

## **Implementação de biomarcadores utilizando mexilhões *Perna perna* para biomonitoramento passivo**

**Aluno: Larissa de Souza Pinto Nogueira**

**Orientador: Angela de Luca Rebello Wagener**

**Co-Orientadores: Adriana Haddad Nudi e Thaís Pedrete Massone**

### **Introdução:**

Contaminante é todo elemento ou composto que ocorre em concentrações mais elevadas que as naturais. Já a definição de poluente é a de qualquer matéria ou energia que interfira na saúde e segurança da população, além de prejudicar suas atividades sociais e econômicas. Porém, a presença de contaminantes pode qualitativa ou quantitativamente alterar as características naturais do ambiente, e também sua utilização, gerando assim efeitos negativos e constituindo poluição. O contaminante torna-se então, um poluente. (von Rückert, 2010)

Devido à grande densidade demográfica das regiões costeiras, os ecossistemas litorâneos estão sujeitos a vários impactos de origem antropogênica. De especial relevância são aqueles derivados do despejo de compostos xenobióticos, que contaminam águas e sedimentos, e são fonte de efeitos deletérios à biota aquática. (LIMA, 2005)

A contaminação ambiental por agentes químicos tem ocorrido de forma intencional ou acidental em decorrência da ação antrópica. Os ecossistemas marinhos acabam, de uma forma ou de outra, constituindo-se como receptáculos temporários ou finais de uma grande variedade e quantidade de contaminantes. (Moraes et al., 2011)

A despeito da importância do ambiente marinho, o conhecimento para a proteção dos ecossistemas marinhos brasileiros contra a poluição é relativamente recente. Medidas legislativas para prevenir ou reduzir sua deterioração são escassas ou fracamente implementadas a nível nacional. (Moraes et al., 2011)

O biomonitoramento é uma prática que avalia a saúde ambiental de ecossistemas aquáticos e, conseqüentemente, a qualidade de suas águas. No biomonitoramento passivo, forma feita neste estudo, emprega-se animais coletados diretamente de seus habitats, onde a população natural existe. (KOCK & KRAMER, 1994)

O objetivo do presente estudo é realizar o biomonitoramento passivo na Baía de Guanabara, utilizando mexilhões *Perna perna* como bioindicadores e aplicando os ensaios de vermelho neutro e micronúcleo como biomarcadores, o primeiro avalia a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos e o segundo pode

identificar danos no DNA e/ou nos cromossomos resultantes da exposição ocupacional. Sendo assim, também será avaliada a água do local em que serão coletados os mexilhões, a fim de quantificar as concentrações de hidrocarbonetos e calcular o fator de acumulação.

A biota tornou-se uma importante ferramenta em programas de monitoramento ambiental, uma vez que a biodisponibilidade dos contaminantes é medida diretamente. Moluscos bivalves têm sido extensivamente empregados na avaliação da contaminação de ambientes aquáticos. Esses organismos são adequados como monitores biológicos de áreas contaminadas, pois eles são: sésseis, filtradores, de fácil coleta, estão presente ao longo de todo o ano e respondem rapidamente às variações das concentrações de contaminantes no meio.

### **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)**

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos químicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Devido à possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes podem se ligar entre si, há atualmente mais de 100 HPAs reconhecidos pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Apesar disso, somente 16 HPAs são considerados prioritários para USEPA (*U.S. Environmental Protection Agency*), em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica. Desta classe de compostos são eles: Naftaleno; Acenaftileno; Acenafteno; Fluoreno; Fenantreno; Antraceno; Fluoranteno; Pireno; Benzo(a)antraceno; Criseno; Benzo(b)fluoranteno; Benzo(k)fluoranteno; Benzo(a)pireno; Indeno(1,2,3-cd)pireno; Dibenzo(a,h)antraceno e Benzo(g,h,i)perileno (USEPA, Método 610; EC 166/2006). (POTIN et. Al, 2004)

São amplamente distribuídos no ambiente, devido às atividades relacionadas à extração, ao transporte, à transformação e à utilização do petróleo e de seus derivados.

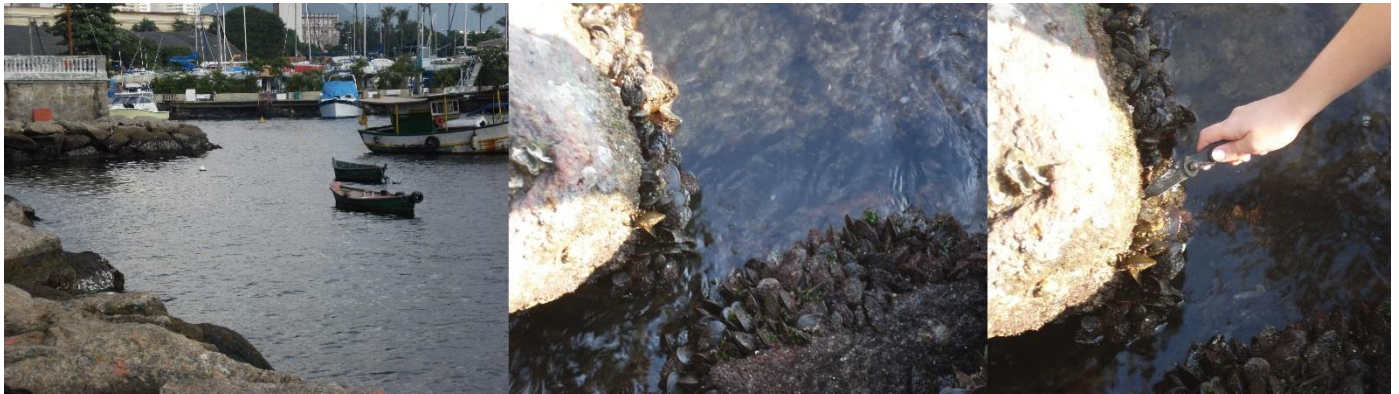
Os HPAs apresentam alta lipofilidade, são absorvidos pelos seres vivos, e sua análise pode revelar se provém de introdução direta de petróleo no ambiente (poluição, derramamentos) ou de processos de combustão (uso do petróleo como combustível). Os HPAs são metabolizados pelos órgãos internos dos seres vivos, transformados em compostos detectáveis que, encontramos nos organismos, podem ser utilizados como biomarcadores da exposição ao petróleo e seus derivados (NUDI, 2005).

### **Área de estudo**

A área escolhida para estudo e onde foram realizadas as coletas é um ambiente estuarino, no qual situa-se o aporte da Baía de Guanabara localizada no Rio de Janeiro e engloba toda a região Metropolitana da cidade. A área de coleta é próxima à região conhecida como “Quadrado da Urca”, que possui embarcações em excesso e recebe muitos despejos de esgoto. Além de derramamentos de óleo, aterramentos oficiais e clandestinos. (NAKASHIMA & PRANTERA, 2006)

A coleta foi feita no dia 07 de Julho de 2013 entre 08:30 min e 09 horas, em uma área de costões rochosos e que havia uma grande população de mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758).

Foram coletados 10 indivíduos, além da coleta de água, que foi em triplicata em garrafas de 4 L. O ponto escolhido foi aleatório, assim como os indivíduos coletados.



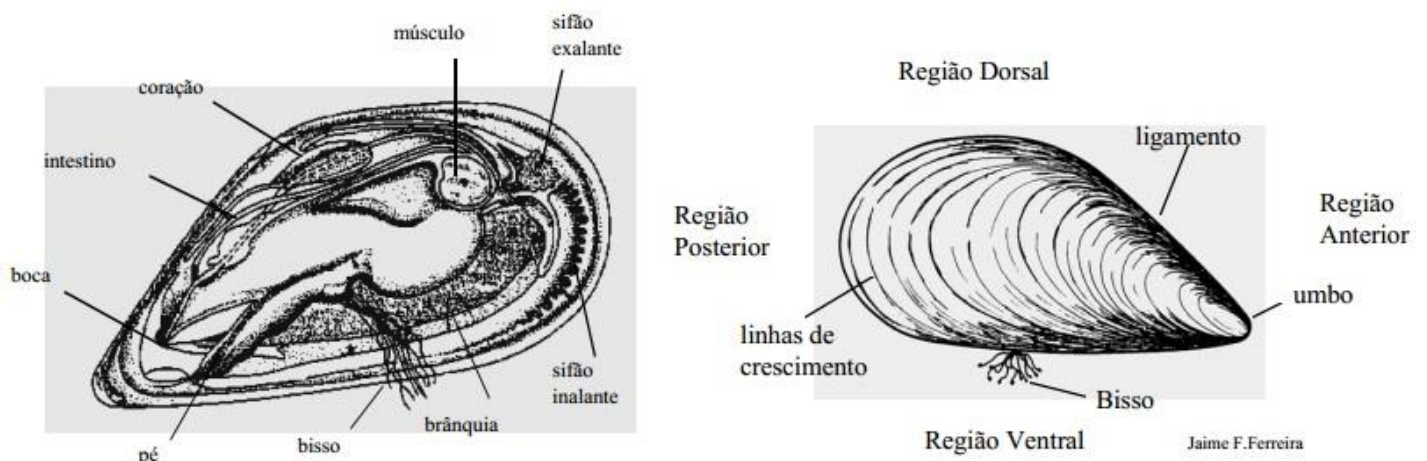
**Figura 1:** Área de estudo (Quadrado da Urca- Baía de Guanabara); Mexilhões no costão rochoso; Retirada de mexilhões do costão.

### **Mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758)**

Os organismos escolhidos para o estudo são os moluscos bivalves *Perna perna* (Linné, 1758), que pertencem à família Mytilidae. Trata-se de uma espécie bastante abundante no litoral entre os estados do Espírito Santo e Santa Catarina (EPAGRI, 1994). Suas populações estão presentes do mesolitoral até o infralitoral de costões rochosos e abrigam uma grande quantidade de fauna e flora associada. (TORRES, 1983).

São organismos filtradores e que com o batimentos dos cílios branquiais conseguem obter alimento. A respiração desses indivíduos é branquial e fatores como tamanho, etapa do ciclo reprodutivo, presença de poluentes determinarão a taxa de oxigênio necessário. (Lima, 2001).

Quanto a diferenciação sexual, esta pode ser observada através da coloração das gônadas. Os machos apresentam cor creme ou esbranquiçada e as fêmeas possuem cor vermelho-tijolo ou alaranjada (EPAGRI, 1994).



**Figura 2:** Anatomia interna e externa, respectivamente, do mexilhão *Perna perna*.

### Metodologia:

Os mexilhões foram coletados manualmente, de modo aleatório, no costão rochoso do Quadrado da Urca, situado dentro da Baía de Guanabara (*in situ*). Foram selecionados 8 espécimes adultos. Amostras de água também foram coletadas, como triplicatas, em garrações de 4L, previamente descontaminados. As amostras foram devidamente acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo. Ainda no local, foi mensurada a temperatura da água com um termômetro e esta era de 26°C.

Em laboratório, os animais foram limpos e livres de organismos incrustantes. Posteriormente foi realizada a biometria dos animais, com auxílio de uma balança e paquímetro (Fig.3).



**Figura 3:** Procedimento de biometria, mensuração de tamanho e peso dos mexilhões, com auxílio de paquímetro e balança.

### Extração de hemolinfa

A hemolinfa foi extraída com auxílio de uma seringa hipodérmica (1 a 2,5 ml) com agulha 0,8 X 40 mm, contendo 100  $\mu$ L de solução fisiológica. A agulha foi inserida cuidadosamente no músculo adutor posterior do animal e cada amostra obtida foi depositada em um tubo de Eppendorf de 2mL de volume (Fig. 4). Em alguns dos animais a coleta foi bem complicada e trabalhosa, gerando dúvidas quanto ao conteúdo extraído, sendo assim, optou-se por não utilizar estas amostras.



**Figura 4:**Extração de hemolinfa com auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha de 0,8 X 40 mm

### **Biomarcadores**

Primeiramente foi preparada uma solução salina fisiológica, a qual foi utilizada para os ensaios de vermelho neutro e micronúcleo. Esta solução foi feita a partir de 4,77 g HEPES; 1,47 g  $\text{CaCl}_2$ ; 13,06 g  $\text{MgSO}_4$ ; 25,48 g  $\text{NaCl}$ ; 0,75 g  $\text{KCl}$  pesados em uma balança analítica. Posteriormente foram diluídos em água destilada e avolumados a 1 ML em balão volumétrico. O pH foi ajustado para 7,36 com 1 M de  $\text{NaOH}$ , com auxílio do aparelho Orion 3 Star da ThermoFisher Scientific.

Uma solução de estoque vermelho neutro foi confeccionada, dissolvendo 20 mg deste em 1 mL de DMSO, esta solução foi acondicionada na geladeira. E no dia que foi realizado o teste de vermelho neutro foi preparada a solução de trabalho, adicionando 5  $\mu\text{L}$  da solução estoque em 995  $\mu\text{L}$  de solução salina.

O teste de vermelho neutro foi realizado utilizando 100  $\mu\text{L}$  da hemolinfa coletada, contendo 100  $\mu\text{L}$  de solução fisiológica. Uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  desta mistura foi colocada na lâmina e o corante vermelho neutro foi adicionado. Para melhor visualização, as lâminas foram colocadas em uma câmara escura úmida para incubação por 15 minutos. Após este período, foram colocadas as lamínulas e feitas sucessivas visualizações das lâminas no microscópio (40x), anotando-se o tempo de retenção do corante determinando o ponto em que há evidência da perda do corante dos lisossomos para o citosol.

Considerando que uma amostra saudável normalmente tem um tempo de retenção de 150-180 minutos (DIERICKX, 1991).

No ensaio do micronúcleo, alíquotas de 50 µL de células em suspensão foram transferidas para uma lâmina, previamente tratada com solução de Poly-L-lysine para adesão das células, e posteriormente foram fixadas com solução de Carnoy (metanol/ácido acético 3:1) e coradas com solução Giemsa 3%. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico com aumento de 40x.

### **Material para análise de HPAs e n-alcano**

Para análise de contaminação no tecido do mexilhão foi realizada a coleta da parte mole encontrada dentro da concha. Após todos os procedimentos abordados acima, foi aberta a concha com auxílio de espátula para não danificar a amostra e retirado todo o conteúdo do interior desta. As amostras foram acondicionadas em potes de vidros descontaminados e congeladas a -80°C e depois liofilizadas durante 5 dias e posteriormente passarão pelos processos de extração, *clean-up* e fracionamento, para a então análise dos compostos por cromatografia em fase gasosa, através da quantificação baseada na padronização interna.

As amostras de água foram acondicionadas em geladeira até um tempo antes do de iniciar o processo de extração dos hidrocarbonetos, quando esta foi retirada com antecedência para que ficasse em temperatura ambiente. Antes da extração foi adicionado 100 mL de MeCl<sub>2</sub> à amostra, além dos padrões subrogados de F1 e F2, para análise de água. A adição destes padrões tem como objetivo o acompanhamento do desempenho da metodologia empregada, que é considerada adequada caso a recuperação situe-se na faixa entre 40 e 125%. (SAUER &BOEHM, 1995).

A amostra passa por agitação de 150 rpm, durante 3 minutos através de uma mesa agitadora, seguida por repouso de 10 minutos. A fase orgânica foi recolhida em um recipiente de vidro e este procedimento foi repetido mais duas vezes.

A metodologia utilizada na determinação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos descrita acima é baseada no método EPA 8015C [5] e EPA 8270C [6], respectivamente.

Os procedimentos referentes à análise de hidrocarbonetos ainda não foi concluído tanto para biota quanto para água, que também deve passar pelos processos de *clean-up* e fracionamento e quantificação através de cromatografia em fase gasosa e análise estatística.

### **Resultados e discussão**

Os biomarcadores escolhidos no presente estudo são ferramentas muito importantes para o biomonitoramento e que juntamente com as análises que estão sendo processadas em laboratório compõem um resultado mais sólido e justificável. Sendo assim, os valores obtidos no momento correspondem apenas ao ensaio de vermelho neutro e micronúcleo, uma vez que, os outros resultados referentes à presença de HPAs nas amostras de água e tecido estão em andamento.

O ensaio de vermelho neutro apresentou tempo de retenção variando entre 80-90 minutos e em comparação com estudos realizados em ambientes semelhantes, também na Baía de Guanabara, mas em outros pontos de coleta (Lima, 2001; Francione, 2005 e 2007), também utilizando o mexilhão *Perna perna*, apresentou tempo de retenção entre 25-82 minutos e que

foram considerados ambientes impactados. Portanto, o resultado obtido no presente estudo sugere um comprometimento da integridade lisossômica, não tão severamente, mas há sim um certo grau de estresse causado ao organismo utilizado para estudo devido à contaminação.

O ensaio de micronúcleo não apresentou resultados fidedignos e qualitativos, pois não foi possível analisar claramente os micronúcleos nas lâminas e a quantidade de células por lâmina foi escassa, sendo assim, optou-se por refazer este ensaio em outra ocasião, buscando resultados pertinentes e de qualidade.

Os resultados de análise de hidrocarbonetos em biota e água ainda não foram totalmente processados até o presente momento.

### Conclusão:

As análises continuarão sendo processadas e será feita a elaboração de uma conclusão pertinente às respostas para os objetivos da pesquisa em questão. Baseando-se em estudos anteriores (LIMA, 2001; FRANCIONE et. Al., 2005) o uso de biomarcadores como o vermelho neutro e micronúcleo para o biomonitoramento, e de mexilhões *Perna perna* como bioindicadores é importante como ferramenta para a avaliação da contaminação por hidrocarbonetos em ambientes estuarinos. Espera-se que os biomarcadores analisados neste estudo possam responder quanto à contaminação ambiental, tornando o biomonitoramento eficiente.

### Biometria (07/07/2013)

Indivíduo	Peso (g)	Tamanho (cm)	Sexo	Hemolinfa Retirada
Mexilhão <i>Perna perna</i>				
1	31,5	6,5	F	NÃO
2	35,0	7,0	M	SIM
3	23,5	6,5	M	NÃO
4	24,5	7,0	F	NÃO
5	27,0	6,3	F	SIM
6	22,0	6,0	M	SIM
7	20,5	5,7	M	SIM
8	21,5	6,1	F	SIM

### Referências:

1. von Rückert, G. *Introdução a Biogeoquímica e ciclos*: Notas de aula. Mestrado em Engenharia Industrial. Centro Universitário do Leste de Minas Gerais – Unileste. Ipatinga, 2010.

2. Lima, E.F.A. *Acumulação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em invertebrados marinhos e avaliação do uso de biomarcadores celulares e bioquímicos no biomonitoramento*. 184 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

3. Moraes, R. *Estudos sobre Poluição Marinha: Importância e Perspectivas*. **Livro: Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**, Rio de Janeiro, 2011.

- Potin, O. *et al.* (2004). Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Oxford, v.54, n.1, p.45-52.

- Kock, W.C.; Kramer, K.J.M. (1994). Active Biomonitoring (ABM) by translocation of bivalve molluscs. In: Kramer, K.J.M.(Ed.) (1994). *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*. p. 51-84.

- EPA, 8015C: Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography. Revision 3.Feb. 2007.

- EPA, 8270C: Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Revision 4. Feb. 2007.

- Francioni *et al.* (2005). Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon in *Perna perna* from Guanabara Bay, Brazil. *Environmental Forensics*, v.6, p.361-370.

- DIERICKX, P. J.; VAN DE VYVER, I. E. Correlation of the neutral red uptake inhibition assay of cultured fathead minnow fish cells with fish lethality tests *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.46, n.5, p.649-653, 1991.

- LOWE, D. M. *et al.* Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda* *Marine Ecology Progress Series*, v.91, p.135-140, 1992.

- Nudi, A. H, 2005. Avaliação da Contaminação de Manguezais da Baía de Guanabara Utilizando Caranguejos *Ucides Cordatus* como Bioindicador de Poluentes de Petróleo e Desenvolvimento de Metodologias de Analises. Tese de Doutorado em Química PUC/RJ.

- Francioni, E., Wagener, A. L. R, Calixto, R., 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. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 15, Nº. 1, 103-110.
- Francioni, E., Wagener, A. L. R, Scofield, A. L, Depledge, M. H, Cavalier, B., 2007. Evaluation of the mussel Perna perna as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. Marine Pollution Bulletin. Vol. 54, 329-338.
- Francioni, E., Wagener, A., Scofield, A. L, Cavalier, B., 2005. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon in Perna perna from Guanabara Bay, Brazil. Environmental Forensics. Vol. 6, 361-370.
- ZAGATTO; BERTOLETTI. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. RIMA, p.66,2006
- NAKASHIMA, L. S.; PRANTERA, M. T. *Estudo da Poluição da Baía de Guanabara* **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.1, n.2, , jul-dez 2006