

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: ÊNFASE EM GESTÃO MARINHA E COSTEIRA

GABRIELA GEREMIA

ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS EM HEMÓCITOS DE MEXILHÕES *Perna perna*(LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) NAS PLATAFORMAS DE PESCA DE TRAMANDAÍ E CIDREIRA, LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

IMBÉ
2015

GABRIELA GEREMIA

ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS EM HEMÓCITOS DE MEXILHÕES *Perna perna*(LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) NAS PLATAFORMAS DE PESCA DE TRAMANDAÍ E CIDREIRA, LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Marinha e Costeira pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Emerson André Casali

Co-orientadora: Profa. Dra. Valesca Veiga Cardoso

**IMBÉ
2015**

CIP - Catalogação na Publicação

Geremia, Gabriela

Análise de micronúcleos em hemócitos de mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) nas plataformas de pesca de Tramandai e Cidreira, litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. / Gabriela Geremia. -- 2015.
40 f.

Orientador: Emerson Andre Casali.
Coorientadora: Valesca Veiga Cardoso Casali.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Gestão Ambiental Marinha e Costeira, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Perna perna. 2. Teste de micronúcleos. 3. Mutagênese. I. Casali, Emerson Andre, orient. II. Casali, Valesca Veiga Cardoso, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GABRIELA GEREMIA

ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS EM HEMÓCITOS DE MEXILHÕES *Perna perna*(LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) NAS PLATAFORMAS DE PESCA DE TRAMANDAÍ E CIDREIRA, LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Marinha e Costeira pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Emerson André Casali

Co-orientadora: Profa. Dra. Valesca Veiga Cardoso

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra Carmem Romero Saavedra
Departamento de Genética
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Tatiana Luft
Departamento de Ciências Morfológicas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ignacio Benites Moreno
Coordenador da atividade
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

IMBÉ

2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Liane Geremia e Waldemar Geremia e a minha irmã Susana, por me dar o apoio necessário para eu seguir meus sonhos e por sempre me dar incentivo nos momentos de dificuldade.

Ao meu namorado Rodrigo, por todo apoio e toda paciência enquanto estava realizando este projeto, bem como me ajudar nas coletas e triagem de materiais.

Aos meus colegas pela amizade e companheirismo durante o curso.

Aos meus amigos e colegas de projeto Renata, Ana, João e Rodrigo pela indispensável ajuda, apoio e companhia na obtenção de meus resultados.

Ao meu orientador Emerson, pelo apoio, atenção, compreensão, amizade e oportunidades geradas durante este trabalho.

A minha orientadora Valesca pelo apoio, compreensão e amizade despendidos durante a execução e escrita deste trabalho.

Aos meus professores que contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico.

À banca examinadora, Profa. Dra. Carmem C. R Saavedra e Profa. Dra. Tatiana Luft, pela disposição em avaliar este trabalho.

À bibliotecária Stella, pelo apoio imprescindível na finalização deste trabalho, e ao Ângelo, pela ajuda e orientação ao longo do curso.

RESUMO

A poluição de ambientes aquáticos marinhos e continentais está aumentando a cada dia devido aos avanços tecnológicos e industriais, além do aumento da população humana. Um grande número de compostos químicos é lançado na forma de efluentes no ambiente aquático sem o devido tratamento. Mexilhões são muito utilizados para avaliar efeitos tóxicos de poluentes no ambiente aquático. A contaminação química do ambiente marinho pode gerar risco a saúde humana e causar danos as espécies presentes no local. O Teste de Micronúcleos é capaz de avaliar a genotoxicidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar as variações de frequência de micronúcleos em hemócitos de mexilhões *Perna perna* coletados nas plataformas de Tramandaí e Cidreira em março de 2014 e março de 2015. Os mexilhões foram medidos, sexados e os hemócitos obtidos como descrito por Silva *et al.* (2001) A frequência micronúcleos foi determinada através da análise de 1000 hemócitos para cada mexilhão, observando a quantidade de micronúcleos, brotamentos e células binucleadas sobre as células normais. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão médio (EPM). Os dados biométricos indicam variações de peso entre os indivíduos coletados nas duas coletas. Também houve variação de medidas de comprimento e largura das conchas entre os indivíduos coletados. As medidas feitas indicam uma diferença estatística significativa na quantidade de alterações nucleares nos hemócitos de mexilhões *P. perna* coletados em nos dois pontos, observando-se um aumento expressivo na quantidade de alterações nucleares em mexilhões em Tramandaí, se comparado a Cidreira. Essa diferença encontrada entre a quantidade de alterações nucleares entre Tramandaí e Cidreira evidencia a presença de substâncias ou condições ambientais com potencial genotóxico capazes de causar dano ao material genético dos indivíduos coletados, podendo indicar uma relação entre o número de alterações nucleares encontradas e o nível de urbanização dos locais amostrados que sofrem com o crescimento populacional descontrolado em alguns meses do ano, além de não ter o tratamento de esgoto necessário. Recomenda-se um biomonitoramento contínuo na região, pois dados envolvendo estes organismos ainda são escassos na área. O teste de micronúcleos usando mexilhões *P. perna*, mostrou-se um teste rápido e prático para o monitoramento da poluição de ambientes aquáticos.

Palavras-Chave: Biomonitoramento, Teste de Micronúcleos, Mutagenicidade.

ABSTRACT

The pollution of marine and freshwater ecosystems is increasing every day due to technological and industrial advances, and increased human population. A large number of chemical compounds are released as waste into the water without proper treatment. Mussels are widely used to assess toxic effects of pollutants in the aquatic environment. Chemical contamination of the marine environment can cause problems for human health and harm species on site. The Micronucleus Test is able to assess the genotoxicity. The objective of this study was to evaluate the micronucleus frequency variations in hemocyte of *Perna perna* mussels collected in Tramandaí and Cidreira platforms in March 2014 and March 2015. The mussels were measured, sexed and hemocytes were obtained as described by Silva *et al.*(2001) The micronucleus frequency was determined by 1000 hemocyte analysis for each mussel, noting the frequency of micronucleus, budding and binucleated cells over normal cells. Results are expressed as mean \pm standard error (SEM). The statistical comparison between groups was performed using the SPSS software, by one-way ANOVA followed by post hoc Duncan with significance $P < 0.05$. Biometric data indicate variations in weight between the individuals collected in two samplings. There was also variation in average length and width of the shells collected from individuals. The analyzes indicate a statistically significant difference in the frequency of nuclear changes in hemocytes of mussels *P. perna* collected in the colon, observing a significant increase in the frequency of nuclear changes in Tramandaí, compared to Cidreira. This difference found between the frequency of nuclear changes between Tramandaí and Cidreira shows the presence of environmental substances or conditions with genotoxic potential capable of causing damage to the genetic material of the collected individuals, which may indicate a relationship between the number of found nuclear changes and the level of urbanization at the sampled locations which suffer from uncontrolled population growth in some months of the year, besides not having the necessary sewage treatment. It is recommended a continuous biomonitoring in the region for data involving these organizations are still scarce in the area. The micronucleus test using mussels *P. perna* proved to be a quick and practical test for monitoring the pollution of aquatic environments.

Keywords: Biomonitoring, micronuclei test, mutagenicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Classificação Taxonômica, segundo Linnaeus (1758). 15
- Figura 2** Distribuição da espécie *Perna Perna* na costa do Brasil mostrando os estados em que a espécie se encontra bem estabelecida.
- Figura 3** Mexilhão *Perna perna*, vista com as valvas abertas..... 17
- Figura 4** Esquema mostrando os tipos de alterações celulares analisadas pelo Teste de Micronúcleos neste trabalho. Fonte: O autor (2015). 18
- Figura 5** Mexilhões *Perna perna* coletados em março de 2015..... 22
- Figura 6** Imagem mostrando a diferença na coloração de machos (esbranquiçados) e fêmeas (alaranjadas)..... 22
- Figura 7** Esquema com alguns critérios para a identificação dos Micronúcleos; (A) MN com menos que 1/3 do tamanho do núcleo e dentro do citoplasma da célula; (b) MN com coloração semelhantes à do núcleo e no mesmo plano de foco; (C) MN separado marginalmente do núcleo. FONTE: O Autor (2015)..... 24
- Mapa 1** Imagem de satélite indicando os pontos de coleta propostos: P1 -Plataforma de Pesca de Tramandaí; P2- Plataforma de Pesca de Cidreira.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Biometria e sexagem realizadas em mexilhões <i>P. perna</i> coletados nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira em março de 2014 e março de 2015.	25
Tabela 2- Tipos de alterações nucleares encontradas em hemócitos de mexilhões <i>P.perna</i> coletados nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira em dois verões.	27
Tabela 3- Tipos de alterações nucleares encontradas em hemócitos de mexilhões <i>P.perna</i> coletados nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira em Março de 2014.	28
Tabela 4- Tipos de alterações nucleares encontradas em hemócitos de mexilhões <i>P.perna</i> coletados nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira em Março de 2015.	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 OBJETIVOS.....	11
1.1.1 Objetivo Geral.....	12
1.1.2 Objetivos Específicos.....	12
1.2 JUSTIFICATIVA.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 GENOTOXICIDADE.....	14
2.2 BIOMONITORAMENTO.....	14
2.3 O MEXILHÃO (<i>Perna perna</i>).....	15
2.4 TESTE DE MICRONUCLEOS.....	17
3 ÁREA DE ESTUDO.....	19
3.1 PONTOS DE COLETA.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 COLETA DE INDIVÍDUOS.....	21
4.2 BIOMETRIA.....	21
4.4 ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS.....	23
4.4.1 Preparo das Lâminas.....	23
4.4.2 Contagem de Micronúcleos.....	23
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 BIOMETRIA E SEXAGEM.....	25
5.2 ALTERAÇÕES CELULARES ENCONTRADAS ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEOS.....	27
5.2.1 Micronúcleos.....	32
5.2.2 Células Binucleadas e Brotamentos.....	33
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A poluição de ambientes aquáticos, tanto marinhos quanto continentais, vem aumentando devido a expansão das atividades humanas. Os oceanos, inúmeras vezes, acabam por se tornar o receptáculo final de diversos poluentes (MORAES, 2011). O Litoral Norte do Rio Grande do Sul é considerado de grande importância, comportando o mais extenso cordão litorâneo do mundo além da região apresentar um vasto complexo de lagoas, e requer um contínuo monitoramento, pois com o aumento abusivo da população durante os meses de verão, o dano causado ao ambiente será, conseqüentemente, maior. O lançamento de resíduos tóxicos em efluentes é uma das principais fontes de poluição da água.

O esgoto proveniente de centros urbanos contém uma grande variedade de substâncias, muitas vezes descartadas sem tratamento algum, que acabam contaminando o ambiente marinho. Junto a isso, efluentes agrícolas e industriais são responsáveis pela introdução de diversos compostos químicos no oceano.

O impacto de poluentes no ambiente aquático pode ser medido baseado na diminuição da diversidade de espécies presentes na área, na redução e expansão de populações do bioma comprometendo a sua homeostase. Quando submetidos a alterações ambientais os organismos alteram suas funções vitais, podendo assim gerar dados sobre a situação do ambiente onde foram coletados. Vários estudos já demonstraram que substâncias químicas tomadas do ambiente por organismos vivos podem se ligar ao DNA, sendo tóxicos ao material genético do indivíduo (DEPLEDGE, 1998).

Essas alterações podem ser usadas como parâmetros biomarcadores indicando o grau de exposição e os efeitos negativos desses agentes em nível celular, molecular e populacional. Monitorar respostas biológicas desses organismos pode indicar o nível de poluição e auxiliar numa maior eficácia na fiscalização dos despejos agrícolas, domésticos e industriais, uma vez que a biodisponibilidade de contaminantes é medida diretamente deste modo.

O local de interesse para esta pesquisa está localizado entre os municípios de Tramandaí e Cidreira, uma área que sofre com um aumento exponencial de sua população nos meses de verão.

Os bivalves da família Mytilidae são animais filtradores de hábito sésstil, amplamente pesquisados e com sua morfologia e fisiologia bem entendidas, considerados bons bioindicadores de poluição aquática, e por isso têm sido muito utilizados como organismos-teste em diversos trabalhos de biomonitoramento (MERSCH *et al.*, 1996).

Moluscos bivalves são amplamente utilizados na avaliação da contaminação de ambientes marinhos, principalmente para medir parâmetros ligados a contaminantes, pois são organismos sésseis, filtradores e de fácil coleta, além de estarem presentes em um mesmo local durante o ano todo e responderem rapidamente a variações de concentração de contaminantes no meio.

Compostos mutagênicos se encontram distribuídos na água, além de no solo e no ar. Eles são transferidos e acumulados através da cadeia trófica, podendo causar danos genéticos em populações expostas a eles (CETESB, 2013). A contagem de micronúcleos é uma forma de analisar os danos clastogênicos, ou seja, aqueles que danificam os cromossomos.

Teste de Micronúcleos tem sido amplamente utilizado em biomonitoramentos da qualidade da água por sua capacidade de avaliar a genotoxicidade e ter a vantagem de ser simples e rápido para detectar danos cromossômicos, além de ter um baixo custo (MINISSI, 1996).

Os micronúcleos são pequenos núcleos adicionais e separados do núcleo principal representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, e podem ser induzidos por agentes capazes de quebrar o DNA ou interferir na formação do fuso (CAMPOS JÚNIOR, 2011). Podem ser fragmentos cromossômicos ou até cromossomos inteiros que foram perdidos durante a divisão celular e que entram no citoplasma da célula assumindo a forma de um micronúcleo na próxima interfase (DIXON; WILSON, 2000).

É um dos parâmetros mais utilizados na bioindicação de substâncias mutagênicas. Segundo Rieger (1968) a formação de micronúcleos é causada por alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de algum fator ambiental.

1.1 OBJETIVOS

Abaixo são apresentados os objetivos geral e específicos para o presente estudo.

1.1.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo geral quantificar as alterações mutagênicas e genotóxicas através da contagem de hemócitos com alterações nucleares em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA) coletados nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira, em duas coletas, realizadas no verão de 2014 e 2015.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a quantidade de hemócitos com alterações nucleares existentes em 1000 células analisadas para cada mexilhão *P. perna* amostrado nas Plataformas de Pesca;
- b) Determinar se há diferença estatística na quantidade de hemócitos com alterações nucleares nas duas coletas (verão de 2014 e verão de 2015);
- c) Determinar se há diferença estatística na quantidade de hemócitos com alterações nucleares entre as Plataformas de Pesca ao longo das duas coletas.

1.2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, um grande número de compostos químicos é lançado na forma de efluente no ambiente aquático. A área de estudo está inserida em um ecossistema único, que faz parte maior cordão litorâneo do mundo e que é parada para descanso e alimentação de vários mamíferos marinhos e aves migratórias, além de ter uma grande variedade de invertebrados presentes no local. O Litoral Norte está em fase de crescente urbanização e atividade populacional, além de expansão devido à grande demanda de pessoas que recebe nos meses de verão, porém estas cidades não têm infraestrutura adequada para suportar tal fluxo de pessoas. Com o aumento da população nesses meses, aumenta também a descarga de efluentes gerada, bem como outros efeitos antrópicos. A contaminação química do ambiente marinho, além de gerar risco a saúde humana, pode causar

danos sérios as espécies presentes no local. As áreas amostradas estão localizadas em áreas centrais em suas respectivas cidades e são muito utilizadas por banhistas durante os meses de verão, bem como por surfistas e pescadores durante o ano todo, assim se faz necessário realizar testes que garantam a qualidade da água no local. Um monitoramento passivo contínuo fazendo uso de organismos biomonitores nesta área é imprescindível para observar e identificar os efeitos da ação antrópica e talvez, com os resultados obtidos, associá-los com as atividades econômicas existentes na região. Os mexilhões, por serem organismos filtradores, sésseis e presentes nos locais amostrados durante todo o ano, são bons bioindicadores, pois acumulam em seus tecidos prováveis contaminantes.

Este estudo se justifica, pois, trabalhos utilizando organismos biomonitores são de extrema relevância para um biomonitoramento passivo da área, pois são capazes de fornecer informações sobre a qualidade do ambiente, bem como monitorar alterações ambientais a longo prazo. Como trabalhos envolvendo esses organismos ainda são escassos ou ausentes nesta região, é de grande importância realizar pesquisas nessa área e gerar dados para monitorar as possíveis mudanças no ambiente através dos organismos bioindicadores como o Mexilhão *Perna perna*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O material descrito nos próximos tópicos apresenta o referencial teórico necessário para entendimento e execução deste trabalho.

2.1 GENOTOXICIDADE

Segundo Kunst (2014) genotoxicidade é a capacidade que certas substâncias têm de causar mudanças no material genético de organismos expostos a elas. Agentes genotóxicos interagem com o DNA do organismo exposto a ele alterando a estrutura ou função. Se essas alterações se fixarem de forma a poderem ser transmitidas, são chamadas de mutações (DAVID, 2007).

Estudos genotóxicos com fins ambientais estudam efeitos de poluentes no DNA de populações naturais de organismos (DEPLEDGE, 1998). A ecotoxicologia genética estuda efeitos por agentes químicos no DNA da biota.

A ecotoxicologia genética estuda efeitos induzidos por agentes químicos no DNA da biota.

2.2 BIOMONITORAMENTO

Organismos aquáticos, dentre eles os biomonitores, são frequentemente expostos a agentes ambientais que podem induzir a modificações químicas no DNA das células. Essas lesões no DNA dos organismos podem ser induzidas por agentes químicos que são provenientes do meio ambiente (COSTA; MENK, 2000).

Rosemberg e Resh¹ (1993) *apud* Carvalho (2003) definem um biomonitoramento como sendo o uso de respostas biológicas para avaliação de alterações ambientais dentro de um programa de controle de qualidade.

As técnicas de biomonitoramento podem ser de dois tipos: biomonitoramento passivo e biomonitoramento ativo. O biomonitoramento passivo se dá com o uso de organismos existentes na área a ser pesquisada, já o biomonitoramento ativo é feito expondo organismos na área a ser avaliada por tempo e condições previamente

¹ROSENBERG, D. M.; V. H. RESH. Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D.M.; Resh, V.H. (Ed.) **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman and Hall, 1993.

definidos. Essas técnicas em sido amplamente utilizadas nas últimas décadas (KLUMPP; DOMINGOS; PIGNATA, 2000)

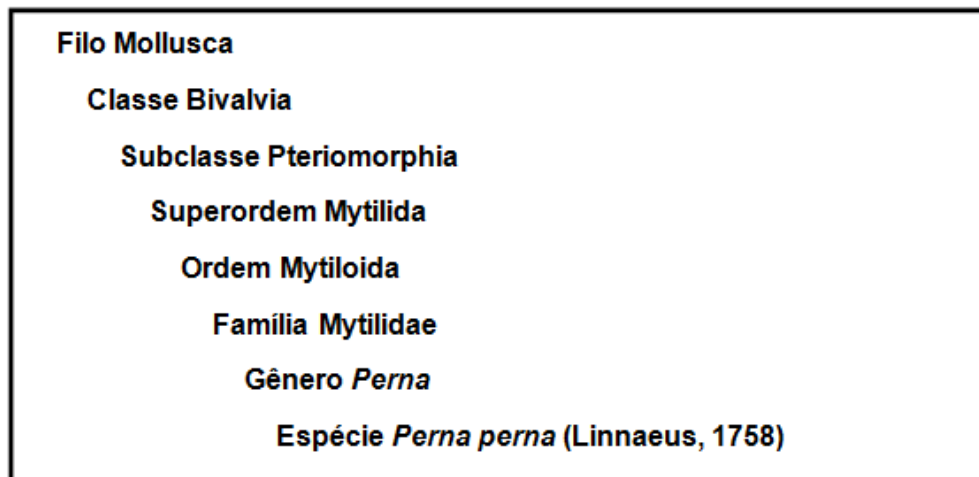
Para o êxito de programas de biomonitoramento, um organismo bioindicador é fundamental (TORRES; NETO, 2007). Moluscos estão entre os melhores organismos bioindicadores de qualidade de água. Eles podem correlacionar um determinado fator, natural ou antrópico, com um potencial impactante.

Segundo Resgalla *et al* (2008) um organismo biomonitor deve apresentar algumas características específicas como: ser de fácil coleta, sedentário, tolerante a variações de salinidade, além de ocorrer ao longo de todo ano. Os mexilhões são amplamente utilizados como organismos biomonitores (BURGEOT *et al*, 1996).

2.3 O MEXILHÃO (*Perna perna*)

O mexilhão *Perna perna*, teve sua classificação taxonômica descrita por Linnaeus (1758)(Figura 1). São moluscos bivalves da Família Mytilidae, pertencentes ao Gênero *Perna*.

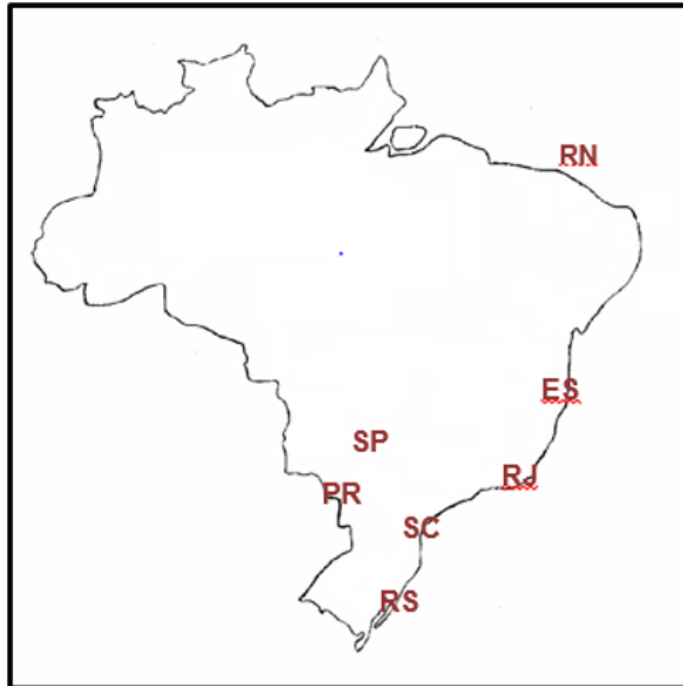
Figura 1 - Classificação Taxonômica, segundo Linnaeus (1758).



Fonte: Autor (2015).

A espécie *P. perna* é cosmopolita tendo sua distribuição na costa oeste do Atlântico desde a Venezuela até o Uruguai, sendo abundante no Brasil entre os estados de Santa Catarina e Rio de Janeiro (KLAPPENBACH, 1964).A figura 2 mostra os estados em que a espécie se encontra bem estabelecida.

Figura 1- Distribuição da espécie *Perna perna* na costa do Brasil



Fonte: o autor (2015).

Pela espécie ser tão abundante na costa do Brasil, ela é muito utilizada para indicar grau de poluição marinha (FERREIRA, 2013).

Perna perna é a maior espécie de mitilídeos brasileiros. O tamanho médio para a espécie é de 5 a 8cm de comprimento por 3 a 4 cm de largura, porém eles podem atingir um tamanho de até 14cm (KLAPPENBACH, 1964).

Por serem animais sésseis, filtradores e resistentes a alterações ambientais, além de terem importância econômica em várias regiões do mundo os mexilhões são os invertebrados mais estudados (RESGALLA *et al.*, 2008).

Esses organismos vivem presos a substratos duros, na zona entre marés, em áreas desprotegidas e com incidência de ondas, onde se alimentam de materiais em suspensão. Os mexilhões da espécie *Perna perna* se fixam a esses substratos através de uma secreção produzida pela glândula bissogênica. Essa secreção, endurece quando em contato com a água formando inúmeros filamentos adesivos, o bisso (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1997).

Os mexilhões *P. perna*(Figura 3) são animais que se alimentam através da filtração da água, sendo que podem filtrar em média 80 litros de água por dia (FERREIRA; MAGALHÃES, 1995).

Figura 2- Mexilhão *Perna perna*, vista com as valvas abertas



Fonte: Henriques (2004)

Segundo Cunningham (1979) os bivalves têm uma série de características que os tornam bons biomonitorios: vivem em ambientes estuarinos e áreas marinhas costeiras, as quais são mais suscetíveis a poluição; são sésseis; vivem um tempo de vida relativamente longo; são amplamente distribuídos geograficamente e são de fácil coleta além de frequentemente viverem numa alta densidade.

2.4 TESTE DE MICRONUCLEOS

O teste de micronúcleos nos dá informações sobre os danos no DNA do animal causados por agentes químicos e físicos. É uma técnica que analisa as quebras cromossômicas, mostrando a presença de fragmentos ou cromossomos inteiros perdidos durante a mitose, que irão assumir a forma de micronúcleos na próxima interfase (DIXON; WILSON, 2000).

Os micronúcleos são núcleos adicionais, e podem ser mais de um, separados do núcleo principal da célula. (RIEGER, 1968). São formados por cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos acêntricos que por algum motivo não foram incorporados ao interior das células filhas durante a divisão celular. São corpúsculos que contém DNA, mas sem conexão estrutural com o núcleo principal (AGOSTINI, 1993).

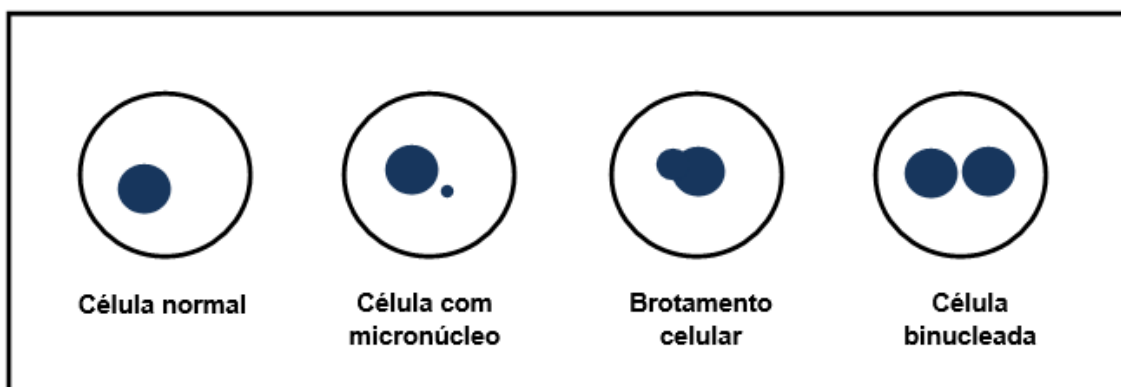
A hemolinfa tem características que fazem dela o tecido mais adequado para realizar o Teste de Micronúcleos do que os outros tecidos dos moluscos: é facilmente obtida e não requer muito tempo gasto para preparo das lâminas, o nível de micronúcleos espontâneos é baixo e os micronúcleos são mais evidentes e de fácil visualização nas células não granulares da hemolinfa (MERSCH *et al*, 1996)

Dentre as colorações estudadas por Majone *et al* (1988) a Giemsa se mostrou apropriada para este tipo de estudos, sendo confiável, além de mais prática se comparada a outras técnicas de coloração.

A técnica onde se preserva o citoplasma das células, assim mantendo os hemócitos intactos, se comparado ao método em que não se tem a preocupação de preservar o citoplasma, é um mais precisa para a identificação dos micronúcleos (HOGSTEDT, 1984).

O Teste de Micronúcleos é vantajoso para a avaliação genotóxica por ter um baixo custo além de se ter resultados em pouco tempo (HEDDLE, 1983). Logo tem se mostrado uma boa técnica *in vivo* para avaliação da mutagenicidade e qualidade da água.

Figura 3- Esquema mostrando os tipos de alterações celulares analisadas pelo Teste de Micronúcleos neste trabalho



. Fonte: O autor (2015).

3 ÁREA DE ESTUDO

Este trabalho foi realizado no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, utilizando de dois pontos para coleta: o ponto 1 situa-se na Plataforma de Pesca de Tramandaí e o Ponto 2 situa-se na Plataforma de Pesca de Cidreira (Figura 1).

O litoral gaúcho se divide em 3 partes, nomeadamente o litoral norte, médio e sul. A região de estudo se localiza no litoral norte do Rio Grande do Sul.

O litoral norte abrange 21 municípios, tendo uma extensão de 618km. Tem como limite norte o município de Torres e limite *Sul* o município de Palmares do Sul, onde faz fronteira com o Litoral Médio (DE MATOS; GRUBER, 2009).

Segundo dados do IBGE (2010), Tramandaí tem uma população estimada de 46.369 habitantes e Cidreira tem uma população estimada de 14.301 habitantes. Nos meses de verão o tamanho populacional destas duas localidades aumenta exponencialmente, conseqüentemente aumentando o impacto antrópico como descargas de poluentes e resíduos no ambiente aquático.

3.1 PONTOS DE COLETA

Os pontos de coleta aqui analisados foram escolhidos devido a serem os locais conhecidos onde há fixação do mexilhão *P. perna* no litoral Norte do RS. Os dois pontos são Plataformas de Pesca. Os bivalves, apesar de estarem conectados pelo bisso, estavam presos a pilares de concreto, a aproximadamente 1,5-2m metros de distância do sedimento.

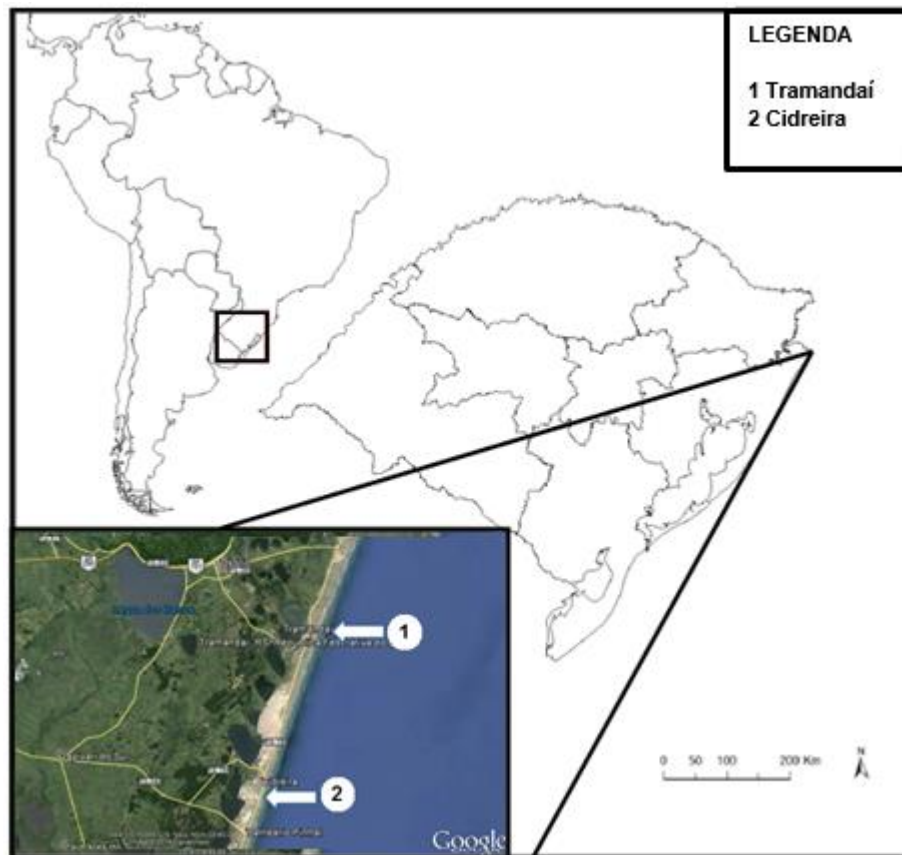
Em todos os pontos de coleta, nos pilares, os bivalves se encontravam na região entremarés, sendo expostos ao ar em períodos de maré baixa. Quando submersos (em maré alta), em todos os pontos de coleta, os bivalves ficavam, praticamente, à mesma distância da superfície da água.

Na cidade de Tramandaí (Ponto 1) há a presença do estuário do Rio Tramandaí, que faz divisa com o município de Imbé, e também duas monobóias da Transpetro. No ano de 2012 ocorreu um derrame de aproximados 33.600 mil litros de óleo em uma dessas monobóias, situada a aproximadamente 6km da costa (IBAMA, 2012) porém em operações de carga e descarga sempre há o risco de

liberação de pequenas quantidades de óleo. Na cidade de Cidreira (Ponto 2) há o predomínio de residências de veraneio e menor urbanização.

Os mexilhões adultos da espécie *Perna perna* foram coletados nos pilares das plataformas de Pesca dos municípios de Tramandaí e Cidreira, durante 2 verões, sendo a primeira coleta realizada em março de 2014 e a segunda coleta em março de 2015.

Mapa 1- Imagem de satélite indicando os pontos de coleta propostos: P1 - Plataforma de Pesca de Tramandaí; P2- Plataforma de Pesca de Cidreira



Fonte: adaptado de Christo (2013)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas duas coletas. Indivíduos de *Perna perna* foram coletados em março de 2014 (verão), e março de 2015. Os animais foram coletados em dois pontos diferentes do Litoral Norte do rio Grande do Sul com diferentes graus de ação antrópica: pontos 1 e 2. (Figura 1).

4.1 COLETA DE INDIVÍDUOS

Para avaliação do potencial mutagênico foram utilizados Mexilhões *Perna Perna* (MOLLUSCA:BIVALVIA). Foram coletados espécimes adultos de mexilhão em cada ponto de coleta. Os mexilhões foram coletados manualmente, de modo aleatório nos dois pontos de coleta. Amostras de água também foram coletadas em garrafas de 500ml, previamente descontaminadas. Foi mensurada a temperatura da água em cada ponto com um termômetro. As amostras coletadas foram acondicionadas em caixas plásticas contendo água marinha aerada em temperatura ambiente, onde os mexilhões foram transportados para o Laboratório de Mutagênese e Toxicologia do Centro Universitário Metodista IPA, onde permaneceram até o momento do sacrifício. Foram seguidos os protocolos de acordo com o COBEA, baseado no Guia Nacional para Cuidado e uso de Animais de Laboratórios. Em laboratório, os indivíduos selecionados para o experimento foram identificados quanto ao sexo e tamanho, medindo mais de 5cm para padronização das amostras, o que também é considerado por Narchi e Galvão-Bueno (1997) como o comprimento médio para a espécie.

4.2 BIOMETRIA

A biometria dos mexilhões foi realizada com o auxílio de balança de precisão e paquímetro. No laboratório, antes de realizar a biometria, foram retirados dos exemplares excessos de bisco e sujidade. Após, os exemplares foram identificados por letras e números para possível identificação posterior. Foram pesados em balança de precisão e medidos o comprimento e a largura com o paquímetro para depois então efetuar o abate dos indivíduos para sexagem.

Figura 4- Mexilhões *Perna perna* coletados em março de 2015.



Fonte: imagem cedida por Demitreo Machado (2015).

4.3 SEXAGEM

A sexagem foi realizada através da visualização da coloração dos indivíduos amostrados, já que indivíduos fêmeas tem uma coloração alaranjada enquanto os indivíduos machos têm uma coloração mais esbranquiçada.

Figura 5- Imagem mostrando a diferença na coloração de machos (esbranquiçados) e fêmeas (alaranjadas).



Fonte: EPAGRI (2014).

4.4 ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS

Para o preparo das amostras foram abertas então as conchas dos mexilhões e retirada a hemolinfa como descrito abaixo. Para estes procedimentos todos os protocolos estão de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.4.1 Preparo das Lâminas

Para a obtenção dos hemócitos, nas duas primeiras coletas, foi utilizada a técnica descrita por Silva *et al.* (2001). As conchas foram mantidas abertas com auxílio de uma pinça e utilizando uma seringa hipodérmica de 5ml injetou-se 1ml de Carnoy (ácido metílico e ácido acético glacial (1:1v/v)) no músculo adutor posterior e, em seguida foi removido 1ml de hemolinfa. Para cada animal foi utilizada 1 seringa e uma agulha descartáveis. O material foi fixado na seringa por 7 minutos e, então foram feitos esfregaços em 4 lâminas para análise microscópica. Após as lâminas foram flambadas e secas em temperatura ambiente. Após secas, as lâminas foram então fixadas em uma solução de metanol por 10 minutos. Depois de secas as lâminas foram coradas com Giemsa (1ml Giemsa para 1000ml de água destilada) por 4 minutos. Após coradas as lâminas foram lavadas com água destilada e deixadas secar em temperatura ambiente.

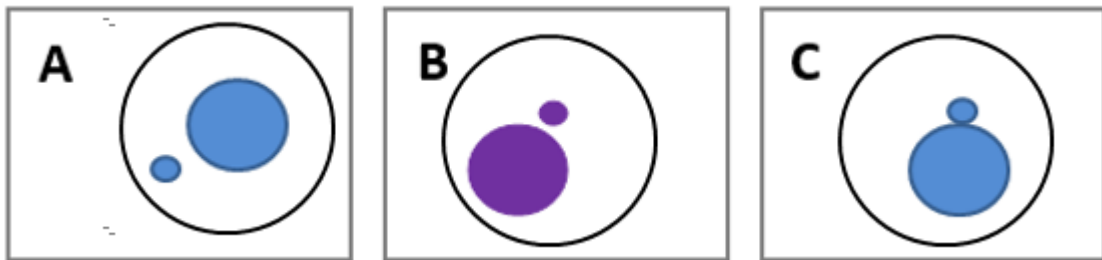
4.4.2 Contagem de Micronúcleos

Para determinação da frequência de hemócitos micronucleados (HMN) foram analisados 500 hemócitos, em 2 lâminas, para cada mexilhão, contabilizando um total de 1000 hemócitos analisados por indivíduo coletado, anotando-se a frequência de hemócitos normais, hemócitos micronucleados, brotamentos e células binucleadas.

A análise das lâminas foi realizada em microscopia óptica, com aumento de 1000x e auxílio de óleo de imersão, onde o reconhecimento dos micronúcleos obedece a critérios segundo Machado (2013):

1. devem ter um contorno regular, redondo ou oval e estar dentro do citoplasma da célula;
2. apresentar coloração semelhante ao núcleo principal;
3. seu diâmetro deve ser menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal;
4. devem estar no mesmo plano de foco do principal;
5. deve estar separado ou marginalmente justaposto ao núcleo principal, de modo que haja identificação clara do limite nuclear de ambos.

Figura 6- Esquema com alguns critérios para a identificação dos Micronúcleos



FONTE: O Autor (2015)

Nota: (A) MN com menos que 1/3 do tamanho do núcleo e dentro do citoplasma da célula; (b) MN com coloração semelhantes à do núcleo e no mesmo plano de foco; (C) MN separado marginalmente do núcleo.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS

A análise estatística dos dados obtidos entre as coletas foi realizada através de teste ANOVA de uma via seguida pelo teste de DUNCAN, utilizando o Software SPSS. A comparação entre machos e fêmeas dentro do mesmo ponto de coleta ou de estação do ano foi realizada através de teste-T para amostras independentes utilizando-se o teste de Levene para calcular a significância. O nível de significância exigido foi de um $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão médio (EPM).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados, após biometria, sexagem e análise dos hemócitos dos mexilhões *Perna perna*, estão dispostos a seguir.

5.1 BIOMETRIA E SEXAGEM

Os resultados obtidos nas biometrias e sexagens das coletas realizadas estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1- Biometria e sexagem realizadas em mexilhões *P. perna* coletados nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira em março de 2014 e março de 2015.

	Sexo	Peso	Comprimento	Largura
Tramandaí Coleta 1	Fêmea	32,66±2,84 ^{a c}	6,96±0,33 ^e	3,43±0,17
Tramandaí Coleta 1	Macho	25,2±0,86 *	6,24±0,05	3,66±0,61
Cidreira Coleta 1	Fêmea	39,5±7,02 ^b	7,25±0,47 ^g	2,95±0,14
Cidreira Coleta 1	Macho	20,5±7,5	5,95±0,55	2,90±0,40
Tramandaí Coleta 2	Fêmea	56,28±7,74 ^d	7,54±0,17	3,41±0,15 ^h
Tramandaí Coleta 2	Macho	33,33±2,96	6,83±0,13	3,23±0,20
Cidreira Coleta 2	Fêmea	32±3,76	7,12±0,19 ^f	2,90±0,14 ⁱ
Cidreira Coleta 2	Macho	39±5,36 #	7,0±0,28	2,96±0,16

Fonte: o autor (2015)

Nota: *Diferença estatística entre os machos coletados em Tramandaí nas coletas 1 e 2, onde $p < 0,050$.

Diferença estatística entre os machos coletados em Cidreira na coleta 2 e machos de cidreira e Tramandaí na coleta 1, onde $p < 0,050$.

^a Diferença estatística onde fêmeas de Tramandaí diferem de machos de Tramandaí, coleta 1. ($p = 0,050$)

^b Diferença estatística entre fêmeas de cidreira diferem dos machos de Cidreira, coleta 1. ($p = 0,019$)

^c Diferença estatística onde as fêmeas coletadas em Tramandaí diferem na primeira e segunda coletas. ($p = 0,050$)

^d Diferença estatística onde fêmeas de Tramandaí diferem das de Cidreira, na coleta 2. ($p = 0,050$)

^e Diferença estatística, onde na coleta 1, fêmeas diferem de machos em Tramandaí. ($p = 0,07$)

^f Diferença estatística, onde na coleta 2, fêmeas diferem de machos em Cidreira. ($p = 0,050$)

^g Diferença estatística, onde as fêmeas de Cidreira coleta 1 diferem das fêmeas de Cidreira coleta 2. ($p = 0,049$)

^h Diferença estatística, onde as fêmeas de Tramandaí, coleta 2, diferem das fêmeas de Cidreira das coletas 1 e 2, onde $p < 0,050$.

ⁱ Diferença estatística, onde os machos de Cidreira, coleta 2, diferem dos machos de Tramandaí e Cidreira na coleta 1, onde $p < 0,050$.

Quanto a pesagem dos indivíduos de mexilhões *P. perna* coletados, os resultados das análises estatísticas foram os seguintes: nos indivíduos analisados na primeira coleta, as fêmeas de Tramandaí diferiram dos machos de Tramandaí, sendo as fêmeas significativamente mais pesadas que os machos, sendo $p=0,05$. Na coleta 2 as fêmeas de Cidreira analisadas também tiveram um peso significativamente maior em relação aos machos de Cidreira, onde $p=0,019$. Ao compararmos as fêmeas coletadas na plataforma de Pesca de Tramandaí durante as duas coletas vemos que houve diferença estatística nos valores da pesagem sendo as fêmeas analisadas na segunda coleta as com maior peso, sendo $p=0,050$.

Na segunda coleta os indivíduos fêmeas de Tramandaí ($p=0,050$) eram mais pesadas do que as fêmeas de Cidreira. Os indivíduos machos, coletados em Tramandaí na primeira coleta eram relativamente mais leves que os machos analisados na segunda coleta, para $p<0,050$. Os machos coletados na segunda coleta em Cidreira também diferiram significativamente de valores de peso dos machos coletados em Tramandaí e Cidreira na primeira coleta. Os machos da coleta dois foram os com maior peso corporal, para $p<0,050$.

Quanto a medição do comprimento das conchas dos mexilhões as fêmeas de Tramandaí analisadas na primeira coleta diferiram do comprimento das conchas dos machos de Tramandaí da mesma coleta ($p=0,007$). As fêmeas tinham um maior comprimento das conchas em relação aos machos. As fêmeas de Cidreira obtidas na segunda coleta diferiram do comprimento das conchas dos machos de Cidreira da mesma coleta. Novamente as fêmeas tem as conchas mais compridas que as dos machos coletados ($p=0,05$).

Outro dado que ao fazer os testes apresentou diferença estatística nos valores do comprimento das conchas foi ao verificar que as fêmeas de Cidreira, coleta 1, diferiram das fêmeas da coleta 2 ($p=0,049$). Sendo as conchas das amostras da coleta 1 maiores proporcionalmente as da coleta 2.

Ao comparar o critério largura das conchas houveram duas diferenças estatísticas significantes. As fêmeas coletadas em Tramandaí na segunda coleta têm as conchas relativamente mais largas que as coletadas em Cidreira nas coletas 1 e 2 ($p=0,05$). Os machos coletados em Cidreira na segunda coleta também têm as conchas mais largas que os coletados em Cidreira na coleta 1, porém menores do que os coletados em Tramandaí na primeira coleta ($p=0,05$).

5.2 ALTERAÇÕES CELULARES ENCONTRADAS ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEOS

Os resultados observados, após análise dos hemócitos dos mexilhões *P. perna* coletados em março de 2014 e março de 2015 estão apresentados na Tabela 2. Os resultados aqui encontrados no teste de micronúcleos mostraram diferenças significativas entre os pontos amostrados, tanto na coleta 1 quanto na coleta 2.

Tabela 2-Tipos de alterações nucleares encontradas em hemócitos de mexilhões *P.perna* coletados nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira em dois verões.

	MN	alterações (BN e BR)	normais	alteradas	total
Tramandaí 2014	3±0,4082	1,75±0,8539	995,25±0,8539	4,75±0,8539	1000
Tramandaí 2015	6,25±0,25	1,25±0,4787	992,5±0,6455	7,5±0,6455	1000
Cidreira 2014	0,75±0,4787	0,75±0,4787	998,5±0,9574	1,5±0,7	1000
Cidreira 2015	2,25±0,4787	0,75±0,4787	997±0,8165	3±0,8165	1000

Fonte: O autor, 2013.

Nota: Média ±EPM, de acordo com o Teste Duncan, onde $p > 0,05$.

MN: micronúcleos; BR: brotamentos; BI: células binucleadas.

Alterações cromossômicas como micronúcleos, brotamentos e células binucleadas são indicadores de genotoxicidade ambiental (FISKESJÖ, 1985). Em todas as coletas foram encontradas alterações nucleares nos pontos de coleta 1 e 2.

Tabela 3- Tipos de alterações nucleares encontradas em hemócitos de mexilhões *P. perna* coletados nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira em Março de 2014.

MARÇO DE 2014	MN	alterações (BN e BR)	normais	alteradas	total
Tramandaí	3	4	993	7	1000
	2	2	996	4	1000
	3	0	997	3	1000
	4	1	995	5	1000
Cidreira	0	0	1000	0	1000
	0	0	1000	0	1000
	1	1	998	2	1000
	2	2	996	4	1000

Fonte: o autor (2015)

Nota: Número de ocorrências em 1000 células observadas. MN (micronúcleos); BR (brotamentos); BN (células binucleadas);

Tabela 4- Tipos de alterações nucleares encontradas em hemócitos de mexilhões *P. perna* coletados nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira em Março de 2015.

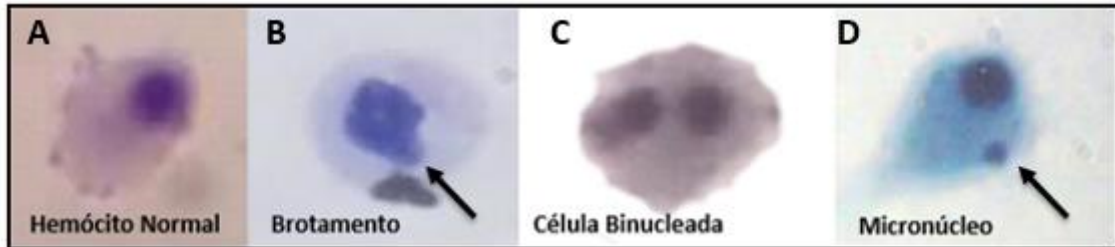
MARÇO DE 2015	MN	alterações (bn e br)	normais	alteradas	total
Tramandaí	6	2	992	8	1000
	7	2	991	9	1000
	6	0	994	6	1000
	6	1	993	7	1000
Cidreira	1	0	999	1	1000
	3	0	997	3	1000
	2	1	997	3	1000
	3	2	995	5	1000

Fonte: o autor (2015)

Nota: Número de ocorrências em 1000 células observadas. MN (micronúcleos); BR (brotamentos); BN (células binucleadas);

Alterações na morfologia nuclear foram caracterizadas pela presença de micronúcleos, brotamentos e células binucleadas nas amostras analisadas (Figura 7).

Figura 7- Alterações nucleares encontradas em hemócitos de mexilhões *P. perna*: A- Cél. Normal; B- Brotamento; C- Célula binucleada; D- Micronúcleo. A 1000x.

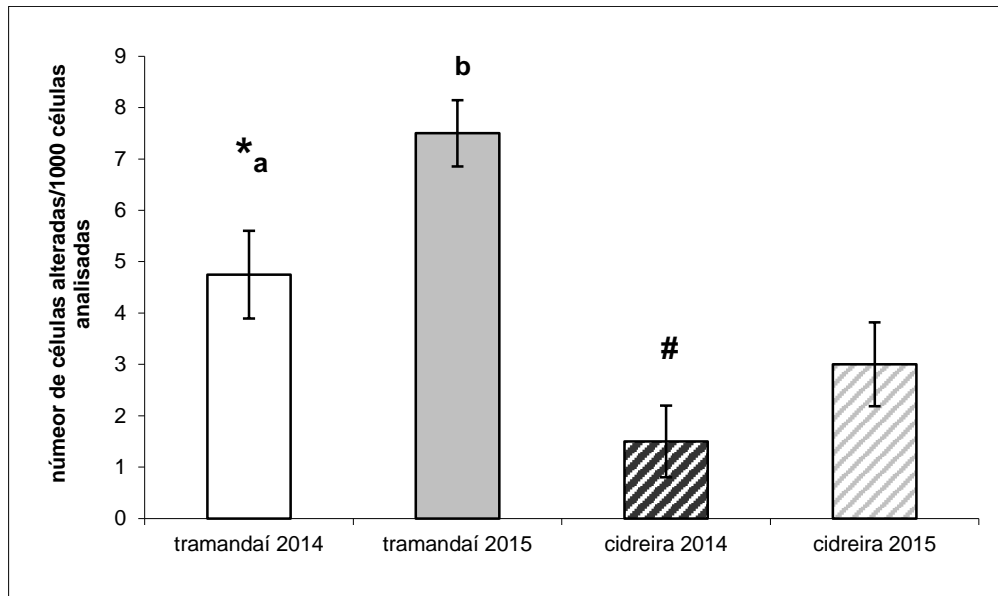


Fonte: o autor (2015)

Os resultados verificados neste estudo sugerem um maior potencial mutagênico na Plataforma de Pesca de Tramandaí, nas duas coletas de verão realizadas uma vez que a indução de micronúcleos é utilizada como marcador de danos genéticos resultantes da exposição do organismo a um agente mutagênico. O teste de micronúcleos in vivo apresenta enorme relevância ecotoxicológica (VILLELA, 2006).

Lima e Mello (2011) analisaram os efeitos mutagênicos do herbicida oxifluren sobre a hemolinfa do molusco *Biomphalaria glabrata* pela análise de micronúcleos e constataram que os indivíduos expostos a baixas quantidades de oxifluren tiveram severos danos a seus hemócitos e concluíram que o teste de micronúcleos é um ótimo bioindicador de agentes genotóxicos no ambiente aquático. Moluscos marinhos como o *Mytilus galloprovincialis* tem sido utilizados para verificar a contaminação dos ambientes aquáticos marinhos. Araújo Filho (2013) demonstrou que o teste de micronúcleos foi capaz de detectar alterações no material genético de moluscos expostos a diferentes agentes químicos.

Gráfico 1- Alterações nucleares encontradas em hemócitos de mexilhões *P. perna* coletados nas Plataformas de Pesca de Tramandaí e Cidreira, em março de 2014 e em março de 2015.



Fonte: O autor, 2015.

Nota: * Diferença estatística entre as coletas de Tramandaí 2014 e Tramandaí 2015; # Diferença estatística entre as coletas de Cidreira 2014 e Cidreira 2015; a- Diferença estatística entre Tramandaí 2014 e Cidreira 2014; b- Diferença estatística entre as coletas de Tramandaí 2015 e Cidreira 2015, de acordo com Teste Duncan onde $p > 0,05$.

Como podemos verificar no gráfico 1, em comparação entre células alteradas encontradas nas coletas de Tramandaí 2014 e Tramandaí 2015 não houve diferença estatística significativa. Se compararmos as coletas de Cidreira 2014 e Cidreira 2015 houve diferença ($p=0,05$) na quantidade de alterações encontradas, com um aumento no número de alterações nucleares na coleta realizada em 2015.

O número de alterações nucleares encontradas em Tramandaí e Cidreira na coleta de março de 2014 também diferiu ($p=0,05$), observando-se um aumento expressivo na quantidade de alterações encontradas na coleta realizada na Plataforma de Pesca de Tramandaí. Já em março de 2015, o número de alterações encontradas em Tramandaí e Cidreira novamente diferiu ($p=0,05$), tendo sido encontrado um número relativamente mais alto de alterações na Plataforma de Pesca de Tramandaí. Villela (2006) ao trabalhar com teste de micronúcleos em mexilhões *Limnoperna fortunei* no Lago Guaíba verificou que é possível observar

uma maior quantidade de células micronucleadas em animais expostos cronicamente a contaminantes ambientais.

Esse maior número de alterações nucleares nas coletas feitas em Tramandaí pode se dar ao fato desta ser a cidade em que a população mais aumenta nos meses de verão, aumentando conseqüentemente a geração de resíduos e a descarga de efluentes, bem como ao ponto de coleta estar situado a dois mil metros da desembocadura do Rio Tramandaí, sendo que a Bacia do Rio Tramandaí abrange uma população de 198.235 habitantes, de 15 municípios (FEPAM 2013), que juntos totalizam uma enorme quantidade de poluentes e resíduos descartados no mar através do estuário do Rio Tramandaí, além deste ponto de coleta ter duas monobóias da Transpetro, que armazenam óleo e derivados, a pouca distância, logo não se pode descartar que traços de hidrocarbonetos possam ser descartados entre as operações de carga e descarga de navios (CHRISTO, 2013). O aumento do número de alterações nucleares em Tramandaí e Cidreira, de 2014 para 2015 pode ser devido ao fato de mexilhões terem um tempo de vida relativamente longo e bioacumularem contaminantes em seus tecidos.

Não foram encontrados estudos que avaliassem alterações nucleares em mexilhões da espécie *Perna perna*, no mesmo contexto que o deste trabalho, estudos observacionais, sem intervenções e exposições a contaminantes selecionados. Foram encontrados somente estudos analisando a genotoxicidade em outras espécies de moluscos e peixes.

Dentre as técnicas utilizadas para detectar efeitos genotóxicos em animais, o teste de micronúcleos tem a vantagem de ser de fácil adaptação a diversas espécies (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Burgeot *et al* (1996) estudou o aumento da frequência de micronúcleos em mexilhões coletados durante quatro meses na França. Um aumento significativo na frequência de hemócitos micronucleados em mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* coletados durante o verão, em duas áreas diferentes do Mediterrâneo foi descrito por Brunetti *et al* (1992). Tanto Burgeot (1996), quanto Brunetti (1992) não relacionaram em seus trabalhos a frequência de alterações nucleares a agentes xenobióticos.

Em sua pesquisa com peixes em ambientes poluídos da Califórnia, Hose *et al* (1987) obtiveram um significativo aumento na frequência de eritrócitos micronucleados dos peixes coletados em ambiente contaminado em relação aos peixes coletados num local sem poluentes. Silva *et al* (2001) utilizaram o teste do

micronúcleo para avaliar mexilhões *Perna perna* expostos ao ácido ocadáico (AO), uma toxina marinha que é acumulada por organismos filtradores e que é capaz de induzir modificações no DNA. Eles observaram aumento significativo da frequência de micronúcleos em hemócitos entre animais que receberam doses variadas de AO quando comparadas ao grupo controle negativo. Quando utilizados organismos vivos expostos a um ambiente que seja relevante para a pesquisa, a frequência de micronúcleos obtida na análise pode ser tida como uma correlação entre a atividade genotóxica e a eficiência dos mecanismos de defesa fisiológicos (MERSCH *et al*, 1996).

Este estudo observou uma maior probabilidade de alterações nucleares nos mexilhões coletados na Plataforma de Tramandaí, se comparado ao outro ponto de coleta. A diferença significativa encontrada entre a frequência de alterações nucleares entre Tramandaí e Cidreira evidencia a presença de substâncias ou condições ambientais com potencial genotóxico capazes de causar dano ao material genético dos indivíduos coletados. É um indicio de que se deve investigar mais sobre estes resultados, até mesmo de uma possível fonte causadora destas alterações nucleares.

5.2.1 Micronúcleos

A contagem de micronúcleos pode ser usada para analisar os danos ao material genético de indivíduos expostos a fatores ambientais genotóxicos. A Plataforma de Tramandaí, se comparada quanto as duas coletas, teve diferenças estatísticas quanto a quantidade de células micronucleadas encontradas em cada coleta ($p=0,05$). Na coleta 2, de março de 2015 foi contabilizado um maior número de micronúcleos em Tramandaí em relação a primeira coleta. O Ponto 2, Cidreira também teve um aumento significativo na quantidade de micronúcleos da coleta de 2014 para 2015 ($p=0,05$).

Quando comparada a quantidade de micronúcleos encontrados entre os dois pontos na coleta de março de 2014 houve uma diferença estatística significativa entre os dados, tendo sido encontrados em Tramandaí uma quantidade relativamente maior de células micronucleadas ($p=0,05$).

Na segunda coleta, de março de 2015, o resultado foi semelhante a comparação entre os dois pontos, Tramandaí e Cidreira, na coleta de março de

2014, tendo sido registrado em Tramandaí um número significativamente maior de células micronucleadas ($p=0,05$).

O resultado da contagem de micronúcleos foi de acordo com o que se esperava, pois existe um potencial de pressão maior no município de Tramandaí, com um número de habitantes bem superior ao de cidreira e uma maior taxa de urbanização. É possível que o aumento exponencial da população nos meses de verão, principalmente na praia de Tramandaí tenham contribuído para estes resultados. Os micronúcleos podem ter como causa agentes físicos, químicos ou biológicos que tenham capacidade de induzir a perda de material genético. Estes agentes podem ser ditos como mutagênicos ou genotóxicos (VILLELA, 2006). Mersch e Beauvais (1997) em seu estudo com o Mexilhão Zebra (*Dreissenapolymorpha*), demonstraram um aumento na frequência de hemócitos micronucleados em organismos que foram transferidos para áreas monitoradas de rios que recebiam efluentes industriais. O aumento na frequência de micronúcleos é um biomarcador de efeitos genotóxicos, podendo refletir ambiente está exposto a agentes mutagênicos e clastogênicos (ALBERTINI *et al.*, 2000). Kuniyoshi (2011) diz que diversos estudos em peixes mostram que os indivíduos coletados em locais mais próximos da fonte poluidora apresentam uma maior frequência de micronúcleos nos eritrócitos.

5.2.2 Células Binucleadas e Brotamentos

Tramandaí não diferiu significativamente na quantidade de células binucleadas e brotamentos encontrados nas amostras analisadas nas duas coletas realizadas, em março de 2014 e março de 2015. A Plataforma de Pesca de Cidreira, nas duas coletas realizadas também não diferiu significativamente na quantidade de células binucleadas e brotamentos analisados em cada coleta.

Em março de 2014, houve diferença estatística ao compararmos os dois pontos coletados. Tramandaí apresentou um maior número de células binucleadas e brotamentos se comparado a Cidreira ($p=0,05$). Em março de 2015 não houve diferença significativa na quantidade de células binucleadas e brotamentos encontrados nos hemócitos dos mexilhões coletados em Tramandaí e Cidreira.

A diferença significativa encontrada entre os grupos de *P. perna* amostrados em Tramandaí e Cidreira, evidencia a presença de substâncias ou condições

ambientais com potencial genotóxico, capaz de causar dano ao material genético dos mexilhões.

6 CONCLUSÃO

A identificação de substâncias potencialmente genotóxicas não foi objetivo deste trabalho. A meu ver foi observado aumento na genotoxicidade para os hemócitos de *Perna perna* em Tramandaí em relação a Cidreira. Houve, em hemócitos, um aumento também na proporção de alterações nucleares encontradas da coleta de 2014 para 2015. Recomenda-se o uso de análises genotóxicas em hemócitos de mexilhões *Perna perna* para o monitoramento da região estudada;

Estudos como este ainda são escassos na região e a continuidade do biomonitoramento passivo é de significativa importância para poder demonstrar a representatividade dos dados obtidos nas duas coletas contempladas neste trabalho. No caso de acontecer vazamentos de óleo, o biomonitoramento das respostas dos organismos estudados é de suma importância pois fornecem dados importantes para a avaliação do dano ambiental causado.

O teste de micronúcleos usando mexilhões *P. perna*, mostrou-se um teste rápido e prático para o monitoramento da poluição de ambientes aquáticos .A proposta para coletas futuras é aumentar o número de pontos de amostragem, abrangendo uma área que contemple até Torres, e incluindo nestas coletas as monobóias da Transpetro próximas a Plataforma de Pesca de Tramandaí, podendo assim haver um resultado interessante quanto a diferentes quantidades de alterações nucleares encontradas nesses locais.

A coleta de dados ambientais como temperatura, pH, salinidade e análise dos principais metais nos tecidos dos mexilhões são uma alternativa possível para agregar mais dados ao estudo.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, Jeanete Maristela S. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotemas**, Florianópolis, v. 6, n. 2, p. 1-19, jan. 1993. ISSN 2175-7925. Disponível em: <<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/22698/20667>>. Acesso em: 11 nov. 2014. doi:<http://dx.doi.org/10.5007/22698>.

ALBERTINI, R.J. *et al.* IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v.463, p.11-172, 2000.

Araújo Filho, E. F. **Análise da radiosensibilidade de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* por meio do teste do micronúcleo.** 2013, 38f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Dossimetria e Instrumentação Nuclear) - Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

BERNET, D. *et al.*, 1999, Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Dis.**, v. 22, p. 25-34.

BRUNETTI, R.; GABRIELE, M.; VALERIO, P. GOLA, F. The micronucleus test: temporal pattern of baseline frequency in *Mytilus galloprovincialis*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 83, p. 75-78, 1992.

BURGEOT, T.; WOLL, S.; GALGANI, F. Evaluation of micronucleus test in *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French Coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n.1, p 39-46, 1996.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.264-271, 2005.

CAMPOS JÚNIOR, E. O. **Biomonitoramento em áreas poluídas e não poluídas do Rio Uberabinha, região de Uberlândia- Minas Gerais, por meio de Análise de Micronúcleos e Frequência de Cromossomos B em bagre (*Rhamdia quelen*).** 2011. 47f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG,. 2011.

CARVALHO, M. C. **Comunidade fitoplanctônica como instrumento de biomonitoramento de reservatórios no Estado de São Paulo.** 2003. 167f. Tese (Doutorado em Saúde Pública)- Instituto de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CHRISTO, G. S. **Análise de parâmetros do balanço redox em populações do mexilhão *Perna perna*(LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2013. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé. 2014.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.12. p.24-26. 2000.

Cunningham, P. A. The use of bivalve mollusks in heavy metal pollution research. In: W. C. VERNBERG, A. CALABRESE, *et al* (ed.) **Marine pollution: functional responses.** London: Academic Press, 1979. 183-221 pp.

DAVID, J. A. O. **Estudo de *Mytella falcata* (Mollusca, Bivalvia) como indicadora de efeitos genotóxicos e citotóxicos no estuário de Santos.** Tese (PhD) - UNESP, São Paulo, 2007. Disponível em: <2007http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100534/david_jao_dr_rcla.pdf?sequence=1>.

DE MATOS, E. A. C.; GRUBER, N. L. S. Os efeitos da atividade turística no litoral norte do Rio Grande do Sul. **Para Onde?!**, v. 3, n. 2, 2009. Disponível em: <http://seer.ufrgs.br/index.php/paraonde/article/view/22102/12861>. Acesso em: 20 ago. 2015.

DEPLEDGE, M.H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, p. 109-122, 1998.

DIXON, D.R.; WILSON, J.T. Genetics and marine pollution. **Hydrobiologia**, Holanda, v. 420, p. 29-43, 2000.

ENSAIOS de toxicidade. CETESB, [2013]. Disponível em: <http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/47/2013/11/ensaios-genotoxicidade-saiba-mais.pdf>. Acessado em: 10 mar 2014.

EMPRESA de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). Síntese Informativa da Maricultura 2011.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. **Desenvolvimento do Cultivo de mexilhões em Santa Catarina (sul do Brasil).** CONGRESSO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR (COLACMAR), 6., 1995, Mar del Plata, Argentina, **Resumos...** Mar del Plata [S. n.], p.80, 1995.

FERREIRA, M. S. *et al.* Trace metal contamination in mussel *Pernaperna* from Brazilian coast. **Cienc Rural**, Santa Maria, v.43, n.6, p.1012-1020, Junho de 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000600011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 10 de setembro de 2015.

FEPAM. **Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí**. 2013. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/bacia_tramandai.asp> Acesso em 04 nov.2015.

FISKESJÖ, G. (1985). **The Allium-test as a standard in environmental monitoring**, *Hereditas*,102, p. 99-112.

GALVÃO, P.M.A.; REBELO, M.F.; GUIMARÃES, J.R.D.; TORRES, J.P.M. & MALM, O. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal Aquatic Science and Technology**, v. 13, n. 2, p. 59-66, 2009.

HEDDLE, J. A. *et al.* The introduction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v.123, p.61-118, 1983.

HENRIQUES, M. B. **Resistência do mexilhão *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) proveniente de bancos naturais da baixada santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo**. 2004, 113f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro,2004.

HOGSTEDT, B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assesment of cytogenetic damage bin man. *Mutation Res*. N.130, p. 63-72, 1984.

HOSE, J. E.; CROSS, J. N.; SMITR, S. G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocytes micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California. **Marine Environmental Research**. N. 22, p. 167-176, 1987.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Laudo Técnico Ambiental N° 01/2012/MB-IBAMA-FEPAM**. 2012. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias_ambientais/laudo-tecnico-monoboia-de-tramandai.pdf> Acesso em 20 dez. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Demográfico 2010**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>>. Acesso em 01 out. 2015.

KLAPPENBACH, M.A. 1964. Lista preliminar de los Mytilidae brasileños con claves para su determinación y notas sobre su distribución. **An. Acad. Bras. Ciênc.** v.37, supl. p. 327-352.

KLUMPP, A.; DOMINGOS, M.; PIGNATA, M. L. Air pollution and vegetation damage in South America- state of knowledge and perspectives. In: AGRAWAL, S. B.; AGRAWAL, M. (eds). **Environmental Pollution and plant responses**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2000. p.111-136.

KUNIYOSHI, L. S. **Bioacumulação de elementos traço e expressão de micronúcleos em *Cathoropsspixii* (biomonitor) como ferramentas de avaliação da influência antrópica em dois setores do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape, São Paulo, Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química e Geológica) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21133/tde-20042012-143658/>>. Acesso em: 05 nov 2015.

MACHADO, A. K. Avaliação do potencial mutagênico do efluente do terminal petroquímico Almirante Soares Dutra (Osório- RS- Brasil) através do sistema teste de *Allium cepa*. 2013. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé. 2014.

MAJONE, F.; BELTRAME, C.; BRUNETTI, R. Frequences of micronuclei detected on *Mytilus galloprovincialis* by diferentes staining techniques after treatment with zinc chloride **Mutation Research**. Nn.209, p. 131-134, 1988.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M.N.; NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Research**., Amsterdam, v.371, p.47–55, 1996.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environmental: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, Amsterdam v.367, p.245-251, 1996.

MORAES, R. Estudos sobre poluição marinha: importância e perspectivas. In: **Efeitos de poluentes em organismos marinhos**. Rio de Janeiro, 2011.

NARCHI, W.; GALVÃO-BUENO, M. S. Anatomia funcional de *Perna perna* (Linné) (BIVALVIA, MYTILIDAE). **Revista Brasileira de zoologia**. v.14, p.135-168, 1997.

RESGALLA, Jr C. *et al.* **O mexilhão *Perna perna* (L.):** biologia, ecologia e aplicações. Rio de Janeiro (RJ): Interciência, 2008. 324p.

RIEGER, R. M. A.; GREEN. M, M. A **Glossary of Genétics and Cytogenetics**. London: Allen andUnwin, 1968. P. 507.

SILVA, C.R.*et al.* Genotoxicidade do Ácido Ocadaico- Indução de micronúcleos em Mexilhões *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) **Meio ambiente Biotecnologia Clínica e desenvolvimento**, n. 20, p.56-59, 2001.

TORRES, M. A.; NETO, P. C. Determinação do índice redox de Glutaciona, um biomarcador de contaminação marinha em algas, utilizando HPLC acoplado a um detector eletroquímico flow-through. **Revista Analytica**. v.30. p.96-104. 2007.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A. Genotoxicidade ambiental. In: ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. (Ed.) **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

VILLELA, I. V. **Avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais da região hidrográfica da Bacia do Lago Guaíba**. 2006, 153f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)- Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.