- Figura 3. Distribuição mundial do mexilhão *P. perna*. Extraído e modificado de Resgalla Jr et al. (2008)..... 9
- Figura 4. Diagrama do Experimento I. O número de indivíduos na coluna da esquerda representa o total de indivíduos processados por tratamento e o número nas linhas representa os indivíduos processados por tempo de exposição e tratamento (n=4). 15
- Figura 5. Diagrama do Experimento II, mostrando a distribuição de tratamentos. 12 indivíduos (4 de cada tamanho) foram analisados ao segundo e quarto dia de tratamento. .... 16
- Figura 6. Média e erro da % DNA na cauda dos cometas em hemócitos de mexilhões *P. perna* expostos a diferentes concentrações de MMS ao longo de 12 dias de exposição (n=4 para cada tratamento/tempo). (\*) diferenças significativa (p<0,05) do tratamento com MMS em relação ao controle..... 22
- Figura 7. Média e erro da média do número de MN/1000 hemócitos de mexilhões *P. perna* expostos a diferentes concentrações de MMS ao longo de 12 dias (n=4 para cada tratamento/tempo). (\*) diferença significativa (p<0,05) do tratamento com MMS em relação ao controle..... 24
- Figura 8. Média e erro da % DNA na cauda dos cometas em hemócitos de mexilhões *P. perna* expostos a 33 mg/L de MMS após dois e quatro dias de exposição com seus respectivos controles negativos (n=4 para cada tratamento/tempo). (\*) Diferença significativa (p<0,05) do tratamento com MMS em relação ao controle..... 27
- Figura 9. Média e erro da média do número de MN/1000 em hemócitos de mexilhões *Perna perna* expostos a 33 mg/L de MMS após dois e quatro dias de exposição com seus respectivos controles negativos (n=4 para cada tratamento/tempo). (\*) Diferença significativa (p<0,05) do tratamento com MMS em relação ao controle..... 29
- Figura 10. Localização das fazendas de cultivo de mexilhões no estado de Rio de Janeiro: a) Praia Grande, Niterói, b) Praia do Forno, Arraial do Cabo e c) Praia Rasa, Armação dos Búzios. Modificado de Google Maps ..... 37
- Figura 11. Média e erro da média das % DNA na cauda dos cometas em hemócitos de mexilhões *P. perna* coletados nas fazendas marinhas de cultivo de Búzios, Arraial do Cabo e Niterói. Período de coleta: Final da Primavera e Final do Verão. (n=10 para cada sitio).

Diferenças significativas: (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,0005$ ) das fazendas comparadas com a fazenda de Búzios .....	39
Figura 12. Média e erro da média dos MN em 1000 hemócitos de indivíduos de <i>P. perna</i> coletados nas fazendas marinhas de cultivo de Búzios, Arraial do Cabo e Niterói. Período de coleta: final da primavera e final do verão (n=10 para cada sitio). Diferença significativa: (* $p < 0,05$ ;) das fazendas comparadas com a fazenda de Búzios.....	41
Figura 13. Pontos de coleta localizados na cidade de Macaé e regiões próximas, 1:Estuário do Rio Macaé; 2: Praia Campista; 3: Praia das Pedrinhas e 4: Ilha do Francês (Arquipélago do Santana). Modificado de Google Maps. ....	48
Figura 14. Média e erro da média das % DNA na cauda dos cometas em hemócitos de mexilhões <i>P. perna</i> coletados na cidade de Macaé e regiões próximas em dois períodos do ano. (n=10 para cada coluna). Diferenças significativas (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,005$ ; *** $p < 0,0005$ ) em relação ao Arquipélago do Santana. ....	52
Figura 15. Média e erro da média dos MN em 1000 hemócitos de indivíduos de <i>P. perna</i> coletados na cidade de Macaé e regiões próximas em dois períodos do ano (setembro e dezembro do 2017). (n=20 para cada sitio). Diferenças significativas (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,005$ ) em relação ao Arquipélago do Santana.....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Comprimento total e peso médio; e o número de machos e fêmeas utilizados em cada tratamento.....	19
Tabela 2: Análises estatísticas do Experimento I (Teste U de Man Whitney) comparando a média da % DNA dos cometas entre as diferentes concentrações de MMS e com os controles negativos para os dias 1, 3, 6 e 12 do experimento.....	21
Tabela 3: Análises estatísticas do Experimento I (Teste U de Man Whitney) comparando a média da frequência de MNs entre as diferentes concentrações de MMS e com os controles negativos para os dias 1, 3, 6 e 12 do experimento. ....	23
Tabela 4: Comprimento e peso médios e número de fêmeas e machos dos organismos analisados para cada tratamento. ....	25
Tabela 5: Análises estatísticas do Experimento II (Teste U de Man Whitney) comparando a % DNA dos cometas entre os organismos tratados com MMS e os controles negativos e entre os diferentes tamanhos.....	26
Tabela 6: Análises estatísticas do Experimento II (Teste U de Man Whitney) comparando o número de MN entre os organismos tratados com MMS e os controles negativos e entre os diferentes tamanhos. ....	28
Tabela 7: Correlação de Spearman entre o dano genotóxico e o comprimento peso médios e sexo dos organismos expostos durante dois e quatro dias a 33 mg/L de MMS. Sobre a diagonal para a % DNA na cauda dos cometas; abaixo da diagonal para o número de MN/1000. Em negrito as correlações significativas.....	30
Tabela 8: Comprimento e peso médios e número de fêmeas e machos dos organismos analisados para cada fazenda nas 4 temporadas de coleta.....	38
Tabela 9: Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando a % DNA dos cometas entre os organismos cultivados nas diferentes fazendas para cada temporada. ....	39
Tabela 10: Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando o número de MNs entre os organismos cultivados nas diferentes fazendas para cada temporada.....	40
Tabela 11: Correlação de Spearman entre o dano genotóxico e o comprimento peso médios e sexo dos organismos cultivados na fazenda de Niterói nas 4 temporadas de cultivo. Sobre a diagonal para a % DNA na cauda dos cometas; abaixo da diagonal para o número de MN/1000. Em negrito as correlações significativas.....	42
Tabela 12: Media e desvio padrão dos parâmetros ambientais para as duas coletas (setembro e dezembro do 2017). ....	49
Tabela 13: Comprimento e peso médios e quantidade de fêmeas e machos dos organismos analisados para cada sitio e data. ....	50
Tabela 14: Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando a % DNA dos cometas das duas temporadas para cada ponto de coleta. ....	50

Tabela 15: Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando a % DNA dos cometas entre os diferentes pontos de coleta para cada temporada.....	51
Tabela 16: Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando a frequência de MN das duas temporadas para cada ponto de coleta. ....	53
Tabela 17: Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando a frequência de MN entre os diferentes pontos de coleta para cada temporada. ....	53
Tabela 18: Correlação de Spearman entre o dano genotóxico e o comprimento peso médios e sexo dos organismos coletados do estuário do Rio Macaé nas duas temporadas de coleta. Sobre a diagonal para a % DNA na cauda dos cometas; abaixo da diagonal para o número de MN/1000. Em negrito as correlações significativas. ....	55

## RESUMO

### ESTUDOS GENOTÓXICOS EM *PERNA PERNA* (MOLLUSCA, BIVALVIA) COMO INDICADORES DA QUALIDADE AMBIENTAL E SUA IMPORTÂNCIA NA MALACOCULTURA

Juan Manuel Gutiérrez Moreno

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-Orientadores: Maurício Mussi Molisani e Moisés Basilio da Conceição

Resumo da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Muitos dos contaminantes que chegam nos ecossistemas costeiros tem a capacidade de danificar direta ou indiretamente o material genético dos organismos aquáticos. Através de biomarcadores de genotoxicidade, tais como o ensaio do cometa (EC) e o teste do micronúcleo (MN), podem ser avaliados os efeitos dos compostos genotóxicos nos organismos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi contribuir ao biomonitoramento e avaliação da qualidade ambiental de fazendas de malacocultura e de ambientes naturais no estado de Rio de Janeiro, através da análise de dano genotóxico em mexilhões da espécie *Perna perna*. Através de bioensaios, foram determinados os tempos de resposta da espécie frente a diferentes concentrações do composto genotóxico metil metanosulfonato (MMS), composto usualmente utilizado como controle positivo. Avaliando a genotoxicidade do MMS através do EC, os organismos apresentaram seus máximos valores de dano (% DNA na cauda dos cometas) nos primeiros três e seis dias de exposição, enquanto através do teste de MN, os máximos valores aconteceram a partir do sexto dia em diante, evidenciando diferenças na avaliação de cada teste. Não houve uma correlação entre o dano genotóxico e

o comprimento, peso e sexo dos mexilhões de acordo com os biomarcadores utilizados. No estudo de biomonitoramento, os mexilhões cultivados em Niterói apresentaram os máximos valores de dano genotóxico, diferenciando-se das fazendas de cultivo de Búzios e Arraial do Cabo para todas as temporadas de coleta. Estes resultados reafirmam os dados de poluição já existentes na área, evidenciando as desfavoráveis condições ambientais que as águas de Niterói tem para o cultivo de mexilhões. O estudo realizado em Macaé e regiões próximas, demonstraram altos valores de dano genotóxico nos mexilhões coletados no estuário do Rio Macaé, diferenciando-se dos baixos valores obtidos para o Arquipélago de Santana. Estes altos valores estão relacionados com as diferentes fontes de poluição liberadas no curso do Rio Macaé, assim como também com a atividade petroleira da região. As praias Campista e Pedrinhas apresentaram valores intermédios nos seus biomarcadores genotóxicos, gerando uma preocupação na qualidade futura destas áreas.

Palavras chave: ensaio do cometa, teste do micronúcleo, *Perna perna*, Malacocultura, Rio de Janeiro.

Macaé, RJ  
Março, 2017

## ABSTRACT

### GENOTOXICITY STUDIES IN *PERNA PERNA*(MOLLUSCA, BIVALVIA) AS INDICATOR OF ENVIRONMENTAL QUALITY AND ITS IMPORTANCE IN THE MALACOCULTURE

Juan Manuel Gutiérrez Moreno

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-Orientadores: Maurício Mussi Molisani e Moisés Basilio da Conceição

*Abstract* da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Many of the contaminants that arrive in coastal ecosystems have the capacity to affect directly or indirectly the genetic material of the aquatic organisms. Through genotoxicity biomarkers, such as comet assay (CA) and the micronucleus test (MN), can be evaluated the effects of genotoxic compounds in the organisms. In this context, the objective of this study was to contribute to the biomonitoring and evaluation of the environmental quality of malacoculture farms and natural environments in the Rio de Janeiro state, through the analysis of genotoxic damage in mussels of the species *Perna perna*. Through bioassays, the response times of the species were determined against different concentrations of the genotoxic compound methyl methanesulfonate (MMS), compound usually used as positive control. Assessing the genotoxicity of MMS through the CA, the organisms presented their maximum damage values (% DNA in the tail of the comets) in the third to the sixth day of exposure while using the MN test, the maximum values occurred from the sixth day, evidencing differences in the evaluation of each test.

There was no correlation between the genotoxic damage and the length, weight and sex of the mussels according to the biomarkers used. In the biomonitoring study, the mussels cultivated in Niterói presented the maximum values of genotoxic damage, differentiating themselves from the farms of Búzios and Arraial do Cabo for all the collection seasons. These results reaffirm the pollution data already existing in this area, evidencing the bad environmental conditions that the waters of Niterói for the cultivation of mussels. The study carried out in Macaé and nearby regions showed high values of genotoxic damage in the mussels collected in the Macaé estuary, differing from the low values obtained for the Santana Archipelago. These high values are related to the different sources of pollution released in the course of Macaé River, as well with the oil activity in the region. The beaches Campista and Pedrinhas presented intermediate values in their genotoxic biomarkers, generating a concern in the future quality of these areas.

Keywords: comet assay, micronucleus test, *Perna perna*, malacoculture, Rio de Janeiro.

Macaé, RJ  
Março, 2017



## RESUMEN

### ESTUDIOS GENOTÓXICOS EN PERNA PERNA (MOLLUSCA, BIVALVIA) COMO INDICADOR DE CALIDAD AMBIENTAL Y SU IMPORTANCIA EN LA MALACOCULTURA

Juan Manuel Gutiérrez Moreno

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-Orientadores: Maurício Mussi Molisani e Moisés Basilio da Conceição

*Resumen* da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Muchos de los contaminantes que llegan a los ecosistemas costeros, tienen la capacidad de dañar directa o indirectamente el material genético de los organismos acuáticos. A través de biomarcadores de genotoxicidad, como el ensayo cometa (EC) y el test de micronúcleo (MN), se pueden medir los efectos de estos compuestos genotóxicos provocan en los organismos. En este contexto, el objetivo de este estudio fue contribuir al biomonitorio y medida de la calidad ambiental en áreas de malacocultura y de ambientes naturales en el estado de Rio de Janeiro, mediante el análisis de daño genético en mejillones de la especie *Perna perna*. A través de bioensayos se determinó los tiempos de respuesta de la especie frente a diferentes concentraciones del compuesto genotóxico metil metanosulfonato (MMS), compuesto usualmente utilizado como control positivo. Evaluando la genotoxicidad del MMS a través del EC, los organismos presentaron sus máximos valores de daño (% DNA en la cola del cometa) en los primeros tres y seis días de exposición al MMS, en cuanto a través el test de MN, los máximos valores fueron del sexto día en adelante, evidenciando diferencias en las características de cada ensayo. No

hubo una correlación entre el largo, peso y sexo de los mejillones de acuerdo con los biomarcadores utilizados. En el estudio de biomonitorio, los mejillones cultivados en Niterói presentaron los máximos valores de daño genético, diferenciándose de las áreas de cultivo de Búzios y de Arraial do Cabo para todas las temporadas de colecta. Estos resultados reafirman los datos ya existentes de contaminación en esta área, evidenciando las desfavorables condiciones ambientales que las aguas de Niterói tienen para cultivar mejillones. El estudio realizado en Macaé y regiones cercanas, demostraron altos valores de daño genético en mejillones colectados en el estuario del Rio Macaé, diferenciándose de los bajos valores obtenidos para el Archipiélago de Santana. Estos altos valores están relacionados a las diferentes fuentes de contaminación presentes en el curso del Rio Macaé, así como también con la actividad petrolera de la región. Las playas Campista y Pedrinhas presentaron valores intermedios en sus biomarcadores, generando una preocupación en la calidad futura de estas áreas.

Palabras claves: ensayo cometa, test de micronúcleo, *Perna perna*, malacocultura, Rio de Janeiro.

Macaé, RJ  
Março, 2017

# I. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Toxicologia ambiental

A toxicologia ambiental é o estudo do impacto dos poluentes sobre a estrutura e função dos sistemas biológicos, avaliando esse impacto ao nível molecular, do organismo, da comunidade e até no nível ecossistêmico (Costa et al., 2008). Este impacto pode ser analisado como uma sequência de etapas que definem uma sucessão de eventos. A primeira etapa avalia a disponibilidade do composto químico (xenobiótico) introduzido no ambiente para o organismo. Esta interação é definida pelas características do xenobiótico (hidrossolubilidade, coeficiente de partição, grau de ionização e tamanho da molécula), assim como seu grau de toxicidade e sua dose disponível no ambiente que determinaram as vias de entrada e transporte do mesmo no organismo. A seguinte etapa corresponde à interação do xenobiótico com seu sítio de ação. Geralmente o sítio de ação é uma proteína particular ou outra molécula que interage com o poluente. Os efeitos produzidos pelo xenobiótico com o sítio de ação ao nível molecular, pode determinar efeitos em níveis superiores de organização (Landis e Yu, 2003).

O ambiente pode exercer funções de filtração, decomposição, neutralização e armazenamento de determinados xenobióticos. Desta maneira, pode reduzir em certo grau o seu efeito nocivo nos organismos. Mas também, pode provocar uma acumulação dos contaminantes, tais como metais pesados, os quais se unem a partículas do sedimento. Estes contaminantes podem ser biodisponibilizados no ambiente através de mudanças nos parâmetros físico-químicos do meio (Newman e Clements, 2008).

Nos organismos aquáticos, os xenobióticos são geralmente absorvidos através das brânquias, pele e/ou trato digestivo. A concentração destes compostos químicos pode aumentar nos tecidos do organismo, em comparação com o ambiente (bioacumulação). Os compostos também podem ser transformados dentro do organismo através de vários sistemas metabólicos (biotransformação) que reduzem ou alteram sua toxicidade, podendo se tornar mais polares facilitando assim sua excreção. Alguns microorganismos conseguem decompor estes xenobióticos em formas mais simples (biodegradação), através de reações de oxidação, redução e hidrólise (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Os sítios de ação do xenobiótico no nível molecular podem ser ácidos nucléicos, proteínas específicas das sinapses nervosas presentes na membrana plasmática ou proteínas associadas a outros processos. O tipo particular de interação vai determinar o grau do efeito ao nível bioquímico e molecular. As principais mudanças neste nível correspondem a alterações na estrutura do DNA (Landis e Yu, 2003). Os poluentes podem gerar o rompimento das fitas do DNA, modificar a estrutura da molécula (metilação, etilação, desaminação de bases nitrogenadas, entre outros).

As alterações no DNA antes mencionadas, assim como as interações dos poluentes com a maquinaria mitótica, podem gerar danos citogenéticos nas células (Schmid, 1975). Estes danos podem consistir em lesões, necrose de tecidos celulares ou podem resultar em tumores e efeitos teratogênicos (Fenech, 2000). No nível citológico o tipo de alteração observada vai definir a saúde do organismo (Lee e Steinert, 2003).

A um nível superior, a saúde dos organismos pode extrapolar seus efeitos para o nível populacional. A diminuição do tamanho das populações, assim como alterações na estrutura demográfica, geram desequilíbrios em níveis ainda superiores. A estrutura da comunidade pode sofrer estas mudanças, alterando a riqueza e diversidade de espécies, afetando assim a estabilidade do ecossistema (Begon et al., 2009).

## **1.2 Genética toxicológica**

Com o propósito de analisar a ação dos poluentes sobre o material genético dos organismos surge a genética toxicológica. Esta disciplina e linha de pesquisa integra conceitos provenientes da genética (mecanismos de herança) e da toxicologia clássica (toxicocinética e toxodinâmica) (Aardema e MacGregor, 2002).

Muitos dos poluentes que ingressam nos diferentes ecossistemas são capazes de interagir direta ou indiretamente com o material genético dos organismos, afetando sua estrutura ou função. Estes compostos são denominados de genotóxicos, e seus efeitos podem ser detectados em concentrações subletais (Koppe, 2002). Os compostos genotóxicos e/ou seus metabólitos (radicais livres, por exemplo) podem gerar o rompimento tanto de uma fita única de DNA quanto da fita dupla; podem oxidar as bases

nitrogenadas na molécula de DNA ou unir-se em ligação covalente ao material genético formando adutos de DNA (Newman e Clemens, 2008).

Dentro dos diferentes compostos genotóxicos, estão os agentes alquilantes, os quais adicionam um grupo metil (metilação:  $+CH_3$ ) ou etil (etilação:  $+CH_3-CH_2$ ) às bases nitrogenadas do DNA. Este processo determina a substituição de bases por pareamentos errados, podendo levar a transições e transversões (mutações pontuais de troca de bases), assim como quebras no DNA. Também pode levar ao silenciamento de genes, quando a metilação ocorre em regiões promotoras dos genes pela perda do reconhecimento por fatores de transcrição. As enzimas de reparo também não são capazes de reconhecer o dano, impossibilitando a restauração do DNA (Heflich et al., 1982; Bird e Wolffe, 1999). Alguns exemplos de agentes alquilantes são o metil metanosulfonato (MMS) e o etil-metanosulfonato (EMS), compostos amplamente utilizados em bioensaios de toxicidade como controles positivos (Rank e Jensen, 2003; Štambuk et al., 2008; Lacaze et al., 2010).

Outros compostos, como ácido nitroso ( $HNO_2$ ), hidroxilamina ( $NH_2OH$ ) e radicais livres de oxigênio, também podem produzir transversões (mudança de base pirimidina para purina ou vice-versa), sendo modificadas as bases nitrogenadas do DNA através de reações de desaminação (Valko et al., 2004; Kasaie Kazuaki, 2016).

Alguns metais pesados conseguem formar ligações covalentes com os grupos fosfato e bases heterocíclicas (purinas) do DNA, afetando a estabilidade da molécula e aumentando a possibilidade de erros de pareamento das bases nitrogenadas (Newman e Clements, 2008). Dentro dos compostos que formam ligações covalentes com o DNA para formar adutos, estão o benzo[a]pireno, o qual liga-se à guanina para formar adutos de guanosina (Ericson e Larsson, 2000).

Por último, estão também os agentes intercalantes, os quais se posicionam entre as bases nitrogenadas. Esta intercalação modifica a estrutura da molécula, produzindo quebras e deleções do DNA. Alguns exemplos destes agentes são o brometo de etídio, laranja de acridina (corantes de fluorescência utilizados na marcação do DNA) e outros corantes sintéticos (Nafisi et al., 2007).

A constituição físico-química natural do DNA é imprescindível para garantir a sua estabilidade e correto funcionamento. As principais causas de lesões no DNA tem como consequência mutações com potencial carcinogênico (Newman e Clements, 2008). Por este motivo, a maquinaria molecular designada para evitar a degeneração do DNA é vital. Dentro desta maquinaria inclui-se o reparo por excisão de base, lidando com sítios que tem perdido sua base nitrogenada (sítios ap); reparo por excisão de nucleotídeos, que permite a eliminação de adutos de DNA e de dímeros de timina; reparo de recombinação, que corrige quebras de fita dupla e de ligações cruzadas; e reparo de erro de pareamento (*mismatch*), que determinam inserções e deleções de nucleotídeos (Glei et al., 2016). Frente ao dano do DNA, as células respondem ativando complexas redes de sinalização que definirão o destino celular, promovendo, não só a morte celular, mas também o reparo e sobrevivência das células (Roos e Krumm, 2016).

### **1.3 Indicadores biológicos de poluição**

A presença e efeito dos poluentes no ambiente podem ser avaliados através de três tipos de indicadores biológicos: a) Biomarcadores, b) Bioindicadores e c) Indicadores Ecológicos (Van Gestel e Van Brummelen, 1996).

O termo biomarcador pode ser utilizado para qualquer alteração biológica relacionada à presença de um composto químico no ambiente. Esta alteração pode ser química, física ou biológica. Os biomarcadores podem ser classificados em: i) Biomarcadores de Exposição: quando é medida a presença de substâncias exógenas ou dos produtos de seu metabolismo no organismo; ii) Biomarcador de Efeito: quando são quantificadas alterações bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais no organismo; e iii) Biomarcadores de Susceptibilidade: quando é medida uma habilidade inerente ou adquirida do organismo em responder durante a exposição a um poluente (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Um organismo bioindicador fornece informações sobre as condições ambientais de seu habitat por sua presença, ausência ou pelo seu comportamento. Sua utilização permite a avaliação integrada dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição (Monserrat et al., 2007).

O termo indicador ecológico pode ser definido como um parâmetro do ecossistema que descreve sua estrutura e seu funcionamento (Van Gestel e Van Brummelen, 1996).

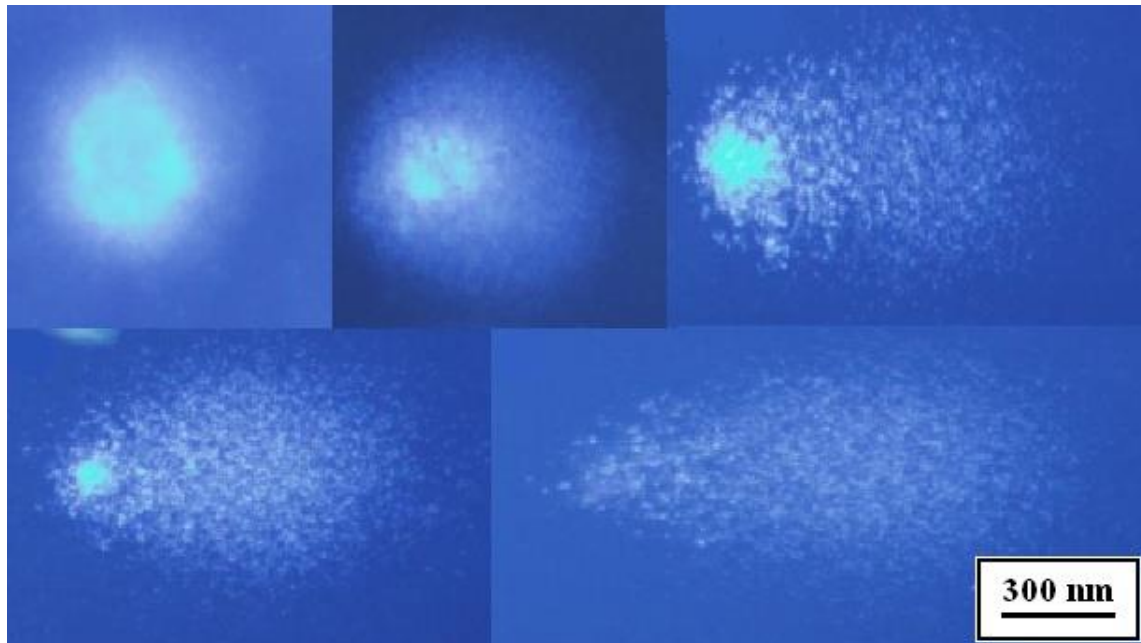
#### **1.4 Biomarcadores de genotoxicidade**

Várias técnicas de avaliação genotóxica foram desenvolvidas com o objetivo de quantificar e conhecer o modo de ação dos compostos perigosos aos organismos. Estas técnicas encontram-se dentro do grupo dos biomarcadores de efeito e são capazes de reconhecer muitas classes de danos, numa grande variedade de células e em diferentes organismos fornecendo, assim informações no nível de células individuais dos organismos (Rojas et al., 1999). Duas destas técnicas foram abordadas neste trabalho: o ensaio do cometa (EC) e o teste do micronúcleo (MN), ambas já utilizadas como ferramentas de biomonitoramento ambiental (Mitchelmore e Chipman, 1998).

O ensaio do cometa (*comet assay*) (EC) corresponde à uma eletroforese de células individuais em gel de agarose. Esta técnica baseia-se na migração de fragmentos de DNA gerados pela quebra das fitas em meio alcalino, devido à ação de agentes genotóxicos que geram sítios alcalino-sensíveis. Quanto maior for a quantidade de dano no DNA, maior vai ser a migração dos fragmentos a partir do nucleóide (núcleo degradado) em direção ao eletrodo positivo durante a eletroforese, dando a aparência de um cometa (Fig. 1), sendo esse um indicativo da susceptibilidade do organismo testado ao xenobiótico. Ostling e Johanson (1984) foram os primeiros em desenvolver a técnica de eletroforeses em gel para detectar o dano genético. Posteriormente, Singh et al. (1988) modificaram a técnica em condições alcalinas (pH >13), permitindo a exposição dos sítios alcalino-sensíveis, incrementando assim a sensibilidade do ensaio.

Devido a sua simplicidade e alta sensibilidade foi sugerida para estudos de monitoramento ambiental, podendo avaliar o efeito genotóxico de uma grande variedade de compostos como pesticidas e esgotos industriais e domésticos, entre outros. Desta maneira, o ensaio permite a detecção de compostos com potencial carcinogênico (Kang e Pantel, 2013). A partir da década dos 90 o número de publicações científicas utilizando o EC veio aumentando consideravelmente ano após ano, com mais de 10.000 artigos publicados desde

seu estabelecimento. Uma parte desses artigos corresponde à área da Toxicologia (30 %) e da Ecologia Ambiental (11 %) (Glei et al., 2016).



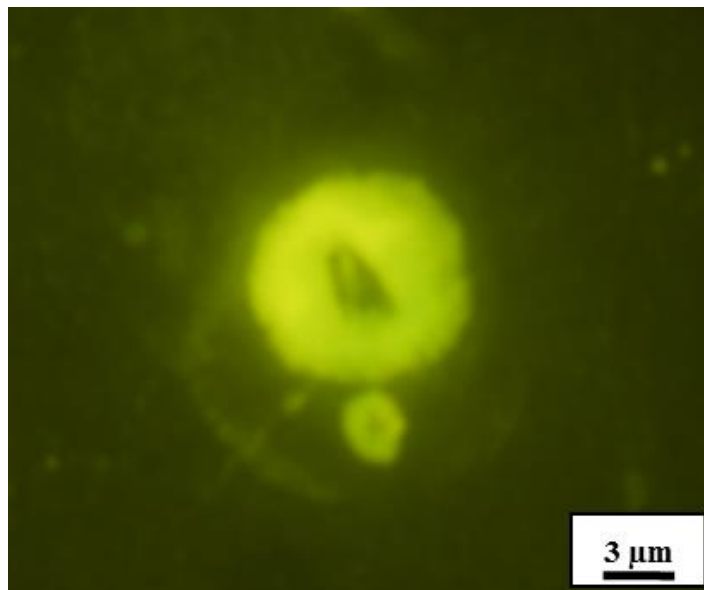
**Figura 1.** Diferentes níveis de dano no material genético observados como cometas (nucleóides) com caudas de diferente comprimento em hemócitos do mexilhão *P. perna*. Aumento X400, corado com DAPI e visualizado com fluorescência. Fotos correspondentes ao atual trabalho.

O teste do micronúcleo (MN) corresponde a uma técnica simples, rápida e sensível que permite a obtenção de um índice de dano citogenético (Sánchez-Galán et al., 1998). O teste do MN foi desenvolvido por Schmid (1975) para analisar a formação de MNs em roedores e posteriormente Hooftman e Raat (1982) adaptaram o teste para trabalhar com organismos aquáticos em condições de laboratório.

O mecanismo de formação de MNs acontece durante a fase de proliferação das células sanguíneas, onde estas estão em contínua divisão. Durante a divisão celular o agente genotóxico age, podendo causar uma quebra no cromossomo, liberando um fragmento (clastogênese) ou alterando a disjunção das cromátides irmãs, causada pela disfunção do fuso, levando à perda de uma delas (aneugênese). Essas anormalidades permanecem até o final da divisão celular, não se reintegrando ao núcleo, passando a constituir um MN, o qual



é visualizado no citoplasma (Krishna e Hayashi, 2000) (Fig. 2). A presença de MNs no citoplasma de células sanguíneas, portanto, é um indicativo da ação de um genotóxico.



**Figura 2:** Hemócito de mexilhão *P. perna* com um micronúcleo. Aumento X400; corado com laranja de acridina e visualizado com fluorescência. Foto correspondente ao atual trabalho.

Da mesma forma que para o EC, o teste do MN tem sido amplamente utilizado para avaliar o impacto de poluentes nos organismos aquáticos, após a exposição *in vivo* direta ou indireta a componentes químicos (Izquierdo et al., 2003). O teste foi amplamente utilizado em bivalves, tanto em estudos de biomonitoramento (Klobučar et al., 2003; Rank e Jensen, 2003; Kolarević et al., 2016) como na avaliação dos efeitos de diferentes poluentes sobre diferentes organismos (Ching et al., 2001; Štambuk et al., 2008).

### **1.5 Mexilhões como bioindicador de poluição**

Os bivalves da família Mytilidae são considerados bons organismos para o biomonitoramento devido à várias características: têm uma ampla distribuição geográfica e são muito abundantes, o que possibilita fazer estudos comparativos de diferentes regiões e ao longo do tempo. Os organismos desta família não apresentam mobilidade na fase adulta,

permitindo avaliar a qualidade ambiental de uma determinada área. Têm uma alta taxa de filtração, podendo acumular compostos nos tecidos, como por exemplo, hidrocarbonetos e metais pesados. Além disto, eles têm uma rápida resposta ao nível molecular, citológico e fisiológico na presença de determinados contaminantes (Oehlmann e Schulte-Oehlmann, 2003; Conceição et al., 2008).

Esta família conta com uma ampla bibliografia em pesquisas relacionadas a poluição e monitoramento numa grande diversidade de ambientes, e *Mytilus edulis* corresponde à espécie mais utilizada como bioindicadora (Al-Subiai et al., 2011; Baršienė et al., 2012). O programa de biomonitoramento ambiental com mexilhões mais importante a nível mundial corresponde ao “Mussel Watch”, iniciado nos Estados Unidos no ano 1975. Neste programa já foram monitoradas as costas de Estados Unidos, a região dos Grandes Lagos (entre Canadá e Estados Unidos), Porto Rico e do Havaí, avaliando os efeitos que produzem os diferentes tipos de poluentes dessas regiões, como hidrocarbonetos, derivados do petróleo, metais traço, hidrocarbonetos halogenados, e radionuclídeos, entre outros (Goldberg, 1978; Powell et al., 2015). Em ambientes de água doce, Pavlica et al. (2001) avaliaram o potencial genotóxico do pentaclorofenol (PCP) em hemócitos do mexilhão Zebra (*Dreissena polymorpha*). No Mar Báltico, Turja et al. (2014) analisaram através do EC o dano genotóxico no mexilhão *Mytilus trossulus*, determinado pela descarga de águas provenientes de tratamentos industriais, relacionando o dano genotóxico com a distância do ponto de descarga dessas águas.

## 1.6 Espécie alvo de estudo

O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) pertence à família Mytilidae (Rafinesque, 1815) (Mollusca, Bivalvia), sendo o maior representante desta família no Brasil (Rios, 1994), chegando a alcançar até 182 mm de comprimento (Ferreira e Magalhães, 2004). Os mexilhões *P. perna* apresentam uma fase larval planctônica, a qual é continuada por uma fixação num substrato rígido, onde sofrem uma metamorfose e se transformam em juvenis. Durante seu desenvolvimento e quando adultos (a partir de 20 mm de comprimento), estes passam a constituir a comunidade bentônica (Vakily, 1989). Habitam preferencialmente os costões rochosos das regiões entremarés até a zona do

infralitoral, podendo ocorrer até os 30 metros de profundidade (Freitas, 1997), observando-se maior concentração na parte inferior da zona entremarés até um metro de profundidade (Erlandsson e McQuaid, 2004).

*Perna perna* é uma espécie eurihalina e euritêmica, portanto é capaz de resistir a uma ampla variação de salinidade e de temperatura. A faixa de salinidade considerada ótima para *P. perna* está entre 34 e 36, e em salinidades abaixo de 19 e acima de 49, a espécie não sobrevive. Com relação à temperatura, a faixa ótima se encontra entre 21 e 28 °C e é capaz de suportar temperaturas entre 5 e 30 °C (Ferreira e Magalhães, 2004).

Devido à sua capacidade de resistir a uma grande variação de temperaturas e de salinidades, esta espécie tem uma ampla distribuição geográfica (Fig. 3). Ainda sendo uma espécie nativa do continente africano, atualmente é também encontrada no Mar Mediterrâneo, no sul da Índia, no Sri Lanka, na costa atlântica da América do Sul e em algumas ilhas do Caribe. As principais causas de sua ampla distribuição são de índole antropogênica. Acredita-se que as águas de lastro de navios mercantes sejam o principal meio de dispersão da espécie (Hicks et al., 2001).



**Figura 3:** Distribuição mundial do mexilhão *P. perna*. Extraído e modificado de Resgalla Jr et al. (2008).

Na América do Sul, *P. perna* é uma espécie exótica introduzida e completamente estabelecida há mais de 200 anos; provavelmente veio do continente africano no casco em navios negreiros, no período da colonização do Brasil pelos portugueses. Hoje ocorre na costa oriental da Venezuela; no Brasil, desde a Baía de Vitória (ES) até Rio Grande do Sul (RS); e na costa oceânica uruguaia (Souza et al., 2004).

Diversos estudos de biomonitoramento de poluentes utilizando a espécie *P. perna* tem sido desenvolvidos no Brasil. Alguns destes trabalhos utilizaram biomarcadores de exposição para avaliar a presença no ambiente de hidrocarbonos aromáticos policíclicos (HPAs) e metais pesados (Francioni et al., 2007; Yoshimine et al., 2012; Belabed et al., 2013; Santiago et al., 2016). Outros estudos utilizaram biomarcadores de efeito, avaliando as respostas produzidas pelos pesticidas organoclorados (POC) e bifenis policlorados (BPC) (Galvão et al., 2014; 2015); e também tem sido avaliadas as respostas ocasionadas por contaminantes emergentes como produtos farmacêuticos (Cortez et al., 2012).

### **1.7 Bioensaios com organismos da espécie *Perna perna***

Diversos trabalhos em condições de laboratório tem sido realizados utilizando o mexilhão *P. perna* como modelo animal. Nogueira et al. (2015) analisaram a resposta de enzimas antioxidantes de mexilhões expostos a biodiesel através de bioensaios. No trabalho de Zlibberberg et al. (2011), os autores avaliaram a relação da resposta do estresse oxidativo com o tamanho e o gênero dos organismos processados.

Poucos trabalhos têm sido publicados com biomarcadores de genotoxicidade utilizando organismos desta espécie. Destacam-se os trabalhos de Carvalho Pinto-Silva et al. (2003; 2005), os quais expuseram mexilhões a uma determinada concentração de uma ficotoxina natural (ácido ocadaico) e avaliaram a formação de MN ao longo do tempo. Por outro lado, no trabalho de Stefanoni e Abessa (2011), os autores avaliaram a formação de MN em mexilhões desta espécie expostos a diferentes concentrações de um composto presente na maioria dos detergentes domésticos: o surfactante aniônico alquil-benzeno sulfonato linear (ASL). Dentro dos trabalhos de biomonitoramento, Gonçalves (2003) avaliou o potencial genotóxico das águas de diferentes praias da região centro-norte do

Estado de Santa Catarina sobre os hemócitos do mexilhão *P. perna*, utilizando o teste do MN e o EC como biomarcadores genotóxicos. Por outro lado, Francioni et al. (2007a) determinaram a frequência de MN para diferentes pontos dentro da Baía de Guanabara.

### **1.8 Objetivo Geral**

Contribuir ao biomonitoramento e avaliação da qualidade ambiental de fazendas de malacocultura e de ambientes naturais no estado de Rio de Janeiro, através da análise de dano genotóxico em mexilhões da espécie *Perna perna*.

## **II. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE GENOTÓXICA DO MEXILHÃO *PERNA PERNA* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

### **2.1 INTRODUÇÃO**

#### **2.1.1 Importância dos bioensaios na genotoxicidade**

As fontes de contaminação num ambiente natural podem ser variadas e afetar aos organismos de forma diferenciada dependendo de sua natureza e concentração. A grande quantidade dos contaminantes presentes nos ambientes naturais tem, de forma direta ou indiretamente, potencial genotóxico (Newman e Clements, 2008). Por este motivo, o dano genético dos organismos presentes num ambiente impactado vai ser o resultado do efeito combinado de todos os contaminantes presentes (Landis e Yu, 2003). Os bioensaios de genotoxicidade permitem determinar os efeitos isolados dos contaminantes num organismo específico (Bolognesi e Cirillo, 2014). Assim, pode ser quantificado o efeito e o tempo de resposta do organismo de um composto químico conhecido sobre condições de laboratório.

No desenho experimental do bioensaio é importante ter um bom modelo animal, o qual precisa ter determinadas características. Por exemplo, o organismo deve apresentar sensibilidade alta, deve ser de fácil manutenção e deve ter sua biologia conhecida (reprodução, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento), eliminando assim possíveis situações de estresse dos organismos, que levem a erros na hora de interpretar os resultados. Ao mesmo tempo, os parâmetros ambientais devem ser monitorados diariamente, impedindo variações indesejadas (Zagatto e Bertolletti, 2006).

#### **2.1.2 Fatores fisiológicos dos mexilhões e sua relação com os poluentes**

Geralmente o efeito produzido por um poluente sobre um organismo é determinado pelo tipo de contaminante, pela concentração no ambiente e sua disponibilidade para o organismo em questão (Goldberg 1978; Klobučar et al., 2003; Bolognesi e Cirillo, 2014; Touahri et al., 2016). Contudo, esta relação pode ser modificada por diferentes fatores, incluindo diferenças nas características fisiológicas dos mexilhões (sexo, tamanho, peso,

idade, taxa de crescimento, entre outras). Separar os efeitos de alguns destes atributos para analisar cada um deles de forma isolada resulta ser difícil uma vez que estes fatores estão intimamente relacionados. Lobel et al.(1991), determinaram que o sexo em mexilhões da espécie *Mytilus edulis* representa um fator importante em processos de bioacumulação de determinados elementos, sendo os maiores efeitos observados para manganês, cobre, arsênico e selênio, onde as fêmeas mostraram valores maiores de bioacumulação que os machos.

O tamanho do mexilhão reflete o estágio de vida do organismo, o qual pode influenciar a resposta frente a um impacto ambiental. Zilberberg et al. (2011) encontraram uma relação entre o tamanho dos mexilhões *P. perna* e a expressão de proteínas de estresse frente a uma mudança das condições ambientais. Os mexilhões de menor tamanho apresentaram uma menor expressão das proteínas de estresse, em comparação com mexilhões maiores. Indivíduos de tamanhos maiores tem taxas de respiração maiores para compensar as demandas metabólicas. Esta diferença poderia aumentar a sua exposição frente a contaminantes aquáticos. Isso pode causar um estresse energético adicional para os indivíduos maiores, resultando no maior impacto do estresse químico, em comparação com indivíduos menores (Bruner et al., 1994).

A idade dos indivíduos é outro fator que influencia o efeito dos poluentes nos organismos. O processo de envelhecimento é geralmente definido por uma progressiva diminuição funcional, seguida da morte. No nível molecular, este processo caracteriza-se pelo decaimento gradual dos mecanismos de manutenção e reparação, o que conduz a uma acumulação de danos celulares, assim como o desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade (Bodnar, 2009). O envelhecimento é acompanhado pelo aumento da produção de radicais livres de oxigênio ( $O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais de hidroxila (OH), os quais são produzidos na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias. O estresse oxidativo acontece quando a produção destes compostos aumenta e os sistemas de defesa antioxidante não conseguem parar esse aumento. O excesso destes compostos oxidativos induz efeitos deletérios em macromoléculas celulares como o DNA, proteínas e lipídios, os quais poderiam alterar as funções celulares e até provocar a morte celular (Barbosa et al., 2010).

### 2.1.3 Metil metanosulfonato

O metil metanosulfonato (MMS) é um composto com conhecido efeito genotóxico, frequentemente utilizado como controle positivo ou utilizado para avaliar respostas de toxicidade em diferentes organismos (Lackinger et al., 2001; Lewis e Galloway, 2008; Lacaze et al., 2011; Weber et al., 2013). O MMS é um composto orgânico de fórmula  $C_2H_6O_3S$ , que atua como agente alquilante, sequestrando íons bivalentes. O MMS tem a capacidade de induzir a metilação nas posições N-7 e O-6 da guanina na posição N-3 da adenina dos desoxirribonucleotídeos. A metilação na posição N-3 bloqueia a DNA polimerase e impede a replicação das células (Fu et al., 2012). Por outro lado, a metilação na posição O-6 da guanina leva à incorporação errônea de uma timina ao invés de citosina, gerando uma mutação (de G/C para A/T) (Kaina, 2004). No nível cromossômico, a metilação das purinas pode produzir um efeito clastogênico nas cromátides (Resende et al., 2010).

Rank e Jensen (2003) e Canty et al. (2009) expuseram mexilhões da espécie *Mytilus edulis* a diferentes concentrações de MMS e quantificaram o dano genotóxico produzido através do EC ao longo do tempo. Não há trabalhos publicados avaliando o efeito genotóxico do MMS na espécie *P. perna*, no entanto conhecendo seu potencial genotóxico, trata-se de uma substância adequada para avaliar diferenças de sensibilidade em diferentes faixas de tamanho deste mexilhão.

### 2.1.4 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a sensibilidade e o tempo de resposta do mexilhão *Perna perna* ao agente genotóxico MMS.
- 2) Determinar a influência do tamanho corporal e do sexo do mexilhão *Perna perna* na sensibilidade ao agente genotóxico MMS.

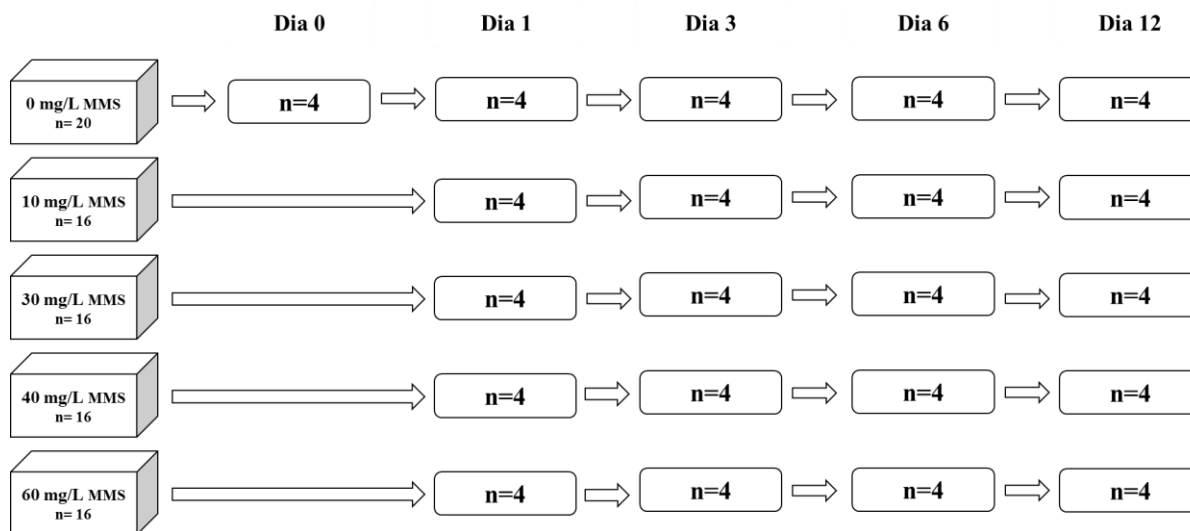


## 2.2 MATERIAS E MÉTODOS

### 2.2.1 Experimento I – Avaliação da sensibilidade e do tempo de resposta do mexilhão *Perna perna* quando exposto a diferentes concentrações de MMS

Foram coletados 76 indivíduos da espécie *P. perna* da fazenda de malacocultura localizada na praia Rasa do município de Armação dos Búzios, RJ (22°44'20.10"S e 41°56'52.30"O) e levados imediatamente para o laboratório onde foram mantidos em aquários de 50 L. Em cada aquário foram colocados 20 indivíduos com uma densidade de 1 indivíduo para cada 2 L de água da fazenda, sem suplemento alimentar, a temperatura de 24°C, aeração constante e troca de água a cada 48 horas. O número de indivíduos para cada tratamento e tempo de exposição foi escolhido em função de trabalhos anteriores (Wilson et al., 1998; Rank e Jensen, 2003; Štambuk et al., 2008).

Os indivíduos adultos coletados, classificados na classe de tamanho de 6 e 8 cm de comprimento, foram transferidos para 5 aquários com concentrações diferentes de MMS (Acros Organiscs), as quais se mantiveram constantes ao longo do experimento: 0 mg/L (controle negativo), 10 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L e 60 mg/L. Avaliou-se o dano genotóxico produzido após 0, 1, 3, 6 e 12 dias de exposição (Fig. 4).

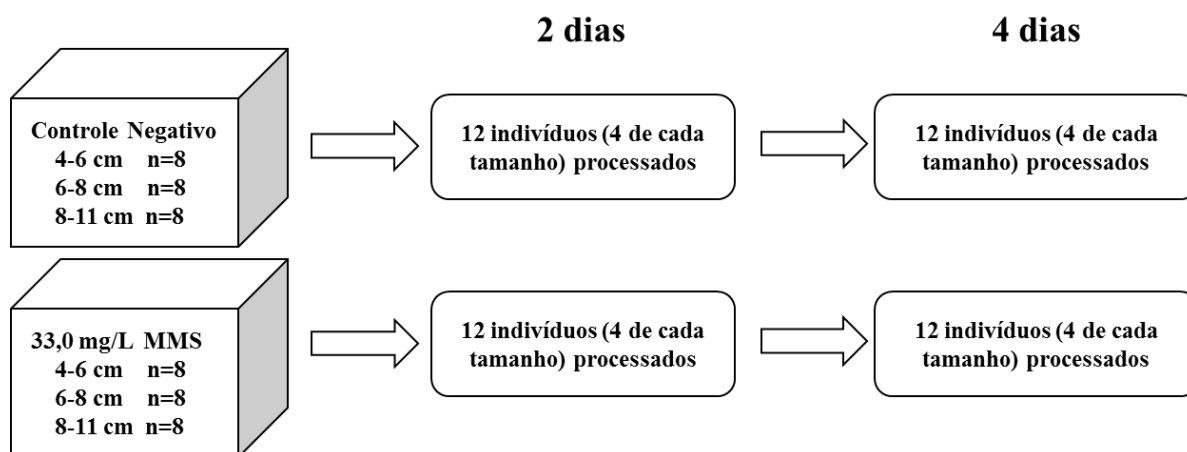


**Figura 4:** Diagrama do Experimento I. O número de indivíduos na coluna da esquerda representa o total de indivíduos processados por tratamento e o número nas linhas representa os indivíduos processados por tempo de exposição e tratamento (n=4).

Quatro organismos foram coletados de cada concentração em cada tempo para determinar o comprimento total, o peso e o sexo. Em seguida foi extraída a hemolinfa e se procedeu com o EC e o teste do MN, sendo que o EC foi realizado imediatamente após a extração da hemolinfa.

### 2.2.2 Experimento II – Determinação da sensibilidade de diferentes classes de tamanho do mexilhão *Perna perna* ao MMS

Foram coletados 48 indivíduos da espécie *P. perna* da mesma fazenda marinha de malacocultura da praia Rasa de Búzios e levados imediatamente para o laboratório. Os indivíduos coletados foram transferidos para 2 aquários de 50 L com 24 indivíduos cada um distribuídos em tamanhos entre 4 e 11 cm (Fig. 5). O primeiro aquário exerceu a função de controle negativo (sem agente genotóxico) e o segundo aquário, os mexilhões foram expostos a 33,0 mg/L do agente genotóxico metil metanosulfonato (MMS). A concentração do MMS, assim como o N amostral foi escolhido em função de dados da literatura (Rank e Jensen, 2003). Para o processamento e análise de genotoxicidade os indivíduos foram separados em três classes de tamanho: de 4 a 6 cm, de 6,1 a 8 cm e de 8,1 a 11 cm.



**Figura 5:** Diagrama do Experimento II, mostrando a distribuição de tratamentos. 12 indivíduos (4 de cada tamanho) foram analisados ao segundo e quarto dia de tratamento.

Foram retirados para análise 12 indivíduos do controle negativo e 12 indivíduos do aquário com concentração de MMS constante após 2 dias e 4 dias de experimento. Destes organismos foram determinados o comprimento, o peso e o sexo. A seguir, foi extraída a hemolinfa para o EC e o teste do MN.

### **2.2.3 Coleta de hemolinfa dos mexilhões**

A coleta de hemolinfa dos mexilhões para as análises de genotoxicidade seguiu o mesmo protocolo tanto para o EC quanto para o teste do MN.

A hemolinfa foi retirada do seio do músculo adutor posterior de cada mexilhão com uma seringa hipodérmica (1 mL), após ter quebrado a concha na altura do umbo utilizando um alicate. A hemolinfa coletada foi colocada em microtubos de 1,5 mL, atingindo um mínimo de 150 µl de hemolinfa por cada indivíduo. Imediatamente após a coleta, a hemolinfa foi processada para gerar as lâminas dos testes de genotoxicidade.

### **2.2.4 Ensaio do cometa (EC)**

O protocolo metodológico foi padronizado a partir do proposto por Singh et al. (1988), porém com modificações ajustadas em trabalhos posteriores utilizando o mesmo teste (Gonçalves, 2003; Conceição et al., 2008; Weber et al., 2013). Aproximadamente 25 µL de hemolinfa foram misturados com 80µl de 0,5 % agarose “low melting point” (LMP). A mistura foi depositada sobre uma lâmina de microscopia, previamente recoberta com 0,5 % agarose normal, e coberta com uma lamínula. A preparação foi resfriada por 15 min a aproximadamente 4°C. Logo após, foi retirada a lamínula e colocada uma segunda camada de agarose LMP e novamente recoberta com lamínula e resfriada. Esta última etapa foi realizada com o objetivo de proteger às células. Após a retirada da segunda lamínula, a lâmina foi submersa em um tampão de lise celular [2,5 M NaCl; 10 mM Tris; 100 mM EDTA; 1% SDS; 1% Triton-X-100;10% DMSO (dimetil sulfoxido); pH 10] por 20 min. Este tampão desintegra as membranas celulares e desnatura as proteínas, deixando o DNA livre das histonas e de outra proteínas de ligação ao DNA. Após uma rápida lavagem com água destilada, a preparação foi submetida a uma desnaturação com tampão alcalino, (300

mM NaOH; 1 mM EDTA, pH > 13), por 20 min. A desnaturação do material genético permite revelar os sítios danificados do DNA. A eletroforese foi realizada a seguir no mesmo tampão de desnaturação por outros 20 min a 25 V e 365 mA. Após a eletroforese a preparação na lâmina foi neutralizada cobrindo-a com tampão de neutralização (0,4 M Tris; pH 7,5) por 5 min e fixada cobrindo-a a seguir com etanol absoluto. Quando secas, as lâminas foram visualizadas em microscópio de epifluorescência após a adição de uma gota do corante fluorescente DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol) (1 µg/ml) e cobertas com lamínula. As imagens foram digitalizadas para posterior análise. Um total de aproximadamente 100 nucleóides (cometas) por indivíduo foram medidos utilizando o programa gratuito Comet Score™ (Tritek Corporation), sendo registrado para cada cometa a porcentagem de DNA na cauda do cometa (% DNA) como medida de dano genotóxico.

### **2.2.5 Teste do micronúcleo (MN)**

A metodologia empregada neste teste seguiu o protocolo de Pavlica et al. (2000), com algumas modificações (Conceição et al., 2008). Alíquotas de 75 µL de hemolinfa misturadas com 100 µL de tampão PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) foram colocadas e esfregadas sobre lâminas de microscopia e mantidas à temperatura ambiente por 60 min. Os hemócitos precipitados na lâmina foram fixados por 10 min com 1% glutaraldeído. Logo após, as lâminas foram lavadas com PBS, secas a temperatura ambiente e coradas com corante fluorescente laranja de acridina (1 µg/mL). Foram analisadas 1000 células por lâmina (indivíduo), utilizando um microscópio de epifluorescência Olympus. Apenas as células intactas (com núcleo e membrana plasmática) foram utilizadas. Os MNs foram identificados pelos critérios a seguir: 1) inclusões citoplasmáticas esféricas com o contorno evidente; 2) diâmetro menor que um 1/3 do núcleo; 3) cor e textura semelhantes a do núcleo; 4) sem contato com o núcleo.

### **2.2.6 Análises estatísticas**

As análises estatísticas para o EC foram realizadas com as médias da % DNA da cauda do cometa de cada indivíduo, obtidas a partir dos 100 cometas medidos para cada

indivíduo. Visto que ou uma vez que os dados da % DNA não se ajustaram à distribuição normal, as comparações entre tratamentos foram realizadas pelos testes não-paramétricos Kruskal-Wallis ou pelo teste U de Mann-Whitney, utilizando um nível de significância de 5%.

A frequência de MN foi calculada sobre mil núcleos analisados e as médias para os diferentes tratamentos foram comparadas utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (U).

A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a correlação da % DNA na cauda dos cometas e número de MN com o comprimento total, peso e sexo dos organismos analisados. O pacote STATISTICA, v.7 (Statsoft Inc.) foi utilizado para a realização de todas as análises estatísticas.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Experimento I – Sensibilidade e tempo de resposta do mexilhão *Perna perna* em diferentes concentrações de MMS

O comprimento e peso médio, assim como o número de machos e fêmeas, dos organismos analisados para cada tratamento são apresentados na Tabela 1. Não foi possível obter a mesma proporção de machos e de fêmeas por tratamento, uma vez que a identificação do sexo somente pode ser realizada após sacrificar ao animal, ao analisar a coloração dos tecidos gonadais internos.

**Tabela 1:** Comprimento total e peso médio; e o número de machos e fêmeas utilizados em cada tratamento.

MMS (mg/L)	Comprimento (mm)	Peso (g)	N (fêmeas:machos)
0	70,1 ± 4,2	32,3 ± 6,5	20 (8:12)
10	70,0 ± 6,0	32,3 ± 6,9	16 (7:9)
30	69,6 ± 4,2	29,7 ± 5,0	16 (5:11)
40	69,3 ± 11,8	49,6 ± 21,8	16 (9:7)
60	73,3 ± 2,7	34,2 ± 3,7	8 (3:5)

### ***Dano genotóxico medido como % DNA na cauda do cometa***

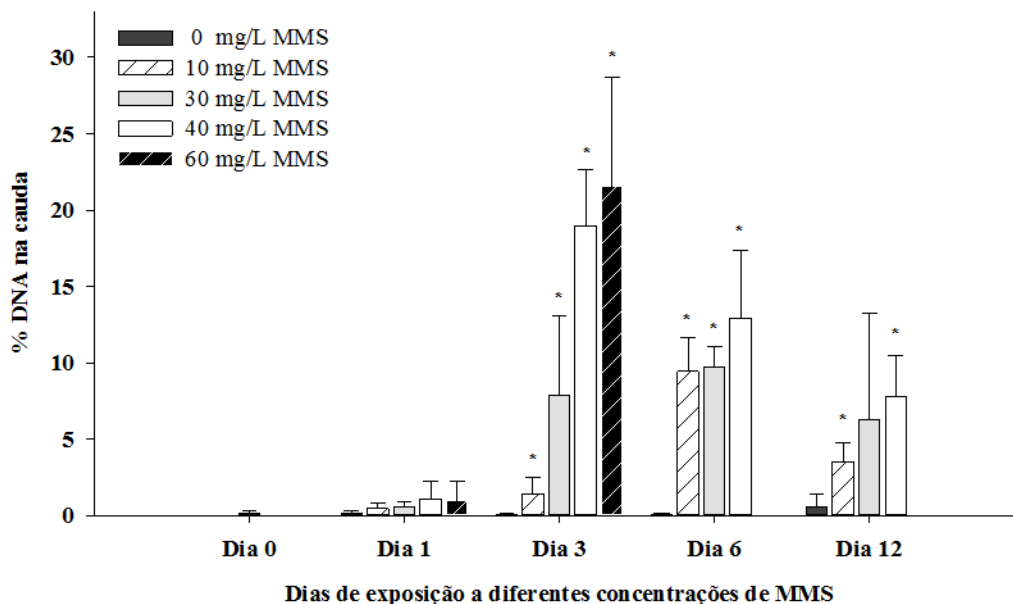
Nenhum dos grupos expostos ao MMS (10, 30, 40 e 60 mg/L) se diferenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) do grupo controle (0 mg/L) no primeiro dia de exposição (Tabela 2, Fig. 6). No terceiro dia de exposição todos os grupos expostos ao MMS se diferenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle (Tabela 2). Nesse dia, o grupo exposto a 60 mg/L de MMS apresentou o máximo valor encontrado de % DNA na cauda ( $21.5 \pm 11.6$ ). Não foi possível analisar o dano genotóxico produzido por esta concentração de MMS para os dias 6 e 12 devido à morte destes mexilhões. Os organismos expostos a 40 mg/L de MMS também apresentaram seu máximo valor de dano no terceiro dia de exposição ( $18,9 \pm 2,7$  % DNA), diferenciando-se significativamente do resto dos tratamentos (Tabela 3, Fig. 6).

No sexto dia de exposição todos os grupos expostos ao MMS se diferenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle. Os grupos expostos a 10 e 30 mg/L apresentaram seus valores mais altos neste dia ( $9,3 \pm 1,5$  % e  $9,7 \pm 0,9$  %, respectivamente). No décimo primeiro dia de exposição os valores de % DNA diminuíram. No entanto, a maioria dos grupos expostos ao MMS ainda se diferenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle, com a exceção do grupo exposto a 30 mg/L de MMS (Tabela 2, Fig. 6).

**Tabela 2:** Análises estatísticas do Experimento I (Teste U de Man Whitney) comparando a média da % DNA dos cometas entre as diferentes concentrações de MMS e com os controles negativos para os dias 1, 3, 6 e 12 do experimento.

Comparação	Dia 1		Dia 3	
	Z ajustado	P valor	Z ajustado	P
Controle vs 10 mg/L	-1.732	0.083	-2.309	<b>0.021*</b>
Controle vs 30 mg/L	-1.732	0.083	-2.309	<b>0.021*</b>
Controle vs 40 mg/L	-1.732	0.083	-2.309	<b>0.021*</b>
Controle vs 60 mg/L	-1.156	0.248	-2.323	<b>0.020*</b>
10 mg/L vs 30 mg/L	0.000	1.000	-1.732	0.083
10 mg/L vs 40 mg/L	-0.289	0.773	-2.309	<b>0.021*</b>
10 mg/L vs 60 mg/L	-0.289	0.773	-1.323	<b>0.020*</b>
30 mg/L vs 40 mg/L	-0.292	0.770	-2.309	<b>0.021*</b>
30 mg/L vs 60 mg/L	-0.288	0.772	-1.452	0.146
40 mg/L vs 60 mg/L	-0.584	0.564	-0.581	0.561
Comparação	Dia 6		Dia 12	
	Z ajustado	P valor	Z ajustado	P
Controle vs 10 mg/L	-2.309	<b>0.021*</b>	-2.309	<b>0.021*</b>
Controle vs 30 mg/L	-2.021	<b>0.043*</b>	-2.309	<b>0.021*</b>
Controle vs 40 mg/L	-2.310	<b>0.021*</b>	-2.309	<b>0.021*</b>
10 mg/L vs 30 mg/L	0.000	1.000	-0.577	0.564
10 mg/L vs 40 mg/L	-2.309	<b>0.021*</b>	-1.443	0.149
30 mg/L vs 40 mg/L	-1.443	0.149	-1.155	0.248

\* Significativo a 5%.



**Figura 6:** Média e erro da média da % DNA na cauda dos cometas em hemócitos de mexilhões *P. perna* expostos a diferentes concentrações de MMS ao longo de 12 dias de exposição (n=4 para cada tratamento/tempo). (\*) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do tratamento com MMS em relação ao controle.

#### ***Dano genotóxico medido em Micronúcleos/1000***

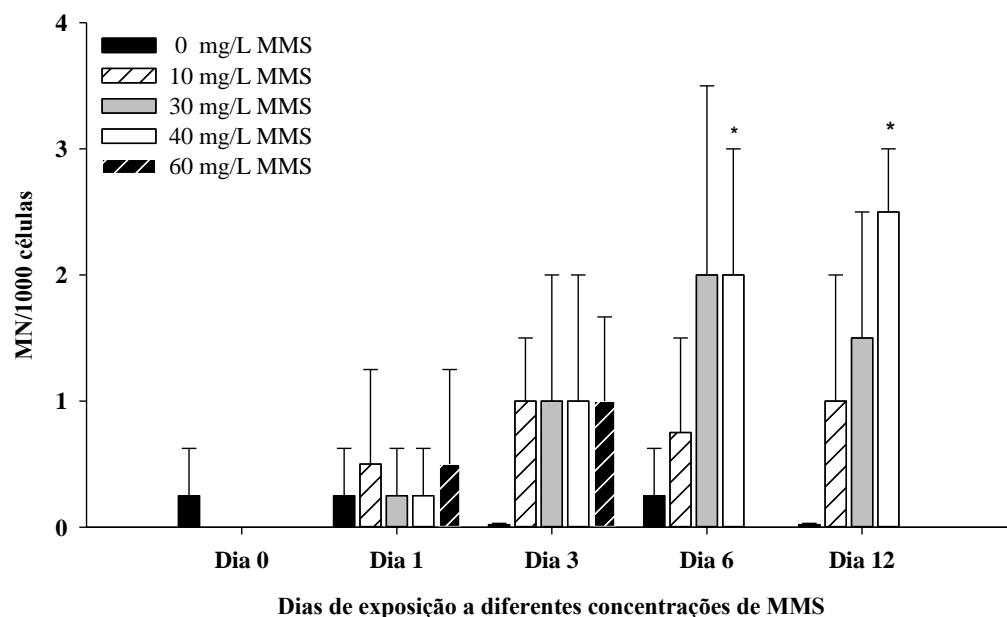
O Teste de MN mostrou que as frequências de MNs diferenciaram-se significativamente ( $p < 0,05$ ; Teste U de Mann-Whitney; Tabela 3) entre os organismos controles e tratados somente nos dias 6 e 12 e para o grupo exposto a 40 mg/L de MMS (Figuras 7 e 8). No dia 12 deste grupo registrou-se o máximo valor do experimento para o teste do MN ( $2,5 \pm 0,5$  MN/1000 células).



**Tabela 3:** Análises estatísticas do Experimento I (Teste U de Man Whitney) comparando a média da frequência de MNs entre as diferentes concentrações de MMS e com os controles negativos para os dias 1, 3, 6 e 12 do experimento.

Comparação	Dia 1		Dia 3	
	Z ajustado	P valor	Z ajustado	P
Controle vs 10 mg/L	-0.189	0.850	-1.423	0.155
Controle vs 30 mg/L	0.000	1.000	-0.833	0.405
Controle vs 40 mg/L	0.000	1.000	-1.000	0.317
Controle vs 60 mg/L	-0.189	0.850	-1.155	0.248
Comparação	Dia 6		Dia 12	
	Z ajustado	P valor	Z ajustado	P
Controle vs 10 mg/L	-0.833	0.405	-1.000	0.317
Controle vs 30 mg/L	-1.548	0.122	-1.692	0.091
Controle vs 40 mg/L	-2.138	<b>0.033*</b>	-2.397	<b>0.016*</b>
10 mg/L vs 30 mg/L	-1.042	0.297	-0.607	0.544
10 mg/L vs 40 mg/L	-1.498	0.134	-1.871	0.061
30 mg/L vs 40 mg/L	0.000	1.000	-1.214	0.225

\* Significativo a 5%.



**Figura 7:** Média e erro da média do número de MN/1000 hemócitos de mexilhões *P. perna* expostos a diferentes concentrações de MMS ao longo de 12 dias (n=4 para cada tratamento/tempo). (\*) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do tratamento com MMS em relação ao controle.

### 2.3.2 Experimento II – Sensibilidade ao MMS por classe de tamanho em adultos do mexilhão *Perna perna*.

O comprimento e peso médio, assim como o número de machos e fêmeas dos organismos analisados por tratamento são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Comprimento e peso médio com seu desvio padrão e número de fêmeas e machos dos organismos analisados para cada tratamento.

Controle negativo			
Tamanho	Cumprimento (mm)	Peso (g)	N (fêmeas:machos)
4 - 6 cm	51.2 ± 2.2	14.2 ± 3.9	8 (3:5)
6 - 8 cm	65.1 ± 1.5	27.8 ± 1.0	8 (4:4)
8 - 11 cm	84.7 ± 2.7	47.5 ± 2.8	8 (3:5)
Tratamento com MMS			
Tamanho	Cumprimento (mm)	Peso (g)	N (fêmeas:machos)
4 - 6 cm	51.8 ± 4.0	14.9 ± 3.8	8 (5:3)
6 - 8 cm	67.1 ± 3.4	25.7 ± 3.8	8 (2:6)
8 - 11 cm	97.7 ± 3.8	66.2 ± 5.5	8 (4:4)

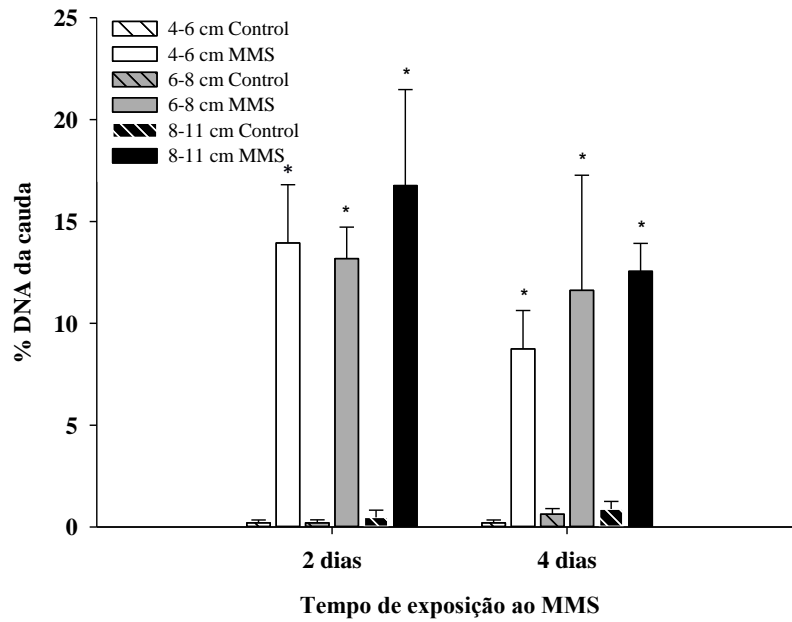
### ***Dano genotóxico medido como % DNA na cauda***

Observaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores de dano genotóxico nos indivíduos expostos durante dois e quatro dias ao MMS em relação aos controles negativos (Tabela 5; Fig. 8). Não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes tamanhos corporais dos indivíduos expostos a MMS para os diferentes períodos de tempo avaliados (Tabela 5; Fig. 8).

**Tabela 5:** Análises estatísticas do Experimento II (Teste U de Man Whitney) comparando a % DNA dos cometas entre os organismos tratados com MMS e os controles negativos e entre os diferentes tamanhos.

2 dias de exposição		
Comparação	Z ajustado	p
4-6 cm Control vs 4-6 cm MMS	-2.309	<b>0.021*</b>
6-8 cm Control vs 6-8 cm MMS	-2.309	<b>0.021*</b>
8-11 cm Control vs 8-11 cm MMS	-2.309	<b>0.021*</b>
4-6 cm MMS vs 6-8 cm MMS	-0.202	0.839
6-8 cm MMS vs 8-11 cm MMS	-0.624	0.533
4-6 cm MMS vs 8-11 cm MMS	-0.261	0.794
4 dias de exposição		
Comparação	Z ajustado	p
4-6 cm Control vs 4-6 cm MMS	-2.121	<b>0.034*</b>
6-8 cm Control vs 6-8 cm MMS	-2.449	<b>0.014*</b>
8-11 cm Control vs 8-11 cm MMS	-2.236	<b>0.025*</b>
4-6 cm MMS vs 6-8 cm MMS	-0.550	0.582
6-8 cm MMS vs 8-11 cm MMS	-1.056	0.291
4-6 cm MMS vs 8-11 cm MMS	-0.496	0.619

\* Significativo a 5%.



**Figura 8:** Média e erro da média da % DNA na cauda dos cometas em hemócitos de mexilhões *P. perna* expostos a 33 mg/L de MMS após dois e quatro dias de exposição com seus respectivos controles negativos (n=4 para cada tratamento/tempo). (\*) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do tratamento com MMS em relação ao controle.

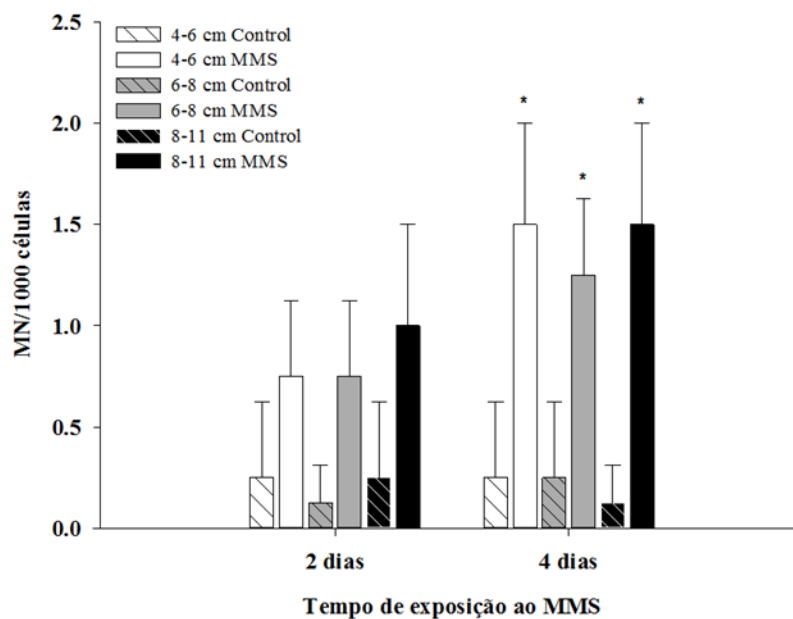
### ***Dano genotóxico avaliado em número de micronúcleos/1000***

Não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), entre o número de MN dos organismos do grupo controle e os organismos expostos durante dois dias ao MMS (Tabela 6; Fig. 9). No entanto, foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no número de MN entre os tratados com MMS e o grupo controle após quatro dias de exposição (Tabela 6; Figura 9).

**Tabela 6:** Análises estatísticas do Experimento II (Teste U de Man Whitney) comparando o número de MN entre os organismos tratados com MMS e os controles negativos e entre os diferentes tamanhos.

2 dias de exposição		
Comparação	Z ajustado	p
4-6 cm Control vs 4-6 cm MMS	-1.323	0.186
6-8 cm Control vs 6-8 cm MMS	-1.739	0.082
8-11 cm Control vs 8-11 cm MMS	-1.423	0.155
4-6 cm MMS vs 6-8 cm MMS	0.442	0.659
6-8 cm MMS vs 8-11 cm MMS	-0.652	0.514
4-6 cm MMS vs 8-11 cm MMS	-0.249	0.803
4 dias de exposição		
Comparação	Z ajustado	p
4-6 cm Control vs 4-6 cm MMS	-2.121	<b>0.034*</b>
6-8 cm Control vs 6-8 cm MMS	-2.449	<b>0.014*</b>
8-11 cm Control vs 8-11 cm MMS	-2.236	<b>0.025*</b>
4-6 cm MMS vs 6-8 cm MMS	-0.550	0.582
6-8 cm MMS vs 8-11 cm MMS	-1.056	0.291
4-6 cm MMS vs 8-11 cm MMS	-0.496	0.620

\* Significativo a 5%.



**Figura 9:** Média e erro da média do número de MN/1000 em hemócitos de mexilhões *P. perna* expostos a 33 mg/L de MMS após dois e quatro dias de exposição com seus respectivos controles negativos (n=4 para cada tratamento/tempo). (\*) Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do tratamento com MMS em relação ao controle.

### *Correlação do dano genotóxico com o comprimento, peso e sexo*

Não foi observada correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a % DNA na cauda dos cometas (Tabela 7), assim como o número de MN, com o comprimento, peso ou com o sexo dos organismos expostos a 2 e 4 dias ao MMS. Somente se constatou correlação entre o tamanho e peso dos mexilhões.

**Tabela 7:** Correlação de Spearman entre o dano genotóxico e o comprimento e peso médios e sexo dos organismos expostos durante dois e quatro dias a 33 mg/L de MMS. (Sobre a diagonal) para a % DNA na cauda dos cometas; (abaixo da diagonal) para o número de MN/1000. Em negrito as correlações significativas.

Tempo de exposição	Variável	Dano genotóxico	Comprimento	Peso	Sexo
Segundo dia	Dano genotóxico	*****	0,0280	0,0559	-0,4652
	Tamanho	0,0714	*****	<b>0,9580</b>	0,5140
	Peso	0,0252	<b>0,9580</b>	*****	0,3672
	Sexo	-0,0294	0,5141	0,3672	*****
Tempo de exposição	Variável	Dano genotóxico	Comprimento	Peso	Sexo
Quarto dia	Dano genotóxico	*****	0,5364	0,5000	-0,4518
	Tamanho	0,1472	*****	<b>0,9545</b>	-0,2582
	Peso	0,0491	<b>0,9509</b>	*****	-0,1936
	Sexo	0,1195	-0,3078	-0,2052	*****



### **III. AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DE MEXILHÕES *PERNA PERNA* CULTIVADOS EM DIFERENTES FAZENDAS DE MALACOCULTURA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

##### **3.1.1 Malacocultura**

A malacocultura é uma forma de aquicultura baseada na produção de bivalves como ostras, vieiras e mexilhões, principalmente para consumo humano. Esta atividade é muito difundida em águas costeiras como baías e enseadas, onde os cultivos são realizados no confinamento, através de sistemas de cordas e lanternas. A produção global de bivalves vem aumentando consideravelmente, com uma produção em 2010 de 14,2 milhões de toneladas (FAO, 2012).

No Brasil, a Secretaria de Aquicultura e Pesca (SAP) dentro do Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento vem estimulando unidades de cultivo em áreas de domínio da União. Atualmente Santa Catarina é o principal polo de malacocultura do país, cuja costa compreende 92 hectares de cultivos, divididas em aproximadamente 700 fazendas, para as quais se registrou uma produção total de 13,7 mil toneladas de mexilhões para o ano 2010 (Guzenski, 2014). Santa Catarina representa o maior produtor brasileiro de bivalves cultivados (responsável por mais dos 90% da produção nacional destes organismos) e o segundo na América Latina (FAO, 2012), perdendo em volume de produção somente para o Chile. Outras regiões do país vêm sendo estimuladas também, inclusive no estado do Rio de Janeiro (Ilha Grande, Saquarema, Arraial do Cabo, Armação dos Búzios, entre outras) (MPA, 2013).

Devido às características biológicas dos bivalves, alimentação de matéria orgânica particulada ou dissolvida e alta taxa de filtração, se houver contaminantes ou microrganismos causadores de doenças no meio, estes organismos poderão incorporá-los na sua biomassa utilizando a mesma rota de alimentação. Os contaminantes podem se acumular nos tecidos destes bivalves em concentrações de 1.000 a 10.000 vezes superiores

às verificadas nas fontes de exposição (UNEP, 2004). Desta forma, é necessário um controle da qualidade da água onde estes são cultivados, considerando que o cultivo de bivalves vem se intensificando na zona costeira, justamente aonde o adensamento populacional e a inserção de importantes fontes de emissão de poluentes vêm se estabelecendo. Adicionalmente, a zona costeira por se localizar na área de influência do fluxo de bacias hidrográficas, pode sofrer uma significativa degradação devido ao desenvolvimento humano à montante da bacia. Em muitas bacias hidrográficas, as emissões de espécies químicas como metais são superiores às cargas oriundas de fontes naturais (Lacerda et al., 2008; Molisani et al., 2013). Este cenário pode ocasionar o aumento das concentrações dos poluentes na zona costeira que podem ser incorporadas pelos bivalves comprometendo não somente as áreas de criação, mas também à população local.

### **3.1.2 Malacocultura no estado do Rio de Janeiro**

No estado do Rio de Janeiro, a Fundação do Instituto de Pesca (FIPERJ) encarrega-se de controlar a qualidade ambiental das diferentes fazendas que cultivam mexilhões. Destaca-se entre essas atividades o monitoramento das microalgas com potencial nocivo para a saúde humana. Também são realizadas análises de coliformes totais e fecais e de parâmetros físico-químicos da água nas fazendas de cultivo e arredores. Além destes controles, a FIPERJ presta assistência técnica e extensionista a maricultores para a elaboração de projetos para o licenciamento ambiental. Também, oferece cursos de capacitação e de boas práticas em locais como Angra dos Reis, Arraial do Cabo e Armação dos Búzios (FIPERJ Relatório Técnico, 2015).

Neste contexto, as áreas de estudo do presente trabalho estão focadas em três fazendas de cultivo de bivalves na costa do Estado do Rio de Janeiro, administradas por diferentes associações: Armação dos Búzios, Arraial do Cabo e Niterói. Estas regiões costeiras estão na área de influência de bacias hidrográficas e estuários que estão tendo um crescimento populacional e uma diversificação de atividades econômicas (IBGE, 2017), aumentando as emissões de poluentes e modificando possivelmente a qualidade ambiental com possíveis reflexos na composição dos organismos cultivados nestas águas.

### 3.1.3 Armação dos Búzios

O município está localizado na região da baixada litorânea sendo uma península onde o turismo pode ser considerado a principal atividade econômica que impulsionou o crescimento demográfico de aproximadamente 18.000 para 31.674 habitantes aproximadamente, entre 2000 e 2017 (IBGE, 2017). Na ausência de dados, podemos supor que não há consideráveis fontes de poluição para a região, embora o alto número de embarcações e a presença de navios transatlânticos de turismo na região podem produzir alterações na qualidade das águas das praias da região (Laudo Técnico INEA-Prefeitura de Búzios, 2014).

Na Praia Rasa, em frente ao canal da Marina encontra-se a fazenda de malacocultura (22°44'20.10"S e 41°56'52.30"O) (Fig. 10c) administrada pela Associação dos Trabalhadores de Maricultura (ATA). A fazenda foi inaugurada em 2011 e conta com assistência técnica e acompanhamento dos cultivos da FIPERJ. Atualmente produz aproximadamente 1800 Kg de mexilhão por ano (FIPERJ Relatório Técnico, 2015).

Um fator importante que deve ser analisado em vista da qualidade das águas para a produção de bivalves é o sistema de correntes hidrológicas na região. Devido Búzios ser uma península, ela tem uma vertente voltada para o setor norte do estado que recebe influência de ondas do N e NE com intensidade fraca a moderada, enquanto que a vertente exposta ao sul recebe ondas moderadas do S e SE, incluindo frentes frias. Estas diferenças influenciam na dispersão de sedimentos que na vertente norte é também influenciada pelo aporte fluvial de rios, criando uma área de deposição de partículas de areia fina e argila protegidas das correntes e frentes frias do S e SE (Bulhões et al., 2011). A dispersão de sedimentos finos com origem fluvial na vertente norte da península de Búzios já altera a qualidade das águas da região. Os dados de Godiva et al. (2010) mostraram que o aumento da deposição de sedimentos vem aterrando uma espécie de recife de coral na praia da Tartaruga, sendo parte destes sedimentos de origem fluvial transportados pelas correntes do N e NE. Este estudo identificou que as partículas são originadas da bacia hidrográfica do Rio Macaé localizada a 44 km de distância. Este fato é o resultado das alterações sofridas na bacia hidrográfica do Rio Macaé e seu estuário nas últimas décadas (Molisani et al.,

2013). Desta maneira, os poluentes liberados no estuário do Rio Macaé poderiam atingir a vertente norte da península de Búzios e afetar a maricultura desenvolvidas nesta região.

Soares et al. (2016), constataram que na área de cultivo da Praia Rasa teve teores de coliformes termotolerantes ou coliformes fecais acima do que recomenda a resolução CONAMA 357 em pelo menos quatro coletas no verão de 2014 e de 2015. Estes coliformes termotolerantes tem como origem a estação de tratamento de águas residuárias que está em operação próxima à fazenda marinha. O efluente final é despejado no canal da Marina podendo alcançar a fazenda de cultivo.

### **3.1.4 Arraial do Cabo**

O município está localizado na região dos Lagos, com uma população aproximada de 29.077 habitantes (IBGE, 2017), representa uma importante área turística no estado do Rio de Janeiro devido à transparência de suas águas e à grande produtividade biológica que ocorre nelas. Esta grande produtividade é causada pelo fenômeno de ressurgência que ocorre na região. Este fenômeno é único no Atlântico Oriental Sul e acontece devido às características morfológicas da costa associadas aos ventos predominantes (nordeste e leste). O sistema de correntes associado com os ventos traz massas de águas frias ricas em nutrientes, que de águas profundas sobem para a superfície, aumentando assim a produção primária do local, formando a base da cadeia alimentar do ecossistema. A água de ressurgência é caracterizada por temperaturas inferiores a 18° C e aflora principalmente durante a primavera e o verão, quando os ventos nordeste e leste são mais intensos e frequentes (Valentin et al., 1987).

A costa de Arraial do Cabo faz parte da reserva extrativista marinha (RESEXMAR- Decreto S/N° de 3 de Janeiro de 1997), que tem a finalidade de preservar a paisagem e os recursos naturais permitindo a exploração sustentável dos recursos pesqueiros pela população local. A partir do ano 2001, se iniciou o projeto de maricultura na Praia do Forno (22°58'2.83"S e 42°0'26.25"O) (Fig. 10b) impulsionado pela Associação dos Pescadores de Arraial do Cabo (APAC) a fim de ajudar a comunidade de pescadores a obter uma renda extra e ao mesmo tempo diminuir a pressão do extrativismo no local. Hoje em dia a fazenda

de malacocultura produz aproximadamente um total de 1.017 Kg de mexilhões, 884 dúzias de ostras e 2.761 dúzias de vieiras por ano (FIPERJ Relatório Técnico, 2015).

Não existem fontes consideráveis de poluição antrópica para as diferentes praias da região, embora poderia considerar-se preocupante o canal que desemboca na Praia do Pontal. Este canal mantém uma água salobra (salinidade em torno de 25), eutrofizada, de coloração escura e com uma alta taxa de coliformes segundo as Resoluções 274 e 357 do CONAMA, que na maré baixa vai para o mar formando uma pluma nas imediações do canal. Foi detectado um impacto ambiental produzido pelo esgoto nas comunidades de peixes recifais e macrobentos associados ao costão rochoso desta praia, onde registraram-se alterações na abundância de certas espécies tanto de peixes como de bentos (Correal, 2011).

Outro tipo de poluição que deveria ser considerada é a produzida pelas tintas anti-incrustantes (*antifouling*) com o composto tributilestanho (TBT) que são utilizadas nas diferentes embarcações. Estes compostos produzem um fenômeno de desregulação endócrina em gastrópodes marinhos, os quais podem ser utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental. Toste et al. (2011) registraram um aumento significativo na ocorrência e intensidade desse fenômeno em vários pontos de Arraial de Cabo, entre os anos 2001 e 2008, destacando-se os pontos pertos do porto do Forno, aonde estes gastrópodes desapareceram.

### **3.1.5 Niterói**

Município limítrofe com a Baía de Guanabara, com população estimada em 497.883 habitantes (IBGE, 2017) e uma área de 133.919 km<sup>2</sup>, integra a Região Metropolitana do Rio de Janeiro e apresenta um importante desenvolvimento industrial. O lançamento de esgoto doméstico sem tratamento, dos despejos de instalações industriais e da disposição não controlada de resíduos sólidos, tem gerado um impacto ambiental nas águas da Baía da Guanabara provocando uma diminuição da abundância e da biodiversidade das espécies nativas da região (Mendes et al., 2007; Villac e Tenenbaum, 2010).

Na Praia Grande, localizada no centro da cidade (22°53'31.5"S e 43°07'54.1"O) (Fig. 10a), foi implantada uma corda de cultivo experimental de mexilhões *P. perna* com a

finalidade de avaliar o dano genotóxico que sofrem os mexilhões nesse ambiente. Esta corda experimental foi monitorada pela Associação de Pescadores e Amigos de São Pedro da Praia Grande (APASP). Embora, esta comunidade pesqueira dedique-se majoritariamente à pesca artesanal, também trabalha com mexilhões, mas pratica o recolhimento de mexilhões já adultos de diferentes costões rochosos da baía.

Avaliações para coliformes fecais na água do mar indicam, em várias regiões da baía, uma situação imprópria para cultivo ou extração de mexilhões. A coleta do mexilhão nas áreas mais internas da baía foi descontinuada, mantendo-se, porém inalterada ao longo dos últimos 20 anos em Niterói (Lage e Jablonski, 2008). Existe uma ampla bibliografia publicada onde são descritas os diferentes tipos de poluição da Baía de Guanabara e seus efeitos nas comunidades biológicas. Vários destes estudos revelaram o alto nível de metais pesados da baía, avaliados nos sedimentos (Francioni et al., 2004; Pereira et al., 2007), assim como diretamente em mexilhões da espécie *P. perna* (Sáenz et al., 2010). Esta espécie também foi utilizada para biomonitorar a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na baía (Francioni et al., 2007a e b; Yoshimine et al., 2012). Segundo o diagnóstico preliminar de Jorge et al. (2002) das águas dentro da baía na costa de Niterói, os valores de coliformes foram superiores aos permitidos pela resolução SERPA-SC nº 97/1988. O autor sugere o estabelecimento de fazendas marinhas de malacocultura em locais com baixo índice de poluição, por exemplo, a costa oceânica de Niterói.

### **3.1.6 Objetivos específicos**

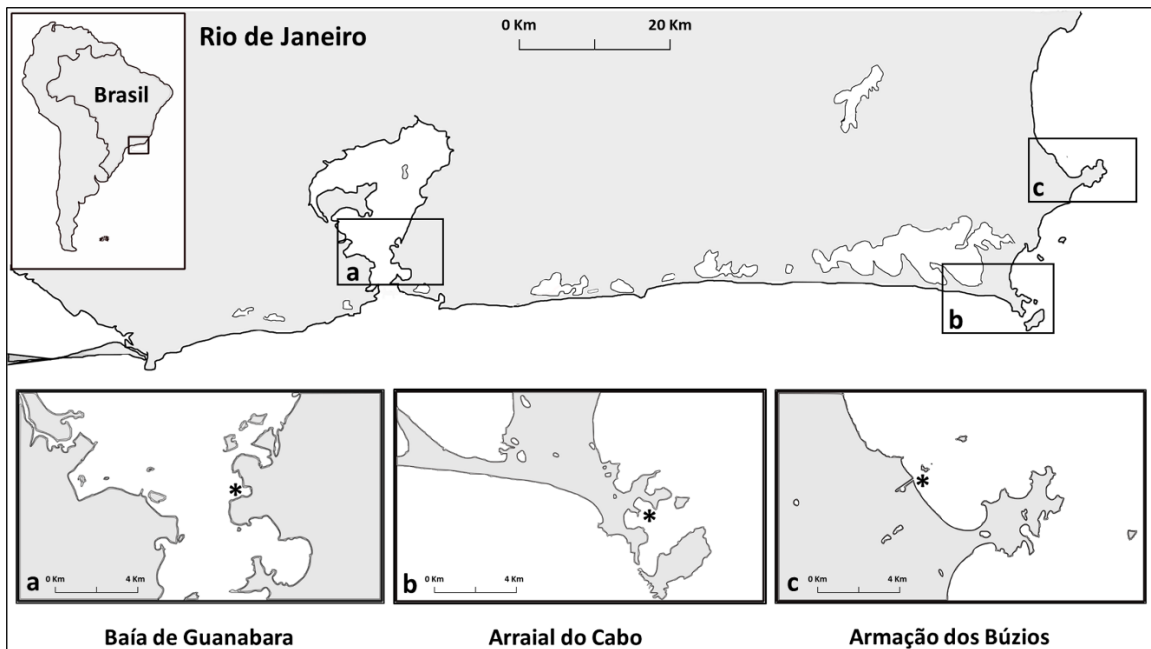
- Avaliar o grau de dano genotóxico dos mexilhões *P. perna* de duas áreas de cultivo no estado de Rio de Janeiro (Armação dos Búzios e Arraial do Cabo) e uma corda de transplante (Niterói) ao longo de um ano.
- Relacionar os valores obtidos de dano genotóxico com as atividades humanas associadas e demografia da região.

- Determinar qual dos ensaios de genotoxicidade (EC e Teste do MN) utilizados representa uma ferramenta mais adequada e sensível para monitoramento da poluição ambiental nas áreas de cultivo de mexilhões.

## 3.2 MATÉRIAS E MÉTODOS

### 3.2.1 Áreas de estudo

Foram realizadas quatro coletas simultâneas ao longo de um ano nas três fazendas de malacocultura mencionadas na introdução deste capítulo: fazenda da Praia Rasa em Armação dos Búzios, fazenda da Praia do Forno em Arraial do Cabo e na fazenda de Praia Grande em Niterói (Fig. 10).



**Figura 10:** Localização das áreas de cultivo de mexilhões no estado de Rio de Janeiro: a) Praia Grande, Niterói, b) Praia do Forno, Arraial do Cabo e c) Praia Rasa, Armação dos Búzios. Modificado de Google Maps.

Dez indivíduos de *P. perna* foram coletados em cada fazenda para cada estação do ano: primavera (novembro 2015), verão (março 2016), outono (junho 2016) e inverno

(agosto 2016). Os mesmos foram transportados imediatamente para o laboratório, onde foram mantidos em aquários com uma densidade de 1 indivíduo a cada 2 L de água da mesma fazenda; sem suplemento alimentar; a temperatura de 24°C e aeração constante.

Após um dia nos aquários, os mexilhões foram retirados e determinados seu comprimento, peso e sexo. A seguir, foi extraída a hemolinfa para logo realizar o EC e teste do MN, utilizando o mesmo protocolo descrito nos pontos 2.2.3, 2.2.4 e 2.2.5. As análises estatísticas foram as mesmas descritas no ponto 2.2.6.

### 3.3 RESULTADOS

#### *Características dos organismos coletados*

O comprimento e o peso médios e a quantidade de fêmeas e machos dos organismos analisados para cada fazenda e data são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Comprimento e peso médio, e número de fêmeas e machos dos organismos analisados para cada fazenda nas 4 temporadas de coleta.

Fazenda de cultivo	Comprimento (mm)	Peso (g)	N (fêmeas:machos)
Búzios	78.9 ± 8.6	44.7 ± 8.6	40 (24:16)
Arraial do Cabo	81.3 ± 9.0	44.6 ± 13.1	40 (22:18)
Niterói	80.0 ± 7.7	54.3 ± 17.1	40 (21:19)

#### *Dano genotóxico avaliado como % DNA na cauda do cometa*

Os valores de dano genotóxico medidos como % DNA na cauda do cometa, obtidos pelo EC, mostraram que não houve diferenças significativas entre as 4 temporadas de coleta para cada fazenda de cultivo (Kruskal-Wallis:  $p = 0.234$  para Búzios;  $p = 0.067$  para Arraial do Cabo;  $p = 0.068$  para Niterói). Os maiores níveis de dano genotóxico foram registrados nos mexilhões cultivados na fazenda de Niterói (Fig. 11). Estes apresentaram uma % DNA na cauda dos cometas de  $3,9 \pm 1,7$  e  $4,3 \pm 1,1$  na primeira e na segunda coleta, respectivamente. Estes valores diferenciaram-se significativamente ( $p < 0,01$ ; Tabela 9) dos

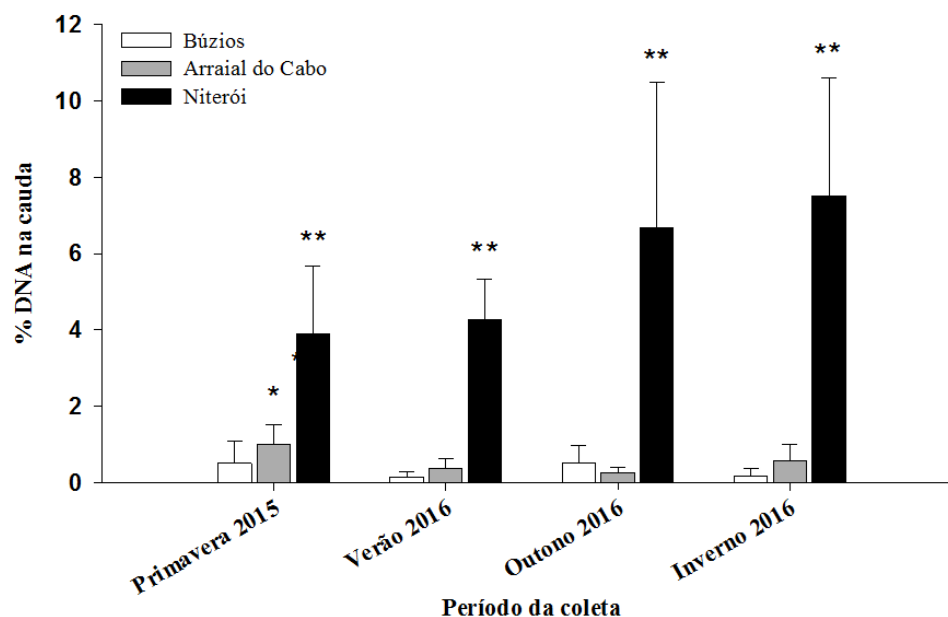


valores de % DNA dos mexilhões cultivados em Búzios e em Arraial do Cabo para ambas as coletas. O dano genotóxico dos mexilhões cultivados em Búzios diferenciou-se ( $p < 0,05$ ; Tabela 9) do dano genotóxico dos mexilhões cultivados no Arraial do Cabo.

**Tabela 9:** Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando a % DNA dos cometas entre os organismos cultivados nas diferentes fazendas para cada temporada.

Comparação	Primavera 2015		Verão 2016		Outono 2016		Inverno 2016	
	Z ajust.	p	Z ajust.	p	Z ajust.	p	Z ajust.	p
Búz. vs Arr.	-1.836	0.0663	-2.192	<b>0.0284*</b>	0.378	0.7055	-1.663	0.0963
Búz. vs Nit.	-3.907	<b>0.0001*</b>	-3.778	<b>0.0002*</b>	-3.779	<b>0.0002*</b>	3.873	<b>0.0001*</b>
Arr. vs Nit.	-3.429	<b>0.0006*</b>	-3.778	<b>0.0002*</b>	-3.779	<b>0.0002*</b>	3.873	<b>0.0001*</b>

\*Significativo a 5%



**Figura 11:** Média e erro da média das % DNA na cauda dos cometas em hemócitos de mexilhões *P. perna* coletados nas áreas marinhas de cultivo de Búzios, Arraial do Cabo e Niterói. Para os 4 períodos de coleta. (n=10 para cada sitio). Diferenças significativas: (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,0005$ ) das fazendas comparadas com a fazenda de Búzios

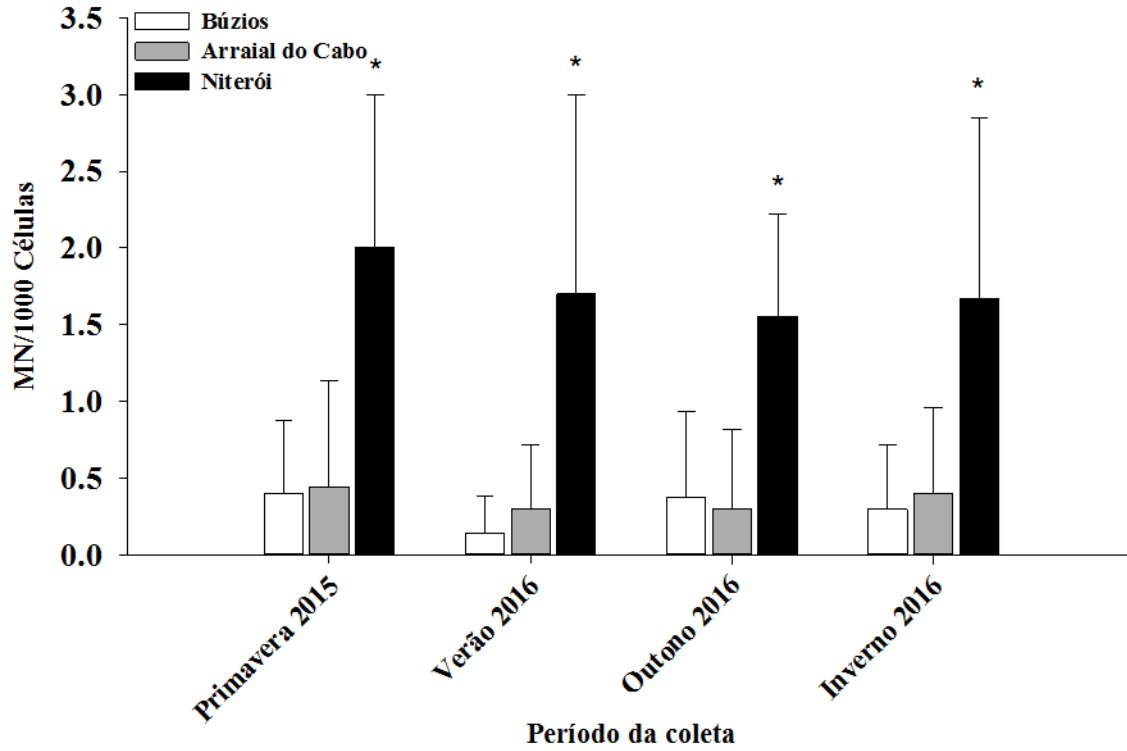
### ***Dano genotóxico avaliado em número de micronúcleos/1000***

O Teste do MN apresentou um panorama similar, não foram registradas diferenças significativas entre as 4 temporadas de coleta para cada fazenda de cultivo (Kruskal-Wallis:  $p = 0.641$  para Búzios;  $p = 0.936$  para Arraial do Cabo;  $p = 0.991$  para Niterói). Os organismos cultivados na fazenda de Niterói apresentaram o maior número de MN, com uma frequência máxima de  $2,0 \pm 1,0$  MN/1000 células registrada na primeira coleta (Figura 12). Estes valores diferenciaram-se significativamente ( $p < 0,05$ ; Tabela 10) dos mexilhões cultivados em Búzios para as primeiras 3 coletas e em Arraial do Cabo para todas as coletas. Os mexilhões de Búzios e de Arraial do Cabo não apresentaram diferenças significativas entre eles ( $p > 0,05$ ; Tabela 10) nos seus números de MN formados para nenhuma das coletas.

**Tabela 10:** Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando o número de MNs entre os organismos cultivados nas diferentes fazendas para cada temporada.

Comparação	Primavera 2015		Verão 2016		Outono 2016		Inverno 2016	
	Z ajust.	p	Z ajust.	p	Z ajust.	p	Z ajust.	p
Búz. vs Arr.	0.213	0.831	-0.729	0.466	0.178	0.859	0.348	0.727
Búz. vs Nit.	-2.797	<b>0.049*</b>	-2.335	<b>0.019*</b>	-2.309	<b>0.015*</b>	-1.901	0.057
Arr. vs Nit.	-2.306	<b>0.021*</b>	-2.242	<b>0.025*</b>	-2.797	<b>0.009*</b>	-2.225	<b>0.037*</b>

\*Significativo a 5%



**Figura 12:** Média e erro da média dos MN em 1000 hemócitos de mexilhões *P. perna* coletados nas áreas marinhas de cultivo de Búzios, Arraial do Cabo e Niterói. Para os 4 períodos de coleta. (n=10 para cada sitio). Diferença significativa: (\* p<0,05;) das fazendas comparadas com a fazenda de Búzios

### *Correlação do dano genotóxico com o comprimento, peso e sexo*

Não foi observada correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a % DNA na cauda dos cometas (Tabela 11), assim como no número de MN, com o comprimento, peso ou sexo dos organismos cultivados na fazenda de Niterói coletados em todas as temporadas.

**Tabela 11:** Correlação de Spearman entre o dano genotóxico e o comprimento, peso médio e sexo dos organismos cultivados na fazenda de Niterói nas 4 temporadas de cultivo. (Sobre a diagonal) para a % DNA na cauda dos cometas; (abaixo da diagonal) para o número de MN/1000. Em negrito as correlações significativas.

Variável	Dano genotóxico	Tamanho	Peso	Sexo
Dano genotóxico	*****	0.3722	0.4020	0.0163
Tamanho	0.2514	*****	<b>0.9394</b>	-0.3186
Peso	0.2353	<b>0.9394</b>	*****	-0.3349
Sexo	-0.1367	-0.3186	-0.3349	*****

## **IV. AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DE MEXILHÕES *PERNA PERNA* EM DIFERENTES COSTÕES ROCHOSOS DA CIDADE DE MACAÉ.**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

#### **4.1.1 Estudos de biomonitoramento genotóxico com mexilhões**

Estudos de biomonitoramento com mexilhões tem reportado uma alta variabilidade no dano genético e na frequência de MN em comparação com bioensaios feitos em laboratórios (Rank e Jensen, 2003; Gorbi et al., 2008; Frenzilli et al., 2009). Existem vários fatores que poderiam explicar esta variabilidade na genotoxicidade e citotoxicidade, como a presença de diversos poluentes no ambiente e com concentrações variadas. Também, a constituição genética de mexilhões e suas populações podem ser responsável em parte por diferenças nas respostas frente aos diversos poluentes presentes (Bolognesi e Cirillo, 2014).

Além disto, existem fatores que podem prejudicar o poder de discriminação dos ensaios genotóxicos e citotóxicos em estudos de biomonitoramento. Dentro dos fatores bióticos encontram-se a idade, o gênero e o estado de reprodução do organismo bioindicador, os quais estão diretamente ligados às taxas de respiração e de assimilação alimentar. Também estão diretamente relacionados com a capacidade que tem o metabolismo de modular a bioconcentração e desintoxicação dos poluentes. Dentro dos fatores abióticos, poderiam encontrar-se a temperatura, salinidade, pH, concentração do oxigênio dissolvido e disponibilidade do alimento (Bolognesi e Fenech, 2012). A temperatura da água tem um efeito direto na taxa de divisão celular e, conseqüentemente com possíveis erros genéticos assim como diferenciação na frequência de MNs (Baršienė et al., 2012). Vários estudos demonstraram que os valores basais na frequência de MN em mexilhões selvagens, são menores em latitudes temperadas e frias em comparação com as latitudes quentes ou tropicais (Bolognesi e Fenech, 2012).

Definir um sitio de referência é importante na hora de levar a cabo um estudo de biomonitoramento. Este sitio de referência é caracterizado por ter um baixo nível de poluentes e permite uma comparação direta com os restantes sítios de interesse. A urbanização das áreas costeiras torna difícil encontrar um sitio de referênciadevido a fatores

demográficos que influenciam as quantidades de efluentes que chegam aos corpos de água costeiros (Mitchelmore e Chipman, 1998).

#### **4.1.2 Macaé**

O Município de Macaé está localizado no Estado do Rio de Janeiro, pertence à Região Norte Fluminense, possui uma área total de 1.219,8 km<sup>2</sup> e apresenta diversos pontos turísticos, como as praias e a região serrana (Macaé, 2017). A partir da década de 70, com a instalação da base da PETROBRAS, Macaé veio estabelecendo-se como o epicentro das atividades relacionadas à cadeia produtiva do petróleo e gás *offshore* no país, registrando-se um crescimento industrial e econômico acelerado na região (Costa, 2010). Esta mudança abrupta na economia da cidade trouxe a criação de novos postos de trabalho, provocando um crescimento demográfico que quintuplicou a população do município. Macaé passou de 47.220 habitantes em 1970 para 239.471 habitantes em 2016 (IBGE, 2017). Estas mudanças no município geraram como consequência, uma pressão cada vez maior sobre os recursos hídricos, modificando as condições ambientais e diminuindo assim a sua qualidade (Ressiguiet, 2011).

Por estes motivos foram escolhidos diferentes pontos no município de Macaé, com diferentes características e tipo de contaminação presente, de acordo com o reportado na literatura (Molisani et al., 2013; Santiago et al., 2016), para avaliar o efeito genotóxico destes contaminantes sobre os mexilhões. Os sítios escolhidos foram: a) Estuário do Rio Macaé (22°22'26.4"S e 41°46'21.9"O), b) Praia Campista (22°23'22.5"S e 41°46'05.3"O), c) Praia das Pedrinhas (22°25'32.5"S e 41°49'43.4"O) e d) Arquipélago do Santana (22°23'48.2"S e 41°41'35.1"O). Estas regiões já foram monitorados em trabalhos anteriores (Molisani et al., 2013; Santiago et al., 2016), apresentando diferentes níveis e tipos de poluentes.

#### **4.1.3 Estuário do Rio Macaé**

O Rio Macaé pertence à VIII Região Hidrográfica do Estado do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, 2006). Ocupa um território de 1.765 km<sup>2</sup>, dos quais 82 % desse território

localiza-se dentro dos limites do município de Macaé. O Rio Macaé atualmente é utilizado como abastecedor de água para diferentes atividades produtivas, sendo que essa água, após ser utilizada, retorna para os solos ou para os corpos hídricos da região na forma de efluentes sem tratamento. Dentro das funções que o rio desempenha destacam-se: a diluição de despejos domésticos, industriais e agrícolas, irrigação nas atividades mineiras e a geração de energia elétrica, entre outras funções. O esgoto doméstico sem tratamento, o lixo doméstico e a pecuária são os principais responsáveis pela carga de elementos químicos, como metais pesados e nutrientes com potencial de degradação da qualidade da água (Esteves et al., 2015).

O ponto de coleta está situado nas rochas da foz do Rio Macaé, perto do mercado de peixes de Macaé. Nesse ponto a influência marinha é importante, permitindo o estabelecimento do mexilhão *P. perna* nos costões rochosos. O estuário do Rio Macaé representa a porção final da bacia hidrográfica e localiza-se na área urbana de Macaé. Este estuário já apresenta indícios de contaminação da água e impactos na biodiversidade pela carga de elementos químicos (Costa, 2010; Molisani et al. 2012). As fontes antrópicas são as responsáveis pela maior parte das emissões de nutrientes como nitrogênio (N) e fósforo (P), assim como de metais de interesse ambiental, enquanto que as fontes naturais (lixiviação de solos e deposição atmosférica) são consideradas irrelevantes (Molisiani et al., 2013). As coletas ao longo de um ano realizadas por Berenger (2013), revelaram a presença de três tipos de HPAs derivados do petróleo, em baixas concentrações no estuário. As fontes de derivados de petróleo no estuário são diversas, incluem-se: a frota náutica do município, o derrame dos barcos que utilizam o estuário e todas as atividades antrópicas que utilizam esses derivados e o descartam no ambiente. No trabalho de Santiago (2014), se confirmou a presença de HPAs e metais pesados bioacumulados em mexilhões da espécie *P. perna* e o autor classificou como alto o grau de contaminação do estuário do Rio Macaé.

#### **4.1.4 Praia Campista**

O ponto de coleta está situado no extremo leste da Praia Campista, num píer de pedra realizado para proteger as instalações da PETROBRAS. O ponto localiza-se perto das instalações petroleiras, que contém o Porto de Imbetiba. Este porto iniciou suas operações

no ano de 1979, com a finalidade de atender às necessidades das plataformas de petróleo da bacia de Campos. O Terminal de Imbetiba conta com aproximadamente 55 mil metros quadrados de área e um calado operacional de 7,5 metros; possui três píeres de 90 m de comprimento e 15 m de largura, totalizando seis berços. O porto atende a mais de 100 plataformas que atuam na perfuração, produção de campos petrolíferos e manutenção de poços, o que explicita um grande fluxo de embarcações na área (Grisostolo, 2012).

Estas atividades no Porto de Imbetiba teriam como consequência possíveis impactos negativos, os quais poderiam significar riscos ecológicos aos ecossistemas associados a sua área de influência. Santiago (2014) definiu a contaminação para a área que vai ser analisada como “moderada” para metais pesados e HPAs.

#### **4.1.5 Praia das Pedrinhas**

O ponto de coleta está situado no município de Rio das Ostras, perto do limite com o município de Macaé. Trata-se de um costão rochoso natural nas cercanias da Lagoa de Imboassica, numa área sem construções imobiliárias. A área não tem atividade turística pelo difícil acesso e a única possível fonte de contaminação é o canal que vaza água da lagoa até o mar. Segundo Santiago et al. (2016) a contaminação da Praia das Pedrinhas foi classificada como “baixa a moderada”.

A Lagoa de Imboassica possui uma área total de 3.26 km<sup>2</sup>, com largura máxima de 1.3 km e comprimento máximo de 5.3 km. A partir da década dos 90 intensificou-se a ocupação urbana em prédios ao redor da lagoa, modificando assim as características do ecossistema (Esteves, 1998). Com o aumento da população na área, o lançamento esgoto doméstico sem tratamento oriundo dos condomínios e residências consequentemente se intensificou, bem como os despojos industriais associados à bacia hidrográfica da lagoa. Estes lançamentos sem tratamento provocaram um incremento na carga de nutrientes levando a um processo de eutrofização da lagoa (Henriques de Oliveira et al., 2007).



#### **4.1.6 Ilha do Francês**

O ponto de coleta localiza-se no Arquipélago do Santana, mais especificamente na costa norte da Ilha do Francês (350 m<sup>2</sup>). Além desta ilha, o arquipélago está constituído pela Ilha do Santana (1,29 km<sup>2</sup>), Ilhote do Sul (120 m<sup>2</sup>) e alguns rochedos e lajes adjacentes. Este conjunto de ilhas foi definido como Parque Municipal e Área de Preservação Ambiental (APA), pela Lei Municipal 1216 de 1989 e regulamentado pelo decreto 018/2011. O mesmo tem uma área de proteção ambiental com um raio de 16 km a partir do ponto central do arquipélago.

Este sitio foi escolhido como sito de referência do estudo. Carvalho et al. (2001), avaliaram a concentração de metais pesados bioacumulados em mexilhões *P. perna*, demonstram a baixa acumulação dos metais nestes organismos na Ilha do Santana. Por outro lado, Santiago (2014) verificou um aumento nas concentrações da maioria dos metais pesados, em comparação com o trabalho de Carvalho et al. (2001), e registrou também uma baixa contaminação média por HPAs. Estes resultados geram uma preocupação a respeito da qualidade ambiental, indicando a necessidade de mais estudos ambientais na área.

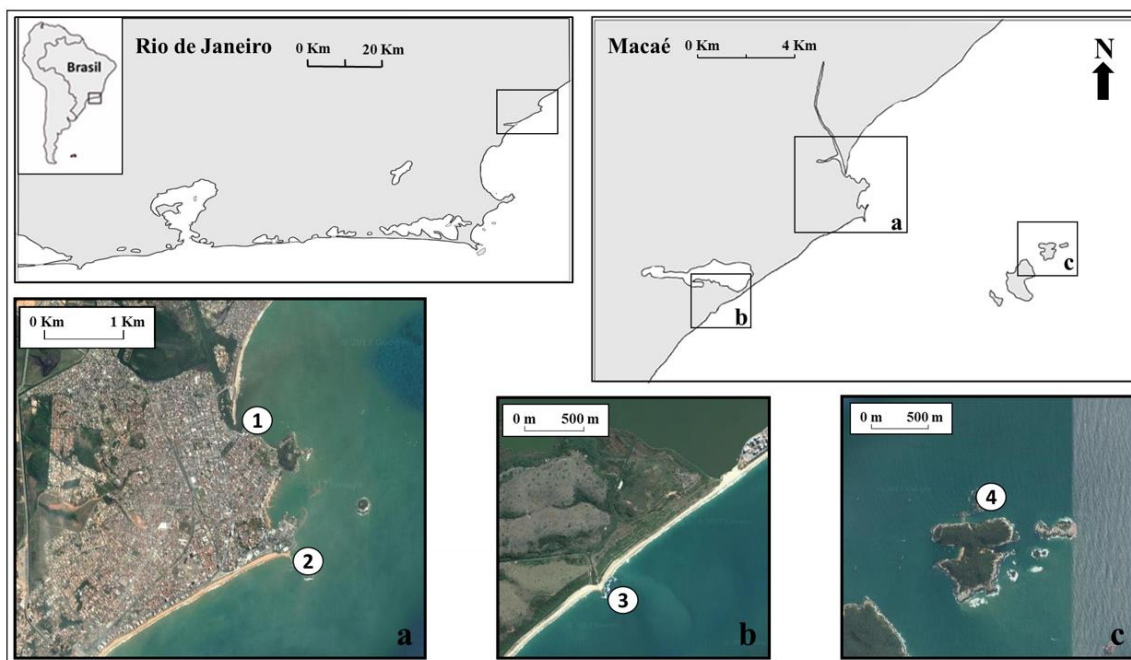
#### **4.1.7 Objetivos específicos**

- Avaliar o grau de genotoxicidade observado em mexilhões *P. perna* provenientes de diferentes costões rochosos localizados na cidade de Macaé e regiões próximas.
- Determinar em qual dos locais estudados os mexilhões apresentam os maiores níveis de genotoxicidade como um indicativo de área contaminada.
- Avaliar se os níveis de dano genotóxico obtidos de animais do ambiente podem constituir uma boa ferramenta para detectar poluição.

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 Coleta e processamento dos organismos

Foram realizadas duas coletas simultâneas no ano 2016, uma no final do mês de setembro e a outra no final do mês de novembro nos quatro pontos de coleta anteriormente mencionados na introdução deste capítulo: Estuário do Rio Macaé, Praia Campista, Praia das Pedrinhas e Ilha do Francês (Fig. 13).



**Figura 13:** Pontos de coleta localizados na cidade de Macaé e regiões próximas, 1:Estuário do Rio Macaé; 2: Praia Campista; 3: Praia das Pedrinhas e 4: Ilha do Francês (Arquipélago do Santana). Modificado de Google Maps.

Foram realizadas medições de temperatura, salinidade, pH e concentração de oxigênio dissolvido diretamente no campo através de um multiparâmetro Ysi Pro-plus com uma resolução de temperatura de 0.1 °C, 0.01 ppt para a salinidade e 0.01 mg/l para o oxigênio dissolvido.

Dez indivíduos de *P. perna*, com um comprimento total entre 5.0 cm e 8.0 cm, foram coletados em cada ponto e para cada mês de coleta. Os mesmos foram transportados

imediatamente para o laboratório, onde foram mantidos em aquários com uma densidade de 1 indivíduo a cada 2 L de água do mesmo costão do qual foram extraídos; sem suplemento alimentar; a temperatura de 24°C e aeração constante. Após um dia de permanência no aquário, os mexilhões foram retirados dos aquários, determinado seu comprimento, peso e sexo. A seguir, foi extraída a hemolinfa para logo realizar o EC e teste do MN, utilizando o mesmo protocolo descrito nos pontos 2.2.3, 2.2.4, 2.2.5 e 2.2.6.

### 4.3 RESULTADOS

#### *Parâmetros ambientais*

As medias dos diferentes parâmetros ambientais (temperatura, salinidade, concentração do oxigênio dissolvido [OD] e pH) das duas coletas, para os 4 sítios de estudo, apresentam-se na Tabela 12.

**Tabela 12:** Media e desvio padrão dos parâmetros ambientais para as duas coletas (setembro e novembro do 2017).

Ponto de coleta	Temperatura (°C)	Salinidade	OD (mg/L)	pH
Rio Macaé	22.8 ± 0.2	32.8 ± 0.7	7.2 ± 0.1	7.5 ± 0.1
Praia Campista	22.5 ± 0.3	33.5 ± 0.3	8.4 ± 1.3	7.6 ± 0.0
Praia das Pedrinhas	22.2 ± 0.5	33.6 ± 0.6	8.3 ± 0.7	7.6 ± 0.1
Ilha do Francês	23.4 ± 0.4	34.4 ± 0.1	7.9 ± 0.5	7.5 ± 0.0

#### *Características dos organismos coletados*

O comprimento e peso médio e a quantidade de fêmeas e machos dos organismos analisados para cada fazenda e data de coleta são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13:** Comprimento e peso médio e quantidade de fêmeas e machos dos organismos analisados para cada sitio e data.

Ponto de coleta	Comprimento (mm)	Peso (g)	N (fêmeas:machos)
Rio Macaé	65.6 ± 4.1	21.2 ± 4.0	20 (13: 7)
Praia Campista	65.4 ± 9.9	28.3 ± 9.3	20 (10: 10)
Praia das Pedrinhas	61.9 ± 4.4	22.4 ± 43.5	20 (9: 11)
Ilha do Francês	70.9 ± 9.3	35.2 ± 9.7	20 (10: 10)

### ***Dano genotóxico avaliado como % DNA na cauda do cometa***

Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de dano genotóxico medido como % DNA na cauda de cometas entre as duas temporadas de coleta para cada sitio amostral ( $p < 0,05$ ; Tabela 14). O EC evidenciou os maiores níveis de dano genotóxico para os mexilhões localizados no estuário do Rio Macaé (Fig. 14). Estes apresentaram uma % DNA media na cauda dos cometas de  $5.23 \pm 1.86$ , diferenciando-se significativamente do resto dos sítios de coleta (Tabela 15). Os valores médios de dano genotóxico dos sítios Praia Campista e Praia das Pedrinhas não se diferenciaram significativamente entre si, mas apresentam diferenças significativas com respeito aos mexilhões da Ilha do Francês (Tabela 15).

**Tabela 14:** Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando a % DNA dos cometas das duas temporadas para cada ponto de coleta.

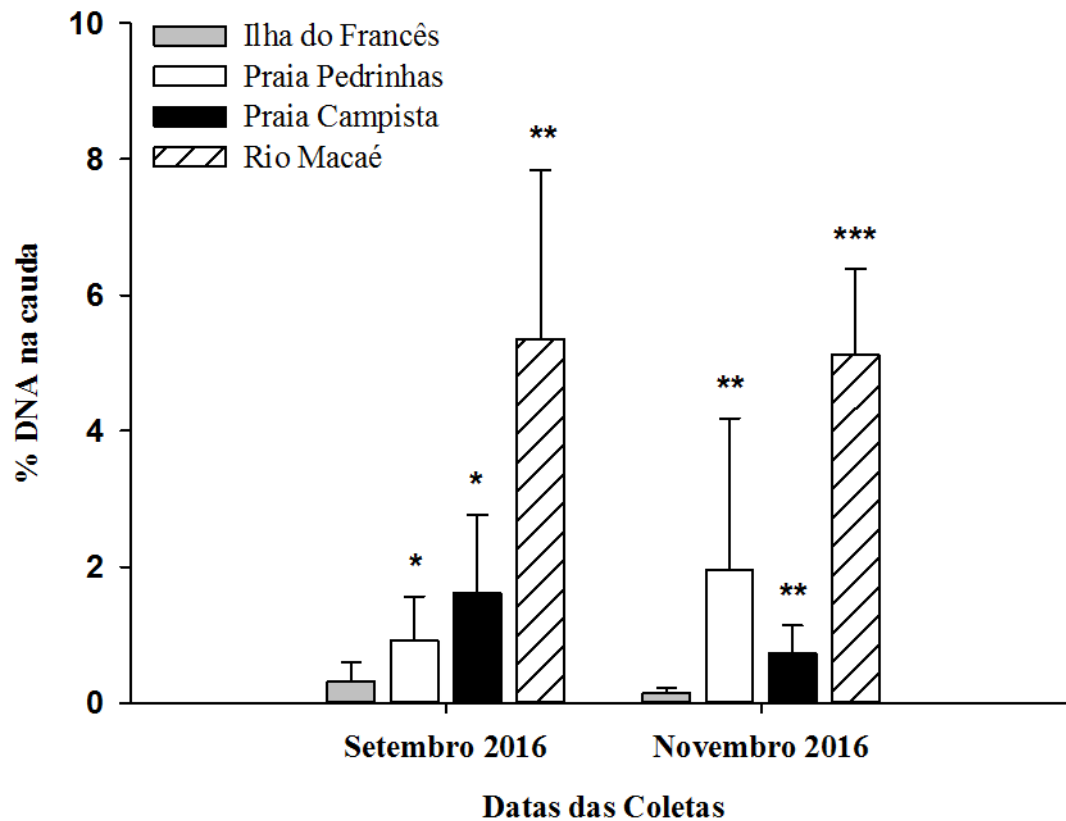
Ponto de coleta	Z ajustado	p
Rio Macaé	0.076	0.939
Praia Campista	0.898	0.369
Praia das Pedrinhas	1.133	0.256
Ilha do Francês	-1.209	0.226

\* Significativo a 5%.

**Tabela 15:** Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando a % DNA dos cometas entre os diferentes pontos de coleta para cada temporada.

Setembro 2016	Z ajustado	p
Rio Macaé vs Campista	2.797	<b>0.0052*</b>
Rio Macaé vs Pedrinhas	3.250	<b>0.0011*</b>
Rio Macaé vs Ilha do Francês	3.628	<b>0.0002*</b>
Campista vs Pedrinhas	1.134	0.2568
Campista vs Ilha do Francês	2.419	<b>0.0156*</b>
Pedrinhas vs Ilha do Francês	2.192	<b>0.0283*</b>
Novembro 2016	Z ajustado	p
Rio Macaé vs Campista	3.779	<b>0.0002*</b>
Rio Macaé vs Pedrinhas	2.797	<b>0.0052*</b>
Rio Macaé vs Ilha do Francês	3.674	<b>0.0002*</b>
Campista vs Pedrinhas	-1.663	0.0963
Campista vs Ilha do Francês	3.102	<b>0.0019*</b>
Pedrinhas vs Ilha do Francês	3.102	<b>0.0019*</b>

\* Significativo a 5%.



**Figura 14:** Média e erro da média das % DNA na cauda dos cometas em hemócitos de mexilhões *P. perna* coletados na cidade de Macaé e regiões próximas em dois períodos do ano (n=10 para cada coluna). Diferenças significativas (\* p<0,05; \*\* p < 0,005; \*\*\* p < 0,0005) respeito da Ilha do Francês.

#### ***Dano genotóxico avaliado em número de micronúcleos/1000***

Não foram encontradas diferenças significativas nos valores da frequência de MN entre as duas temporadas de coleta para cada sítio amostral ( $p < 0,05$ ; Tabela 16). O estuário do Rio Macaé apresentou as frequências mais altas (Fig. 15), com uma frequência média de  $1.5 \pm 0.8$  MN/1000 células analisadas. Este valor diferenciou-se significativamente com o sítio da Ilha do Francês para as duas temporadas e com a Praia Campista na segunda temporada de coleta ( $p < 0,05$ ) (Tabela 17). A frequência de MN obtida nos mexilhões da Praia Campista não se diferenciou com o resto dos sítios analisados. No entanto, houve diferenças significativas para os mexilhões da Praia das

Pedrinhas com respeito ao sitio da Ilha do Francês na segunda temporada de coleta (Tabela 17).

**Tabela 16:** Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando a frequência de MNs das duas temporadas para cada ponto de coleta.

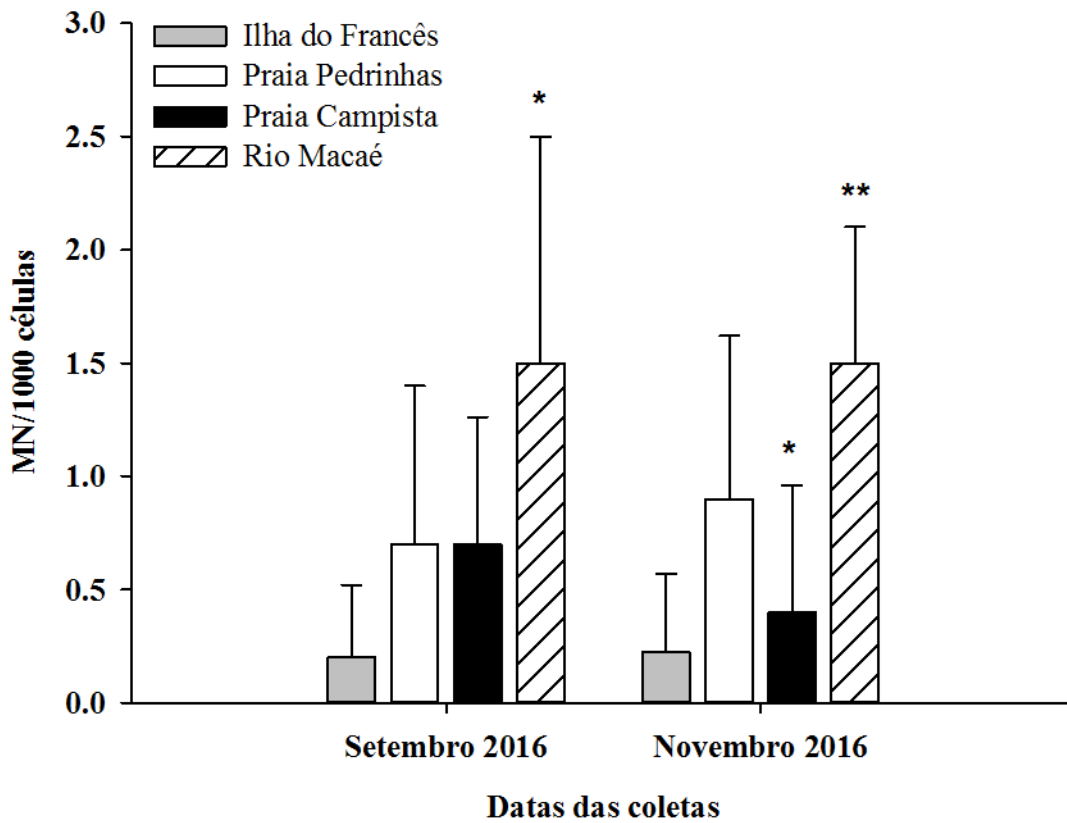
Ponto de coleta	Z ajustado	p valor
Rio Macaé	-0.163	0.879
Praia Campista	-0.081	0.334
Praia das Pedrinhas	-1.020	0.307
Ilha do Francês	-0.650	0.545

\* Significativo a 5%.

**Tabela 17:** Análises estatísticas (Teste U de Man Whitney) comparando a frequência de MN entre os diferentes pontos de coleta para cada temporada.

Setembro 2016	Z ajustado	p
Rio Macaé vs Campista	1.572	0.116
Rio Macaé vs Pedrinhas	1.645	0.093
Rio Macaé vs Ilha do Francês	2.793	<b>0.012*</b>
Campista vs Pedrinhas	0.334	0.732
Campista vs Ilha do Francês	1.842	0.112
Pedrinhas vs Ilha do Francês	1.446	0.226
Novembro 2016	Z ajustado	p
Rio Macaé vs Campista	2.929	<b>0.003*</b>
Rio Macaé vs Pedrinhas	1.494	0.135
Rio Macaé vs Ilha do Francês	3.407	<b>0.001*</b>
Campista vs Pedrinhas	-1.384	0.166
Campista vs Ilha do Francês	0.477	0.633
Pedrinhas vs Ilha do Francês	1.841	<b>0.049*</b>

\* Significativo a 5%



**Figura 15:** Média e erro da média dos MN em 1000 hemócitos de indivíduos de *P. perna* coletados na cidade de Macaé e regiões próximas em dois períodos do ano (setembro e novembro do 2017; n=10 para cada coluna). Diferenças significativas (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ) respeito da Ilha do Francês.



### *Correlação do dano genotóxico com o comprimento, peso e sexo*

Não foi observada correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a % DNA na cauda dos cometas (Tabela 18), assim como o número de MN, com o comprimento, peso e sexo dos organismos coletados do estuário do Rio Macaé em ambas as temporadas.

**Tabela 18:** Correlação de Spearman entre o dano genotóxico e o comprimento e peso médios, e sexo dos organismos coletados do estuário do Rio Macaé nas duas temporadas de coleta. (Sobre a diagonal) para a % DNA na cauda dos cometas; (abaixo da diagonal) para o número de MN/1000. Em negrito as correlações significativas.

Variável	Dano genotóxico	Tamanho	Peso	Sexo
Dano genotóxico	*****	-0.1364	0.0331	-0.0182
Tamanho	-0.0518	*****	<b>-0.5804</b>	-0.0636
Peso	-0.0308	<b>-0.5804</b>	*****	0.0818
Sexo	-0.1764	-0.0636	.0818	*****

## V. DISCUSSÃO GERAL

### 5.1 Bioensaios e sua importância em reconhecer efeitos genotóxicos

As respostas genotóxicas detectadas em organismos de ecossistemas impactados podem ser produzidas pelo efeito simultâneo de mais de um poluente e em concentrações desconhecidas. Este resultado final não necessariamente corresponde à adição dos efeitos de cada poluente, podendo existir propriedades emergentes na combinação dos contaminantes presentes (Martins e Costa, 2015). Desta maneira, resulta difícil calcular quais são os efeitos isolados que cada contaminante produz num ambiente natural impactado. Os bioensaios permitem reconhecer as respostas genotóxicas dos indivíduos submetidos a diferentes compostos químicos, em concentrações estipuladas e em períodos de tempo determinados para cada tipo de ensaio (Zagatto e Bartoletti, 2006). Assim, em condições de laboratório é possível calcular estas respostas como também conhecer características próprias da espécie utilizada no experimento. Dentro destas características poderiam se encontrar os tempos de resposta, sensibilidade e relações fisiológicas dos organismos frente a um contaminante determinado (Bolognesi e Cirillo, 2014).

Os bioensaios descritos no presente trabalho permitiram conhecer algumas características da espécie *P. perna* para o EC e o teste de MNs, os quais apresentaram diferenças nos tempos assim como na magnitude da resposta frente ao composto genotóxico MMS.

Para o EC, os máximos valores de dano genotóxico, medido como % DNA na cauda dos cometas, aconteceram entre o terceiro e o sexto dia para todas as concentrações de MMS utilizadas. Embora estes resultados não permitam generalizar o tempo de resposta para outros tipos de poluentes, esta informação permite ter uma noção do rápido tempo de resposta genotóxica que o mexilhão *P. perna* tem. Estes tempos de resposta, assemelham-se com os resultados de bioensaios realizados com outras espécies de mexilhões. Ching et al. (2001), expondo mexilhões da espécie *Perna viridis* a diferentes concentrações de HPAs, também observaram que os máximos valores de dano genotóxico (formação de adutos de DNA) ocorreram entre o terceiro e sexto dia de exposição ao poluente. Resultados similares

foram obtidos para o mexilhão *Mytilus galloprovincialis* tratados também com HPAs, onde os valores máximos de dano genotóxico encontraram-se entre o segundo e terceiro dias de exposição (Venier e Canova, 1996). Está rápida resposta genotóxica também foi descrita para mexilhões da espécie *Mytilus edulis*. Os mesmos foram expostos a diferentes concentrações de MMS registrando o máximo valor para o segundo dia de exposição no EC (Rank e Jensen, 2003).

Utilizando o teste do MN, os tempos de respostas observados neste estudo são maiores aos obtidos com o EC, observando-se valores significativos somente para os organismos tratados com a máxima concentração de MMS no sexto e décimo segundo dias de exposição. Este maior tempo de resposta também coincide com bioensaios realizados com outras espécies de mexilhões (Bolognesi e Hayashi, 2011). Siu et al. (2004) num bioensaio onde expuseram mexilhões da espécie *Perna viridis* a diferentes concentrações de benzo[a]pireno determinaram um incremento da frequência de MN a partir do terceiro dia exposição, registrando uma máxima frequência de MN no décimo segundo dia de exposição. Por outro lado estudo de Baršienė et al. (2010), mexilhões *Mytilus edulis* expostos a petróleo apresentaram a máxima frequência de MN no oitavo dia de exposição.

As diferenças nos tempos de resposta quando utilizados estes ensaios podem ser explicadas pelo nível em que é realizada a avaliação. Assim como o EC pode detectar os primeiros danos genotóxicos produzidos no DNA (como sítio *álcali-labilis*), o teste do MN detecta lesões mais persistentes no DNA (Bolognesi e Hayashi, 2011). Este tipo de lesões poderiam ser efeitos clastogénicos ou aneugénicos, os quais não podem ser reparados. A relevância biológica que o teste do MN tem, pode considerar-se maior em comparação com o EC. O processo de formação de um MN envolve etapas mais complexas que as simples quebras das fitas do DNA o qual requer de mais tempo para sua visualização (Klobučar et al., 2008). Por outro lado, o ensaio de cometa é considerado mais sensível, devido a sua rápida resposta, a qual permite detectar possíveis casos pontuais de contaminação ambiental. Ainda assim, é necessário conhecer as respostas de cada espécie em particular, quando utilizados estes ensaios de avaliação de genotoxicidade. Embora os resultados obtidos dos bioensaios não possam ser generalizados para ambientes naturais, eles permitem ter uma aproximação do que acontece num cenário natural.

## 5.2 Efeito do tamanho e do gênero na sensibilidade a agentes genotóxicos

Os resultados desta dissertação não demonstraram uma correlação entre a sensibilidade genotóxica e citotóxica do mexilhão *P. perna* com o comprimento, peso e sexo dos organismos analisados. Esta falta de relação foi evidenciada no presente trabalho, tanto nos mexilhões expostos a MMS em condições de laboratório, quanto nos mexilhões cultivados e de ambientes naturais estudados no presente trabalho.

A relação entre a sensibilidade genotóxica e o sexo dos indivíduos não é clara para as diferentes espécies de mexilhões. A ausência desta relação foi descrita para mexilhões *Mytilus edulis* em estudos de biomonitoramento realizados por Baršienė et al. (2004; 2006). Por outro lado, Gagné et al. (2008), acharam uma maior sensibilidade genotóxica em indivíduos machos da mesma espécie. Esta maior sensibilidade genotóxica em comparação com as fêmeas, também foi descrita por Almeida et al. (2011), num biomonitoramento com mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis*.

A falta de relação da sensibilidade genotóxica com o tamanho dos indivíduos também foi registrada para outras espécies de mexilhões. No trabalho de Wilson et al. (1998), os autores expuseram indivíduos da espécie *Mytilus edulis*, a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) durante 14 dias. Nesse trabalho o EC não registrou diferenças entre as faixas de tamanho dos mexilhões. Rank e Jensen (2003) confirmaram esta ausência de relação, através do EC, para a mesma espécie exposta a diferentes concentrações de  $H_2O_2$  e ao MMS. Por outro lado num estudo de biomonitoramento, Ács et al. (2016) evidenciaram uma correlação positiva entre o dano genético e o tamanho da concha em mexilhão da espécie *Dreissena bugensis*, onde os mexilhões de maior tamanho parecem ser mais afetados pelos efeitos ambientais. A falta de relação entre o tamanho e a sensibilidade genotóxica encontrada neste estudo para a espécie *P. perna*, pode ser explicada por ter os mesmos mecanismos de reparo do material genético, já que os indivíduos encontram-se num mesmo nível de desenvolvimento. Os mexilhões utilizados neste estudo, tinham tamanhos entre 40 e 110 mm de comprimento, sendo portanto, todos classificados como adultos. Também, se espera que indivíduos adultos tenham uma mesma habilidade para biotransformar e/ou detoxificar os agentes poluentes.

Diferenças podem ser esperadas entre indivíduos adultos e juvenis (menores a 20 mm) da espécie *P. perna*.

Na maioria dos invertebrados, incluindo os mexilhões, as fases iniciais de vida apresentam uma maior sensibilidade aos diferentes poluentes em comparação com os indivíduos adultos (Hutchinson et al., 1998; Jha et al., 2000; Wedderburn et al., 2000; Cope et al., 2008). As prováveis causas desta diferenciação na sensibilidade podem estar relacionadas com vários fatores, como: a menor relação superfície/volume dos tecidos internos; a menor concentração de gorduras nos tecidos com capacidade de acumular compostos lipofílicos; maior absorção de tóxicos do ambiente; sistemas imunológicos imaturos. Também, nas fases iniciais da vida os sistemas enzimáticos podem não estar sendo expressos completamente, impedindo assim uma eficiente detoxificação e eliminação dos compostos tóxicos (Mohammed, 2013). Estes fatores poderiam determinar uma diferenciação na sensibilidade genotóxica entre juvenis e adultos, mas não entre as diferentes faixas de tamanho para mexilhões adultos da espécie *P. perna*.

### **5.3 Avaliação da qualidade das águas nas fazendas de cultivo através de análise genotóxica**

O monitoramento biológico através de marcadores genotóxicos representa uma valiosa ferramenta para avaliar a saúde ambiental, particularmente naqueles ambientes impactados onde a fonte de poluição não é facilmente reconhecida ou quantificável. Os marcadores genotóxicos permitem quantificar o efeito que produzem os diferentes poluentes no organismo indicador, provendo um índice de exposição e/ou de estresse. Esta quantificação não representa um momento pontual no ambiente, uma vez que é o resultado de um período determinado de exposição (Monserrat et al., 2007).

Este tipo de biomonitoramento pode ser considerado como uma ferramenta adicional para órgãos que desejem fiscalizar o efeito genotóxico de áreas de maricultura, podendo ser estendido para o cultivo de outros bivalves. Os resultados deste estudo demonstraram as vantagens que proporcionam os biomarcadores genotóxicos: ensaios simples, rápidos, sensíveis e de baixo custo, que permitem detectar alterações na

integridade genômica em tecidos e células dos organismos de diferentes ambientes. As três fazendas de malacocultura analisadas neste estudo apresentaram diferentes graus de dano genotóxico, complementando assim as informações de qualidade ambiental já existentes para cada área.

A Baía de Guanabara apresenta elevados índices de contaminação, detectando-se a presença de diversos tipos de poluentes como metais pesados e HPAs. A maioria dos poluentes apresentam uma maior concentração na zona interna da baía, em relação com as zonas próximas da costa oceânica (Lage e Jablonski, 2008; Resende et al., 2016; Soares-Gomes et al., 2016). Os resultados obtidos neste trabalho refletem essa realidade. Tanto com o EC quanto com o teste do MN, os mexilhões cultivados na corda experimental de Niterói foram os que apresentaram os maiores níveis de dano genotóxico, em relação com os mexilhões cultivados nas outras duas fazendas. Este resultado se repetiu para as quatro temporadas de coleta, evidenciando as péssimas condições para o cultivo de mexilhões. As frequências de MNs para as 4 temporadas nesta área superaram as frequências obtidas no estudo de Francioni et al. (2007a) na Baía de Guanabara. Os autores determinaram a frequência de MNs para o mexilhão *P. perna* em 4 pontos da baía obtendo os seguintes valores médios: Ponte Rio-Niterói ( $1.65 \pm 1.03$  MN/1000 células); Marina da Gloria, no Rio de Janeiro ( $1.38 \pm 0.66$  MN/1000 células); Fortaleza de Santa Cruz da Barra em Niterói ( $0.80 \pm 0.20$  MN/1000 células); e Ilha Veados, na região oceânica de Niterói ( $0.50 \pm 0.35$  MN/1000 células).

Embora não existam fazendas de malacocultura nas proximidades da área de estudo, a extração de mexilhões representa uma prática habitual na Baía de Guanabara (Ritter, 2007; Lage e Jablonski, 2008; Silva, 2013), registrando-se coletas em costões rochosos próximos ao local onde a corda experimental foi colocada (Stevenson, 2014). As altas concentrações de metais pesados (Francioni et al., 2004; Ferreira et al., 2013; Amaral et al., 2016), assim como de HPAs (Francioni et al., 2007a e b) registradas em mexilhões *P. perna* na baía geram uma preocupação a respeito da qualidade sanitária dos mexilhões que estão sendo comercializados, evidenciando a necessidade de uma melhor gestão desta atividade.

Os valores de dano genético dos mexilhões cultivados nas fazendas de Búzios e Arraial do Cabo foram significativamente menores em comparação com os valores obtidos nos mexilhões das cordas de Niterói. Embora estes baixos valores poderiam relacionar-se com o baixo impacto antrópico que as fazendas experimentam, existem diferentes fontes de contaminação que poderiam afetar a qualidade ambiental das águas onde esses mexilhões são cultivados. Os coliformes detectados por Soares et al. (2016) nas águas da fazenda de Búzios representam uma grande preocupação, fundamentalmente no verão quando a população da região aumenta por causa do turismo elevando, assim, lançamento de esgoto doméstico. Tanto para o EC como para o teste do MN aplicado na fazenda de Búzios, não foi registrado um aumento do dano genotóxico no verão em comparação com as outras temporadas de coleta, indicando aparentemente uma boa qualidade do ambiente.

Os mexilhões cultivados na fazenda de Arraial do Cabo também não apresentaram variação sazonal nos seus biomarcadores genotóxicos. O grande número das embarcações que transitam em Arraial do Cabo, poderia ser considerado como potencial fonte de contaminação (Toste et al., 2011). As tintas anti-incrustantes das embarcações são responsáveis da síndrome de deregulação endócrinas (Thain e Waldock, 1986; Bryan e Gibbs, 1991), assim como também provocar danos genotóxicos em diferentes organismos (Hagger et al., 2005; Micael et al., 2007; Martinez-Paz et al., 2013), incluindo mexilhões (Dixon e Prosser, 1986; Jha et al., 2000; Marcheselli et al., 2011).

#### **5.4 Utilização de ensaios genotóxicos em estudos de biomonitoramento de ambientes naturais**

O biomonitoramento através de biomarcadores genotóxicos com mexilhões pode ser realizado de duas formas diferentes. A primeira, utilizando populações naturais de mexilhões já presentes na área de estudo, e a segunda, utilizando mexilhões transplantados de outra área, geralmente sem poluição (Bolognesi e Fenech, 2012). A utilização de mexilhões transplantados é recomendada, visto que estes são facilmente transportados, sendo colocados numa mesma profundidade que assegure submersão constante na água para diminuir processos de adaptação (Mersch e Beauvais, 1997; Turja et al., 2015; Touahri et al., 2016). Contudo, o biomonitoramento com populações naturais de mexilhões já

instalados na área, também é amplamente aceito e utilizado (Pavlica et al., 2001; Klobučar et al., 2003; Rank e Jensen, 2003; Baršienė et al., 2004, 2006 e 2012).

Os resultados obtidos no biomonitoramento da costa de Macaé e regiões próximas, demonstraram diferenças entre os valores de dano genotóxico com os diferentes biomarcadores para os mexilhões localizados nas diferentes áreas. Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas temporadas de coleta para cada área de estudo. Os parâmetros ambientais também não apresentaram grandes diferenças entre temporadas, embora os índices de precipitações exibiram grandes diferenças. Setembro apresentou uma precipitação total do mês de 50 mm e novembro apresentou uma precipitação total do mês de 247 mm (INMET, 2017).

Os máximos valores de dano genotóxico foram encontrados para o estuário do Rio Macaé através de ambos biomarcadores. Os valores obtidos pelo EC assim como pelo teste do MN foram similares aos registrados nos mexilhões cultivados na corda experimental de Niterói. Estes resultados evidenciam a baixa qualidade ambiental das águas do estuário do Rio Macaé, já descrita no trabalho Santiago et al. (2016), quem detectaram concentrações de HPAs e metais pesados em *P. perna*, tão elevadas como as máximas registradas na Baía de Guanabara por Francioni et al. (2007b) e Yoshimine et al. (2012).

Os valores de dano genotóxico obtidos pelo EC para os mexilhões da Praia Campista e da Praia das Pedrinhas não se diferenciaram significativamente. No entanto, ambos os pontos diferenciaram-se dos valores obtidos para o Arquipélago de Santana, sendo diferenças muito maiores ainda com os danos observados nos mexilhões provenientes do estuário do Rio Macaé. As concentrações de HPAs e metais pesados registradas para o estuário do Rio Macaé ( $\Sigma\text{HPA}$ : 2876–6101  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) são maiores às registradas no Arquipélago do Santana ( $\Sigma\text{HPA}$ : 105–317  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Santiago et al., 2016), o que pode explicar em parte os maiores danos genotóxicos observados nos mexilhões do estuário.

Os danos genotóxicos registrados para os mexilhões através do teste do MN mostraram apenas as diferenças entre o estuário do Rio Macaé e o Arquipélago de Santana na primeira e segunda temporada, mas não entre os outros pontos de monitoramento. Na segunda temporada, somente diferenciaram-se os mexilhões da Praia Campista com o



estuário do Rio Macaé e a Praia Pedrinhas com o Arquipélago de Santana. As diferenças detectadas por ambos biomarcadores podem se dever aos diferentes tempos de avaliação que cada teste tem, onde o EC detecta variações da qualidade ambiental num tempo menor que o teste do MN. Os valores médios detectados pelo teste do MN nestas praias se assemelham aos valores ( $0.8 \pm 0.92$  MN/1000 células) obtidos por Gonçalves (2003) utilizando mexilhões *P. perna* cultivados numa fazenda de malacocultura em Santa Catarina sem fontes de poluição. Embora os biomarcadores registraram baixos níveis de dano genotóxico nestas duas praias, as diferenças com os níveis genotóxicos detectados no Arquipélago do Santana (principalmente através do EC) evidenciam a presença de compostos genotóxicos no ambiente. No caso da Praia Campista estes compostos poderiam ser consequência das atividades do Porto de Imbetiba e o constante tráfego de barcos relacionados com a extração de petróleo na área. Os efeitos genotóxicos que estas atividades produzem nos organismos aquáticos foram demonstrados em outros estudos (Marvin et al., 1994; Francioni et al., 2007a; Baršienė et al., 2010). Para a Praia das Pedrinhas os compostos genotóxicos poderiam vir de efluentes domésticos (Galindo et al., 2012) da Lagoa de Imboassica, tanto pelo canal extravasor da lagoa, como em períodos de abertura da barra encaminhando a água da lagoa para o mar (Branco et al., 1998).

O Arquipélago do Santana apresentou baixos valores para ambos biomarcadores e para as duas temporadas de coleta, em comparação com o resto das áreas de estudo. Embora nas proximidades das ilhas aconteça um intenso transporte marítimo relacionado com as atividades petroleiras, estas atividades não representaram uma fonte considerável de compostos genotóxicos. Santiago et al. (2016) detectaram baixas concentrações de HPAs assim como de metais pesados em mexilhões do Arquipélago, indicando necessidade de precauções a futuras nesta área.

## VI. CONCLUSÕES

O nível de dano genotóxico detectado em mexilhões da espécie *P. perna* através do EC apresentou seu máximo valor ( $21.5 \pm 11.6$  %) no terceiro dia de exposição ao MMS, entanto que no teste do MN os maiores valores foram a partir do sexto dia de exposição registrando-se o máximo valor no dia 12 de exposição ( $2,5 \pm 0,5$  MN/1000 células). Estes resultados evidenciam os diferentes tempos de avaliação que cada teste tem. Por outro lado, os organismos utilizados neste estudo não apresentaram correlações entre o EC e teste do MN com o comprimento, peso e sexo. Este resultado poderia indicar a pouca influência que estas características têm em estudos de genotoxicidade para organismos adultos desta espécie em particular.

O biomonitoramento em fazendas de malacocultura demonstrou altos valores médios de dano genotóxico em mexilhões cultivados em Niterói, tanto para o EC ( $5.59 \pm 2.44$  %) assim como para o teste do MN ( $1.73 \pm 0.13$  MN/1000 células) em comparação com as fazendas de cultivo de Búzios ( $0.34 \pm 0.34$  %;  $0.30 \pm 0.43$  MN/1000 células) e Arraial do Cabo ( $0.55 \pm 0.33$  %;  $0.36 \pm 0.54$  MN/1000 células). Estes resultados indicam a presença dos compostos genotóxicos nas águas de Niterói e seu efeito nocivo sobre o material genético dos mexilhões.

O biomonitoramento realizado na cidade de Macaé e regiões próximas, evidenciou as desfavoráveis condições do estuário do Rio Macaé. Os biomarcadores neste ponto apresentaram valores similares aos detectados nos mexilhões de Niterói ( $5.23 \pm 1.86$  %;  $1.50 \pm 0.80$  MN/1000 células). As praias Campista e Pedrinhas apresentaram valores baixos e intermédios ( $1.17 \pm 0.87$  %;  $0.55 \pm 0.61$  MN/1000 células e  $1.44 \pm 1.15$  %;  $0.80 \pm 0.72$  MN/1000 células, respectivamente) gerando uma preocupação na qualidade futura destas áreas. Por outro lado, os valores dos biomarcadores obtidos na Ilha do francês foram baixos ( $0.23 \pm 0.19$  %;  $0.21 \pm 0.33$  MN/1000 células), indicando a baixa presença de compostos genotóxicos nas suas águas.

## VII. REFERÊNCIAS

Aardema, M.J. & MacGregor, J.T. 2002. Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “-omics” technologies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 499(1): 13-25.

Ács, A.; Vehovszky, Á.; Győri, J. & Farkas, A. 2016. Seasonal and size-related variation of subcellular biomarkers in quagga mussels (*Dreissena bugensis*) inhabiting sites affected by moderate contamination with complex mixtures of pollutants. *Environmental monitoring and assessment*, 188(7): 1-14.

Almeida, C.; Pereira, C.; Gomes, T.; Bebianno, M.J. & Cravo, A. 2011. DNA damage as a biomarker of genotoxic contamination in *Mytilus galloprovincialis* from the south coast of Portugal. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(9): 2559-2567.

Al-Subiai, S.N.; Moody, A.J.; Mustafa, S.A. & Jha, A.N. 2011. A multiple biomarker approach to investigate the effects of copper on the marine bivalve mollusca *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(7): 1913-1920.

Amaral K.H.; Costa, M. & Olaf, M.A.L.M. 2016. Estudo da contaminação por metais pesados em peixes e mexilhão da Baía de Guanabara-Rio de Janeiro. *Tropical Oceanography*, 35(1-2).

Barbosa, K.B.F.; Costa, N.M.B.; Alfenas, R.D.C.G.; De Paula, S.O.; Minim, V.P.R. & Bressan, J. 2010. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, 23(4): 629-643.

Baršienė, J.; Lazutka, J.; Šyvokienė, J.; Dedonytė, V.; Rybakovas, A.; Bagdonas, E & Andersen, O.K. 2004. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. *Environmental Toxicology*, 19(4): 365-371.

Baršienė, J.; Dedonytė, V.; Rybakovas, A.; Andreikėnaitė, L. & Andersen, O.K. 2006. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*, 78: 99-104.

Baršienė, J.; Andreikėnaitė, L. & Bjornstad, A. 2010. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels Mytilus edulis after 1-, 2-, 4-and 8-day treatment with crude oil from the North Sea. *Ekologija*, 56: 124-131.

Baršienė, J.; Rybakovas, A.; Garnaga, G. & Andreikėnaitė, L. 2012. Environmental genotoxicity and cytotoxicity studies in mussels before and after an oil spill at the marine oil terminal in the Baltic Sea. *Environmental monitoring and assessment*, 184(4): 2067-2078.

Begon, Michael, Colin R. Townsend, and John L. Harper. *Ecologia: de indivíduos a ecossistemas*. Artmed Editora, 2009.

Belabed, B.E.; Laffray, X.; Dhib, A.; Fertouna-Belakhal, M.; Turki, S. & Aleya, L. 2013. Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel Perna perna in the Gulf of Annaba (Algeria). *Marine pollution bulletin*, 74(1): 477-489.

Berenger, J.N. 2013. Avaliação do Grau de Contaminação por Derivados de Petróleo no Estuário do Rio Macaé. Dissertação do mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Bird, A.P. & Wolffe, A.P. 1999. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell*, 99(5): 451-454.

Bodnar, A.G. 2009. Marine invertebrates as models for aging research. *Experimental gerontology*, 44(8): 477-484.

Bolognesi, C. & Cirillo, S. 2014. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Current Zoology*, 60(2): 273-284.

Bolognesi, C. & Fenech, M. 2012. Mussel micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 7(6): 1125-1137.

Bolognesi, C. & Hayashi, M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1): 205-213.

Branco, C.W.C.; Attayde, J.L. & Kozłowski-Suzuki, B. 1998. Zooplankton community of a coastal lagoon subjected to anthropogenic influences (Lagoa Imboacica, Macae, RJ

Brazil). Verhandlungen-Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie, 26: 1426-1429.

Bruner, K.A.; Fisher, S.W. & Landrum, P.F. 1994. The role of the zebra mussel, Dreissena polymorpha, in contaminant cycling: I. The effect of body size and lipid content on the bioconcentration of PCBs and PAHs. Journal of Great Lakes Research, 20(4): 725-734.

Bryan, G.W. & Gibbs, P.E. 1991. Impact of low concentrations of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. Metal ecotoxicology: concepts and applications: 323-361.

Bulhões, E.M.; Fernandez, G.B. & da Rocha, T.B. 2011. Efeitos morfológicos nas barreiras costeiras do litoral centro-norte do estado do Rio de Janeiro: resultados do evento de tempestade de abril de 2010. Revista de Geografia (Recife), 27(2): 16-30.

Canty, M.N.; Hutchinson, T.H.; Brown, R.J.; Jones, M.B. & Jha, A.N. 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: differential sensitivity of echinoderms (Asterias rubens) and marine molluscs (Mytilus edulis). Aquatic Toxicology, 94(1): 68-76.

Carvalho, C.E.V.; Cavalcante, M.P.O.; Gomes, M.P.; Faria, V.V. & Rezende, C.E. 2001. Distribuição de metais pesados em mexilhões (Perna perna, L.) da Ilha de Santana, Macaé, SE, Brasil. Ecotoxicology and environmental Restoration, 4(1): 1-5.

Carvalho Pinto-Silva, C.C.; Ferreira, J.F.; Costa, R.H.R.; Belli Filho, P.; Creppy, E.E. & Matias, W.G. 2003. Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. Toxicon, 41(1): 93-97.

Carvalho Pinto-Silva, C.C.; Creppy, E.E. & Matias, W.G. 2005. Micronucleus test in mussels Perna perna fed with the toxic dinoflagellate Prorocentrum lima. Archives of toxicology, 79(7): 422-426.

Ching, E.W.K.; Siu, W.H.L.; Lam, P.K.S.; Xu, L.; Zhang, Y. & Richardson, B.J. 2001. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (Perna viridis) exposed to benzo[a]pyrene: dose and time dependent relationships. Marine Pollution Bulletin, 42:603-10.

Conceição, M.B.; Wilhelm-Filho, D.; Pessatti, M.L. & Fontana, J.D. 2008. Biomarcadores de Poluição. Em: Resgalla Jr.; Weber, L.I. & Conceição, M.B. O Mexilhão Perna perna: Biologia, Ecologia e Aplicações. Rio de Janeiro: Edição Interciência, 324p.

Cope, W.G.; Bringolf, R.B.; Buchwalter, D.B.; Newton, T.J.; Ingersoll, C.G., Wang, N. & Hammer, E. 2008. Differential exposure, duration, and sensitivity of unionoidean bivalve life stages to environmental contaminants. *Journal of the North American Benthological Society*, 27(2): 451-462.

Correal, G. 2011. Impacto de um efluente doméstico sobre a comunidade de peixes recifais e macrobentos da praia do pontal, arraial do cabo, RJ. Dissertação de doutorado. Universidade Federal Fluminense.

Cortez, F.S.; Pereira, C.D.S.; Santos, A.R.; Cesar, A.; Choueri, R.B.; de Assis Martini, G. & Bohrer-Morel, M.B. 2012. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel Perna perna (Linnaeus, 1758). *Environmental pollution*, 168: 145-150.

Costa, C.R.; Olivi, P.; Botta, C.M. & Espindola, E.L. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7): 1820-1830.

Costa, R.N. Ecotoxicologia como ferramenta para análise da qualidade ambiental do estuário do Rio Macaé (Macaé-RJ). 2010. Dissertação de Mestrado, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.

Dixon, D. & Prosser, H. 1986. An investigation of the genotoxic effects of an organotin antifouling compound (bis (tributyltin) oxide) on the chromosomes of the edible mussel, Mytilus edulis. *Aquatic toxicology*, 8(3): 185-195.

Ericson, G. & Larsson, Å. 2000. DNA adducts in perch (Perca fluviatilis) living in coastal water polluted with bleached pulp mill effluents. *Ecotoxicology and environmental safety*, 46(2): 167-173.

Erlandsson, J. & McQuaid, C.D. 2004. Spatial structure of recruitment in the mussel Perna perna at local scales: effects of adults, algae and recruit size. *Marine ecology. Progress series* 267: 173-185.

Esteves, F.A. 1998. Ecologia das lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ). Rio de Janeiro, NUPEM-UFRJ.

Esteves, F.A.; Lemes, R.M.; Molisani, M.M.; Petry, A.C.; Costa, R.N.; Menezes, J.S; Di Dario, F.; Figueiredo de Barros, M.P.; Mincarone, M.M.; Gonçalves, P.R. & Nunes, R.F. 2015. Carta das Águas de Macaé. Cadernos NUPEM N° 6, 38p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2012. The state of World fisheries and aquaculture 2012. Disponível em: [www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf](http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf). Acessado em: 10 Janeiro, 2016.

Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1): 81-95.

Ferreira, J.F & Magalhães, A.R.M. 2004. Cultivo de mexilhões. In *Aqüicultura - experiências brasileiras* (C.R Poli, A.T.B. Poli, E. Andreatta, & E. Beltrame, eds.). Multitarefa, Florianópolis, 456p.

Ferreira, M.D.S.; Mársico, E.T.; Conte Junior, C.A.; Marques Júnior, A.N.; Mano, S.B. & Clemente, S.C.D.S. 2013. Trace metal contamination in mussel *Perna perna* from Brazilian coast. *Ciência Rural*, 43(6): 1012-1020.

FIPERJ (Fundação Instituto de Pesca do Estado Rio de Janeiro). 2015. Relatório Técnico, 182p. Disponível em: [http://www.fiperj.rj.gov.br/fiperj\\_imagens/arquivos/revistarelatorios2015.pdf](http://www.fiperj.rj.gov.br/fiperj_imagens/arquivos/revistarelatorios2015.pdf). Acessado em Novembro 2016.

Francioni, E.; Wagener, A.D.L.R.; Calixto, R.D.C. & Bastos, G.C. 2004. Evaluation of *Perna perna* (Linné, 1758) as a tool to monitoring trace metals contamination in estuarine and coastal waters of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(1): 103-110.

Francioni, E.; de LR Wagener, A.; Scofield, A.D.L.; Depledge, M.H.; Cavalier, B.; Sette, C.B. & Mariath, R. 2007a. Polycyclic aromatic hydrocarbon in inter-tidal mussel *Perna perna*: space–time observations, source investigation and genotoxicity. *Science of the total environment*, 372(2): 515-531.

- Francioni, E.; de LR Wagener, A.; Scofield, A.D.L.; Depledge, M.H. & Cavalier, B. 2007b. Evaluation of the mussel Perna perna as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. *Marine pollution bulletin*, 54(3): 329-338.
- Freitas, M. 1997. Incrustações Biológicas no Mexilhão Perna perna (Mollusca, Bivalvia), Cultivado na Ilha de Ratoles, SC: Efeito da Exposição ao Ar. Dissertação do Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Frenzilli, G.; Nigro, M. & Lyons, B.P. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1): 80-92.
- Fu, D.; Calvo, J.A. & Samson, L.D. 2012. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer*, 12(2): 104-120.
- Gagné, F.; Burgeot, T.; Hellou, J.; St-Jean, S.; Farcy, É. & Blaise, C. 2008. Spatial variations in biomarkers of Mytilus edulis mussels at four polluted regions spanning the Northern Hemisphere. *Environmental research*, 107(2): 201-217.
- Galindo, T.; da Silva, E. & Rosário, I. 2012. Indução de micronúcleos e toxicidade por efluente doméstico em duas populações de Bathygobius soporator (Valenciennes, 1837)(Teleostei, Gobiidae) no Litoral de Salvador (BA), Brasil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 16(1): 1-7.
- Galvao, P.; Henkelmann, B.; Longo, R.; Dorneles, P.R.; Torres, J.P.M.; Malm, O. & Schramm, K.W. 2014. Partition of organochlorine concentrations among suspended solids, sediments and brown mussel Perna perna, in tropical bays. *Chemosphere*, 114: 9-15.
- Galvao, P.; Henkelmann, B.; Longo, R.; Torres, J.P.M.; Malm, O. & Schramm, K.W. 2015. The brown mussel Perna perna (L., 1758) as a sentinel species for chlorinated pesticide and dioxin-like compounds. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(17): 13522-13533.
- Glei, M.; Schneider, T., & Schlörmann, W. 2016. Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Archives of toxicology*, 90(10): 2315-2336.



Godiva, D.; Evangelista, H.; Kampel, M.; Licinio, M.V. & Munita, C. 2010. Combined use of aerogammaspectrometry and geochemistry to access sediment sources in a shallow coral site at Armação dos Búzios, Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 87(4): 526-534.

Goldberg, E.D. 1978. The mussel watch. *Environmental conservation*, 5(2): 101-125.

Gonçalves, L.M. 2003. Teste do micronúcleo e ensaio do cometa (comet assay) com mexilhões Perna perna como alternativa para o biomonitoramento dos ecossistemas costeiros de Santa Catarina, Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

Gorbi, S.; Lamberti, C.V.; Notti, A.; Benedetti, M.; Fattorini, D.; Moltedo, G. & Regoli, F. 2008. An ecotoxicological protocol with caged mussels, Mytilus galloprovincialis, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. *Marine Environmental Research*, 65(1): 34-49.

Grisostolo, M.R. 2012. Gestão ambiental portuária no terminal de Imbetiba. Dissertação de doutorado. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.

Guzenski, J. 2014. Avaliação Integrada das Condições Ambientais e do Desempenho Produtivo do Cultivo de Mexilhões e Ostras no Estado de Santa Catarina, Brasil. Dissertação de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

Hagger, J.A.; Depledge, M.H. & Galloway, T.S. 2005. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc Mytilus edulis. *Marine pollution bulletin*, 51(8): 811-816

Heflich, R.H.; Beranek, D.T., Kodell, R.L. & Morris, S.M. 1982. Induction of mutations and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by ethylating agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 106(1): 147-161.

Henriques de Oliveira, C.; Baptista, D.F. & Nessimian, J.L. 2007. Sewage input effects on the macroinvertebrate community associated to Typha domingensis Pers in a coastal lagoon in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 67(1): 73-80.

Hicks, D. W.; Tunnell, J.W., & McMahon, R.F. 2001 Population dynamics of the nonindigenous brown mussel Perna perna in the Gulf of Mexico compared to other world-wide populations. Marine ecology. Progress series 211: 181-192.

Hooftman, R.N. & De Raat, W.K. 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow Umbra pygmaea by ethyl methanesulphonate. Mutation Research Letters, 104(1): 147-152.

Hutchinson, T.H.; Solbe, J. & Kloepper-Sams, P.J. 1998. Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database III—comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. Chemosphere, 36(1): 129-142.

IBGE (Instituto Brasileira de Geografia e Estatística). 2013. Censo Demográfico. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/v3/cidades/home-cidades>. Acessado em Janeiro, 2017.

INMET (Instituto nacional de Meteorologia). 2017. Estimções das precipitações. Disponível em: [http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf). Acessado em Janeiro, 2017.

Izquierdo, J.I.; Machado, G.; Ayllon, F.; d'Amico, V.L.; Bala, L. O., Vallarino, E. & Garcia-Vazquez, E. 2003. Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel Mytilus edulis. Ecotoxicology and Environmental Safety, 55(1): 24-29.

Jha, A.N.; Hagger, J.A.; Hill, S.J. & Depledge, M.H. 2000. Genotoxic, cytotoxic and developmental effects of tributyltin oxide (TBTO): an integrated approach to the evaluation of the relative sensitivities of two marine species. Marine environmental research, 50(1): 565-573.

Jorge, L.C.; Garcia, L.; Martins, V.B.; Kosawa, A. & Pauls, E. 2002. Interações dos processos sócio-ambientais nas bacias das enseadas de Icaraí e São Francisco, Niterói (RJ). 2. Organismos aquáticos como bioindicadores da qualidade ambiental com enfoque no mexilhão Perna perna (Linnaeus, 1798), em Niterói-RJ. Mundo & Vida, 3(2): 108-116.

Kaina, B. 2004. Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. *Cytogenetic and genome research*, 104(1-4): 77-86.

Kang, Y. & Pantel, K. 2013. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer cell*, 23(5): 573-581.

Kasai, H. & Kazuaki, K. 8-hydroxyguanine, an oxidative DNA and RNA modification. 2016. *Modified Nucleic Acids in Biology and Medicine*. Springer International Publishing, 147-185.

Klobučar, G.I.; Pavlica, M.; Erben, R. & Papeš, D. 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel Dreissena polymorpha haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*, 64(1): 15-23.

Klobučar, G.; Štambuk, A.; Hylland, K. & Pavlica, M., 2008. Detection of DNA damage in haemocytes of Mytilus galloprovincialis in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir Bays, Croatia. *Science. Total Environmental*, 405: 330-337.

Kolarević, S.; Kračun-Kolarević, M.; Kostić, J.; Slobodnik, J.; Liška, I.; Gačić, Z. & Vuković-Gačić, B. 2016. Assessment of the genotoxic potential along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater mussels: The Joint Danube Survey 3. *Science of the Total Environment*, 540: 377-385.

Koppe, C. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomicina c and various pesticides. *Mutation Research*, 518: 145-150.

Krishna, G. & Hayashi, M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and interpretation. *Mutation Research*, 455: 155-166.

Lacaze, E.; Geffard, O.; Bony, S. & Devaux, A. 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod Gammarus fossarum by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research*, 700: 32-38.

Lacaze, E.; Geffard, O.; Goyet, D.; Bony, S. & Devaux, A. 2011. Linking genotoxic responses in Gammarus fossarum germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. *Environmental research*, 111(5): 626-634.

Lacerda, L.D.; Molisani, M.M.; Sena, D. & Maia, L.P. 2008. Estimating the importance of natural and anthropogenic sources on N and P emission to estuaries along the Ceará State Coast NE Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 14: 149-164.

Lackinger, D.; Eichhorn, U. & Kaina, B. 2001. Effect of ultraviolet light, methyl methanesulfonate and ionizing radiation on the genotoxic response and apoptosis of mouse fibroblasts lacking c-Fos, p53 or both. *Mutagenesis*, 16(3): 233-241.

Lage, H. & Jablonski, S. 2008. Mussel *Perna perna* extraction and commercialization in Guanabara Bay, Brazil. *Atlântica*, Rio Grande, 30(2): 161-169.

Landis, W.G. & Yu, M.H. 2003. Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems, 3rd edição, Boca Raton, Flórida, 509p.

Laudo Técnico INEA-Prefeitura de Búzios. 2014. Disponível em: <http://www.buzios.rj.gov.br/noticiainp.aspx?id=d8427b6a-f937-49c0-a06e-77d1b1e9cdee>. Acessado em: Março de 2016

Lewis, C. & Galloway, T. 2008. Genotoxic damage in polychaetes: a study of species and cell-type sensitivities. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 654(1): 69-75.

Lee, R.F. & Steinert, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals *Mutation Research*, 544(1): 43-64.

Lobel, P.B.; Bajdik, C.D.; Belkhode, S.P.; Jackson, S.E. & Longerich, H.P. 1991. Improved protocol for collecting mussel watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape, and chronological age. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21(3): 409-414.

Macaé. 2017. Macaé: petróleo e desenvolvimento. Disponível em <http://www.macaee.rj.gov.br/cidade/conteudo/titulo/capital-nacional-do-petroleo>. Acessado em: Janeiro 2017.

Marcheselli, M.; Azzoni, P. & Mauri, M. 2011. Novel antifouling agent-zinc pyrithione: Stress induction and genotoxicity to the marine mussel Mytilus galloprovincialis. *Aquatic Toxicology*, 102(1): 39-47.

Martínez-Paz, P.; Morales, M.; Martínez-Guitarte, J.L. & Morcillo, G. 2013. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect Chironomus riparius evaluated using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 758(1): 41-47.

Martins, M. & Costa, P.M. 2015. The comet assay in environmental risk assessment of marine pollutants: applications, assets and handicaps of surveying genotoxicity in non-model organisms. *Mutagenesis*, 30(1): 89-106.

Marvin, C.M.; MaCARRY, B.E. & Bryant, D.W. 1994. Determination and genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons isolated for Dreissena polymorpha (zebra mussel) sampled from Hamilton Harbour. *J Great Lakes Res*, 20: 523–30

Mendes, C.L.T., Tavares, M. & Soares-Gomes, A. 2007. Taxonomic sufficiency for soft-bottom sublittoral mollusks assemblages in a tropical estuary, Guanabara Bay, Southeast Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 54(4): 377-384.

Mersch, J. & Beauvais, M.N. 1997. The micronucleus assay in the zebra mussel, Dreissena polymorpha, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 393(1): 141-149.

Micael, J.; Reis-Henriques, M.A.; Carvalho, A.P. & Santos, M.M. 2007. Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin, triphenyltin) and a xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebrafish (Danio rerio). *Environment international*, 33(8): 1035-1039.

Mitchelmore, C. & Chipman, J. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399: 135-147.

Mohammed, A. 2013. Why are early life stages of aquatic organisms more sensitive to toxicants than adults? Disponível

em:[https://www.researchgate.net/profile/Azad\\_Mohammed/publication/288520635\\_Why\\_a\\_re\\_Early\\_Life\\_Stages\\_of\\_Aquatic\\_Organisms\\_more\\_Sensitive\\_to\\_Toxicants\\_than\\_Adults/links/5812622808ae29942f3e7e27.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Azad_Mohammed/publication/288520635_Why_a_re_Early_Life_Stages_of_Aquatic_Organisms_more_Sensitive_to_Toxicants_than_Adults/links/5812622808ae29942f3e7e27.pdf). Acessado dezembro do 2016.

Molisani, M.M. 2012. Indução da percepção sobre os bens e serviços de um ecossistema (Rio Macaé, Macaé, RJ) em alunos do ensino fundamental sob o enfoque da ecologia perceptual. REMEA-Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental, 22.

Molisani, M.M.; Esteves, F.A.; Lacerda, L.D. & Rezende, C.E. 2013. Emissões naturais e antrópicas de nitrogênio, fósforo e metais para a bacia do Rio Macaé (Macaé, RJ, Brasil) sob influência das atividades de exploração de petróleo e gás na Bacia de Campos. Química Nova, 36: 27-33.

Monserrat, J.M.; Martínez, P.E.; Geracitano, L.A.; Lund Amado, L.; Martinez, G; Martins, C.; Lopes Leães Pinho, G. & Bianchini, A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 146(1): 221-234.

MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura. 2013. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2209-mais-areas-para-cultivar-ostras-e-mexilhoes-em-santa-catarina>. Acessado em: Março de 2015.

Nafisi, S.; Saboury, A.A.; Keramat, N.; Neault, J.F. & Tajmir-Riahi, H.A. 2007. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. Journal of Molecular Structure, 827(1-3):35-43

Newman, M. & Clements, W. 2008. Ecotoxicology: a comprehensive treatment. CRC Press. 852 p.

Nogueira, L.; Garcia, D.; Trevisan, R.; Sanches, A.L.M.; da Silva Acosta, D.; Dafre, A.L. & de Almeida, E.A. 2015. Biochemical responses in mussels Perna perna exposed to diesel B5. Chemosphere, 134: 210-216.

Oehlmann, J. & Schulte-Oehlmann, U. 2003. Endocrine disruption in invertebrates. Pure and Applied Chemistry, 75(11-12): 2207-2218.

- Ostling, O. & Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical Biophysics Research*, 123: 291-298.
- Pavlica, M.; Klobucar, G.I.V.; Mojas, N.; Erben, R. & Papes, D. 2001. Detection of DNA damage in hemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutation Research*, 490: 209-214.
- Pereira, E.; Baptista-Neto, J.A.; Smith, B.J. & Mcallister, J.J. 2007. The contribution of heavy metal pollution derived from highway runoff to Guanabara Bay sediments: Rio de Janeiro/Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79(4): 739-750.
- Powell, E.N.; Kim, Y. & Bushek, D. 2015. Temporal Structure and Trends of Parasites and Pathologies in US Oysters and Mussels: 16 Years of Mussel Watch. *Journal of Shellfish Research*, 34(3): 967-993.
- Rank, J. & Jensen, K. 2003. Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel Mytilus edulis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54(3): 323-329.
- Resende, F.A.; Tomazella, I.M.; Barbosa, L.C.; Ponce, M.; Furtado, R.A.; Pereira, A.C. & Tavares, D.C. 2010. Effect of the dibenzylbutyrolactone lignan (-)-hinokinin on doxorubicin and methyl methanesulfonate clastogenicity in V79 Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 700(1): 62-66.
- Resende, L.L.; de Almeida Pedrete, T.; Nudi, A.H. & Wagener, A.D.L.R. 2016. Nível de contaminação por hidrocarbonetos na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro-RJ. *Revista Brasileira de Iniciação Científica*, 4(1): 90-117.
- Resgalla Jr, C.; Weber, L.I. & Conceição, M.B. 2008. O Mexilhão Perna perna: Biologia, Ecologia e Aplicações. Rio de Janeiro: Edição Interciência, 324p.
- Ressiguiet, J.H.B. 2011. Atividade Petrolífera e Impactos no Espaço Urbano do Município de Macaé/RJ–1970/2010. Dissertação do mestrado, Universidade Cândido Mendes-Campos/RJ.

Rio de Janeiro. Conselho Estadual de Recursos Hídricos (CERHI) Resolução nº 18, de 08 de novembro de 2006. Aprova a definição das Regiões Hidrográficas do Estado do Rio de Janeiro.

Rios, E.C. 1994 Seashells of Brazil. Rio Grande: Edição FURG, 152p

Ritter, P.D. 2007. Da roça ao mar. Estudo de uma comunidade de marisqueiros em Jurujuba, Niterói, RJ. Dissertação de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Rojas, E.; Lopez, M.C. & Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography*, 722: 225-254.

Roos, W. P. & Krumm, A. 2016. The multifaceted influence of histone deacetylases on DNA damage signalling and DNA repair. *Nucleic Acids Research*, 44(21): 10017-10030.

Sáenz, L.A.; Seibert, E.L.; Zanette, J.; Fiedler, H.D.; Curtius, A.J.; Ferreira, J.F. & Bainy, A.C.D. 2010. Biochemical biomarkers and metals in Perna perna mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(5): 796-804.

Sanchez-Galán, S.; Linde, A.R.; Izquierdo, J.I. & García-Vazquez, E. 1998. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (Salmo trutta): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutation Research*, 412: 219-225.

Santiago, I.U. 2014. Avaliação da Ocorrência de Hidrocarbonetos e Metais Pesados em Mexilhões (Perna perna, linnaeus 1758) na Região Litoral de Macaé. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Santiago, I.U.; Molisani, M.M.; Nudi, A.H.; Scofield, A.L.; Wagener, A. & Limaverde Filho, A.M. 2016. Hydrocarbons and trace metals in mussels in the Macaé coast: Preliminary assessment for a coastal zone under influence of offshore oil field exploration in southeastern Brazil. *Marine pollution bulletin*, (103): 349–353.

Schmid, W. 1975. The micronucleus tests. *Mutation Research*, 31: 9-15.

Silva, C.R.; Ferreira, J.F.; Costa, R.H.R.; Belli Filho, P.; Creppy, E.E. & Matias, W.G. 2003. Micronucleus induction in mussels exposed to okadic acid. *Toxicon*, 41:93-97.



Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. & Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.

Siu, W.H.L.; Cao, J.; Jack, R.W.; Wu, R.S.S.; Richardson, B.J.; Xu, L. & Lam, P.K.S. 2004. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B [a] P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology*, 66(4): 381-392.

Silva, P.A. 2013. O mar é masculino? O trabalho das mulheres na maricultura, Ponta da Ilha/Jurujuba, Niterói/RJ. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Soares, A.M.; Zanette, G.B.; Batista, S.G.; Oliveira, V.P.S.; Saraiva, V.B.; Marcussi, A.P.S. & Oliveira, M.M. 2016. Avaliação bacteriológica da água associada ao cultivo de mexilhões *Perna perna* da Praia Rasa, Armação dos Búzios (RJ), *Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamago*, 9(2): 45-58.

Soares-Gomes, A.; da Gama, B.A.P.; Neto, J.B.; Freire, D.G.; Cordeiro, R.C.; Machado, W. & Pereira, R.C. 2016. An environmental overview of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. *Regional Studies in Marine Science*, 8: 319-330.

Souza, R.C.C.L.; Fernandes, F.C. & Silva, E.P. 2004. Distribuição atual do mexilhão *Perna perna* no mundo: um caso recente de bioinvasão. *Água de lastro e bioinvasão*. Interciência, Rio de Janeiro: 157-172.

Štambuk, B.U.; Eleutherio, E.C.; Florez-Pardo, L.M.; Souto-Maior, A.M. & Bon, E.P. 2008. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67(11): 918.

Stefanoni, M.F. & Abessa, D.M.D.S. 2011. Physiological responses of the brown mussel *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia) exposed to the anionic surfactant linear alkylbenzene sulphionate (LAS). *Holos Environment*: 31-43.

Stevenson, I.A. 2014. GT 81 “Antropologia das populações costeiras; Práticas Sociais e Conflitos”. Trabalho apresentado na 29ª Reunião Brasileira de Antropologia, Natal/RN: 1-18.

- Thain, J.E. & Waldock, M.J. 1986. The impact of tributyl tin (TBT) antifouling paints on molluscan fisheries. *Water Science and Technology*, 18(4-5): 193-202.
- Toste, R.; Fernandez, M.A., Pessoa, I.D.A.; Parahyba, M.A. & Dore, M.P. 2011. Organotin pollution at Arraial do Cabo, Rio de Janeiro State, Brazil: increasing levels after the TBT ban. *Brazilian Journal of Oceanography*, 59(1): 111-117.
- Touahri, H.G.; Boutiba, Z.; Benguedda, W. & Shaposhnikov, S. 2016. Active biomonitoring of mussels *Mytilus galloprovincialis* with integrated use of micronucleus assay and physiological indices to assess harbor pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1): 52-64.
- Turja, R.; Höher, N.; Snoeijs, P.; Baršienė, J.; Butrimavičienė, L.; Kuznetsova, T. & Lehtonen, K.K. 2014. A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*). *Science of the Total Environment*, 473: 398-409.
- UNEP (United Nations Environmental Program). 2004. Guidance for a Global Monitoring Programme for Persistent Organic Pollutants. Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. Geneva, Switzerland.
- Vakily, Jan M. 1989. The biology and culture of mussels of the genus *Perna*. No. 494. WorldFis.
- Valentin, J.L.; Andre, D.L. & Jacob, S.A. 1987. Hydrobiology in the Cabo Frio (Brazil) upwelling: two-dimensional structure and variability during a wind cycle. *Continental Shelf Research*, 7(1): 77-88.
- Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C.J. & Telser, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1-2): 37-56.
- Van Gestel, C.A.M. & Van Brummelen, T.C. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5(4): 217-225.
- Venier, P. & Canova, S. 1996. Formation of DNA adducts in the gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo [a] pyrene. *Aquatic toxicology*, 34(2): 119-133.

Villac, M.C. & Tenenbaum, D.R. 2010. The phytoplankton of Guanabara Bay, Brazil: I. historical account of its biodiversity. *Biota Neotropica*, 10(2): 271-293.

Weber, L.I.; Carvalho, L.; de Sá, N.; Silva, V.; Beraldine, N.; Souza, V. & Conceição, M.B. 2013. Genotoxic effects of the water-soluble fraction of heavy oil in the brackish/freshwater amphipod Quadrivisio aff. lutzi (Gammaridea) as assessed using the comet assay. *Ecotoxicology (London)*, 22: 642-655.

Wedderburn, J.; McFadzen, I.; Sanger, R.C.; Beesley, A.; Heath, C.; Hornsby, M. & Lowe, D. 2000. The field application of cellular and physiological biomarkers, in the mussel Mytilus edulis, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology. *Marine Pollution Bulletin*, 40(3): 257-267.

Wilson, J.T.; Pascoe, P.L. & Dixon, D.R. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, Mytilus edulis L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Research*, 399: 87-95.

Yoshimine, R.V.; Carreira, R.S.; Scofield, A.L. & Wagener, A.L. 2012. Regional assessment of PAHs contamination in SE Brazil using brown mussels (Perna perna Linnaeus 1758). *Marine pollution bulletin*, 64(11): 2581-2587.

Zagatto, P.A. & Bertoletti, E. 2006. *Ecotoxicologia aquática. Princípios e Aplicações*. Rima, Sao Carlos, Brazil, 464p.

Zilberberg, C.; Sereno, D., Lima; G., Custódio, M. R. & Lôbo-Hajdu, G. 2011. Effect of mussel's gender and size on a stress response biomarker. *Water, Air, & Soil Pollution*, 217(1-4): 317-320.