



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



Análise do potencial tóxico de variáveis de ambiente eutrofizado em caramujos de água doce *Pomacea canaliculata*

Ingrid Pereira de Souza

Orientadora: Marta Marques Souza
Coorientadora: Simone Rutz da Costa

Rio Grande
2023



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



Análise do potencial tóxico de variáveis de ambiente eutrofizado em caramujos de água doce *Pomacea canaliculata*

Aluno: Ingrid Pereira de Souza

Orientadora: Marta Marques Souza

Coorientadora: Simone R. Costa

Dissertação apresentada ao Programade
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais como
requisito parcial para a obtenção do título
de mestre em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2023

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo aos meus pais, Eva e Cícero, por terem me dado a oportunidade de estudar sempre me apoiando e me incentivando a continuar, por isso esse trabalho eu dedico a vocês!!! Aos meus amigos que a FURG me presentiou, agradeço imensamente por cada um que passou e contribuiu para que eu chegasse até aqui! E não poderia faltar os meus amigos que conheci na casa do estudante :Agda a artista, a colega de quarto, a acumuladora, estudamos juntas desde o ensino médio nos afastamos e o destino se encarregou de cruzar nossos caminhos, obrigada pelas conversas, pelos conselhos pelas risadas; Jeidson, o engenheiro, o que combina e muda de última hora, o dos conselhos que nunca segue, o que eu sempre posso contar, obrigada! E nosso ancião, fundador do grupo café filosófico da famosa salinha do Hotel de trânsito, o sábio, o conselheiro o amigo que mesmo longe se mantém perto. Enfim obrigada a todos, vocês me incentivam a ser cada dia melhor.

As manas da Licenciatura pra vida: Aline, obrigada por me ouvir, me aconselhar, você é força, você é luz! Bárbara a primeira pessoa do curso que eu conversei, sempre muito receptiva, obrigada pelos conselhos, pelas conversas, pelas palavras de incentivo quando achava que não conseguiria! A mana luli, que me escutava reclamar me acalmava depois surtava comigo mas no fim dava tudo certo, sem você esse processo seria muito mais difícil, obrigada pelas discussões, pelos ensinamentos “Eu quero ser como você quando eu crescer!”

Agradeço a minha Orientadora Marta, pelos ensinamentos e conselhos, e pelos puxões de orelha. E a Co-Orientadora Simone pela paciência! O técnico da botânica Pablo por toda a paciência e dedicação em me auxiliar quando precisei. Os técnicos da limnologia : Clara e o Cláudio pelo auxílio nas análises químicas, obrigada! A Daiane Carrasco maravilhosa obrigada pelos conselhos e palavras de incentivo e pelas vezes que me ouviu chorar de saudade do lab de genética e da organização impecável!

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande pelo ensino gratuito e de qualidade, e a CAPES pelo bolsa concedida durante a execução do trabalho.

RESUMO

O enriquecimento dos ecossistemas por nutrientes como nitrogênio e fósforo é preocupante, por acarretar possíveis deteriorações, comprometendo o estado de saúde do animal, por alterações citobioquímicas e/ou genotóxicas. A utilização de análises de citotoxicidade a partir do ensaio vermelho neutro (VN), permite identificar danos celulares e efeitos tóxicos. Para avaliação da saúde geral dos organismos em ecossistemas aquáticos é a identificação de alterações no funcionamento dos hemócitos. E por fim, a utilização de métodos para a identificação e quantificação de danos no DNA e de potenciais químicos que possam causar estes danos. Efeitos adversos dos químicos podem ser influenciados pela complexidade do meio ambiente, e por isso é indispensável à compreensão destes mecanismos de toxicidade e de sua interação com diferentes variáveis. Para a avaliação da integridade ecológica diversos programas de biomonitoramento de qualidade da água utilizam invertebrados, o contato com o ambiente onde vivem pode se tornar uma via de contaminação, a partir da absorção de substâncias, através da alimentação, contato com a água e sedimento. Para as condições experimentais, os animais foram separados em 4 grupos (CTR, N, F e N+F) durante o período de 96 horas, com a utilização da hemolinfa para a contagem do número de hemócitos e os tecidos glândula digestiva e borda do manto para as análises de citotoxicidade e dano de dna (sítio AP). Os resultados nos tratamento com nitrogênio (N) e nitrogênio e fósforo (N+F) para citotoxicidade (glândula digestiva) apresentaram diminuição significativa, já para dano do DNA (borda do manto) houve um aumento significativo, e o número de hemócitos totais, somente o tratamento (N+F) apresentou diminuição significativa em relação ao controle (CTR). Por fim demonstrando que o nutriente nitrogênio tem potencial tóxico sobre os caramujos *P. canaliculata*, assim como a suscetibilidade dos tecidos para as análises utilizadas.

Palavras-chave: genotoxicidade; fósforo; nitrogênio; molusco; citotoxicidade.

ABSTRACT

The enrichment of ecosystems by nutrients such as nitrogen and phosphorus is worrisome because it leads to possible deterioration, compromising the health status of the animal, by cytobiochemical and/or genotoxic alterations. The use of cytotoxicity analyses from the neutral red (VN) assay, allows the identification of cellular damage and toxic effects. For assessing the general health of organisms in aquatic ecosystems is the identification of changes in hemocyte function. And finally, the use of methods for the identification and quantification of DNA damage and potential chemicals that may cause this damage. Adverse effects of chemicals can be influenced by the complexity of the environment, and therefore an understanding of these mechanisms of toxicity and their interaction with different variables is indispensable. For the evaluation of ecological integrity several water quality biomonitoring programs use invertebrates, contact with the environment where they live can become a pathway of contamination, from the absorption of substances, through feeding, contact with water and sediment. For the experimental conditions, the animals were separated into 4 groups (CTR, N, F, and N+F) during the 96-hour period, using the hemolymph for hemocyte count and the digestive gland and mantle border tissues for cytotoxicity and DNA damage analyses (AP site). The results in the treatments with nitrogen (N) and nitrogen and phosphorus (N+F) for cytotoxicity (digestive gland) showed a significant decrease, whereas for DNA damage (mantle border) there was a significant increase, and the number of total hemocytes, only the treatment (N+F) showed a significant decrease compared to the control (CTR). Finally, this demonstrated that the nutrient nitrogen has a toxic potential on *P. canaliculata* snails, as well as the susceptibility of the tissues for the analyses used.

Keywords: genotoxicity; phosphor; illness; shellfish; cytotoxicity

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho está dividido em Introdução geral, composto por: eutrofização, biomarcadores e utilização de invertebrados, referências bibliográficas e o Capítulo 1, que ficou dividido em: resumo, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos e referências bibliográficas, sob as normas ABNT.

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1. Eutrofização.....	12
1.1.1. Contextualização	12
1.1.2. Nutrientes: Nitrogênio e Fósforo	13
1.1.3. Risco ecológico e efeitos na biota.....	16
1.2. Hemócitos.....	17
1.3. Biomarcadores	17
1.3.1. Citotoxicidade	18
1.3.2. Dano no DNA e Sítio AP	18
1.4. Utilização de invertebrados	19
1.4.1. <i>Pomacea canaliculata</i>	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. HIPÓTESE	25
CAPÍTULO 1.....	26
ABSTRACT	27
1. Introdução.....	28
2. Material e Métodos.....	30
2.1. Cultivo e Manejo de Gastrópodes	30
2.2. Desenho experimental	31
2.3. Análises dos Nutrientes e Categorização do ambiente	32
2.4. Hemócitos.....	32
2.5. Biomarcadores.....	32
2.5.1. Citotoxicidade	33
2.5.2. Extração do DNA e Sítio AP	33
2.6. Análise Estatística	33
3. Resultados	34
3.1. Análises dos Nutrientes e categorização do ambiente.....	34
3.2. Número de Hemócitos.....	35
3.3. Citotoxicidade	35
3.4. Dano DNA/ Sítio AP	36
4. Discussão	37
5. Conclusão	40
6. Agradecimentos	41
7. Referências.....	41

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Representação das formas de fósforo presentes em ambientes aquáticos. (Esquema: Adaptado de Thomann e Mueller)

Figura 2: Representação das formas de nitrogênio presentes em ambientes aquáticos. (Esquema: Adaptado de Thomann e Mueller)

Figura 3: Formação dos sítios abásicos na molécula de DNA. (Imagem: Boiteux & Guillet 2004)

Figura 4: (A) Músculo do pé em *Pomacea canaliculata*. (B) Sifão exposto em *Pomacea canaliculata*. (C) Ovos de *Pomacea canaliculata*.

CAPÍTULO 1

Figura 1: Desenho experimental (Esquema: Ingrid Pereira de Souza)

Figura 2: Níveis de fósforo no tempo inicial (T= 0h) e no tempo final (T=96h) em todos os tratamentos.

Figura 3: Níveis de nitrogênio no tempo inicial (T= 0h) e no tempo final (T=96h) em todos os tratamentos.

Figura 4: Número de hemócitos.

Figura 5: (A) Citotoxicidade na Glândula Digestiva. (B) Citotoxicidade na Borda do Manto

Figura 6: (A) Sítio AP Glândula Digestiva. (B) Sítio AP Borda do Manto

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1: Classificação trófica dos estados dos lagos de acordo com OECD. (Fonte: Adaptado por Rivera 2003)

Tabela 2: Classificação trófica dos estados dos lagos. (Fonte: Adaptado de Wetzel 1983)

Tabela 3: Concentração de P-total em relação ao estado trófico de lagos. (Fonte: Adaptado de Esteves 1988, citado por Vollenweider 1968)

Tabela 4: Concentração de fósforo total segundo a resolução CONAMA N° 357/05. (Fonte: Adaptado CONAMA 2005)

Tabela 5 – Classificação dos ambientes aquáticos, seguindo as diferentes formas nitrogenadas (mg/l). (Fonte: Adaptado de Esteves 1988)

Tabela 6 – Concentrações médias de metais (mg/kg de peso seco) nos tecidos de *Pomacea canaliculata* em estudos anteriores.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Eutrofização:

1.1.1. Contextualização

As interações entre fatores bióticos (bactérias, vegetais, animais, entre outros) e abióticos como características físico-químicas: pH, temperatura, nitrogênio e fósforo, estão ligados diretamente com o estado de saúde do ambiente (JAH, 2004). Os ecossistemas costeiros estão sob pressão ao aumento na entrada de nutrientes, o que reduz a qualidade da água e leva à eutrofização (VAN WIJNEN et al., 2015). A eutrofização é o aumento da concentração de nutrientes, como fósforo e nitrogênio nos ambientes lóticos e lênticos, como um fenômeno natural (ESTEVES, 1998). A reciclagem de nutrientes e o aporte de sedimentos causam um lento envelhecimento dos ecossistemas aquáticos, que pode ser acelerado por ações antrópicas, causando grandes prejuízos aos organismos presentes no ambiente (TELLES, 2013). O aumento de ações antrópicas muitas vezes contribui diretamente para o excesso de nutrientes nos corpos de água doce. Os despejos de esgotos domésticos não tratados, contaminantes agrícolas e industriais causam um aumento rápido na concentração de fósforo (P) e nitrogênio (N) na água, oriundos de detergentes e fertilizantes por exemplo.

O processo de enriquecimento de nutrientes de um corpo de água, seja por causas naturais ou antropogênicas, pode ser classificado dentro da Limnologia com relação ao seu grau de eutrofização. Este processo iniciou-se com NUMANN (1909,1929) e THIENEMANN (1925,1931) e consistia na classificação de diferentes lagos em diferentes categorias de estado trófico, este definido como uma resposta biológica a entrada de nutrientes. A **TABELA 1** apresenta os valores para classificação de lagos, baseada no estado trófico em países da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO TRÓFICO DE LAGOS DE ACORDO COM OECD

Estado trófico	Especificações
Ultraoligotrófico	Corpos aquáticos com produtividade muito baixa e concentrações insignificantes de nutrientes que não acarretam em prejuízos aos usos da água.
Oligotrófico	Corpos aquáticos com baixa produtividade, em que não ocorrem interferências indesejáveis sobre os usos da água decorrentes da presença de nutrientes.
Mesotrófico	Corpos aquático com produtividade intermediária, com possíveis implicações sobre a qualidade da água.

Eutrófico	Corpos aquáticos com alta produtividade, e redução da transparência, nos quais ocorrem alterações indesejáveis na qualidade da água decorrentes do aumento da concentração de nutrientes e interferências nos seus múltiplos usos.
Hipereutrófico	Corpos aquáticos afetados pelas elevadas concentrações de matéria orgânica e nutrientes, com comprometimento acentuado dos seus usos, associado a episódios de florações de algas ou mortandade de peixes.

Fonte: Adaptado de Rivera (2003)

Consequentemente os parâmetros como: nitrogênio, fósforo, clorofila ou sólidos totais inorgânicos podem ser utilizados para a classificação do grau de trofia de ambientes aquáticos, e estes podem converter o estado de eutrofização para classes com maiores ou menores graus de trofia, como exemplificado na **TABELA 2** que apresenta valores de fósforo total, nitrogênio total, sólidos totais inorgânicos e clorofila-a de diferentes estados tróficos. Assim as condições geográficas dos lagos podem alterar os critérios de classificação dos ambientes (JONES & KNOWLTON, 1993).

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO TRÓFICO DE LAGOS

Estado trófico	Fósforo Total Dissolvido (µg/L)	Nitrogênio Total (µg/L)
Ultraoligotrófico - Oligotrófico	< 1 – 5	< 1 – 250
Oligotrófico - Mesotrófico	5 – 10	250 – 600
Mesotrófico - Eutrófico	10 – 30	500 – 1100
Hipereutrófico	30 - > 5000	500 - > 15000

Fonte: Adaptado de Wetzel (1983)

Consequentemente o aumento da produtividade primária se relaciona com o enriquecimento de nutrientes e possíveis ocorrências de proliferação de algas ou macrófitas aquáticas que podem interferir na biodiversidade aquática.

1.1.2. Nutrientes: Fósforo e Nitrogênio

O fósforo pode ser encontrado nos corpos d'água em diversas formas tais como fósforo particulado (orgânico e inorgânico) e fósforo dissolvido (orgânico e inorgânico) (SHARPLEY & HALVORSON, 1994; SHARPLEY, 1995). Tanto nas formas dissolvidas ou nas particuladas estarão fósforo estará sempre combinado ou complexado a outros elementos, a **Figura 1** apresenta um esquema das formas do fósforo encontradas no meio aquático.

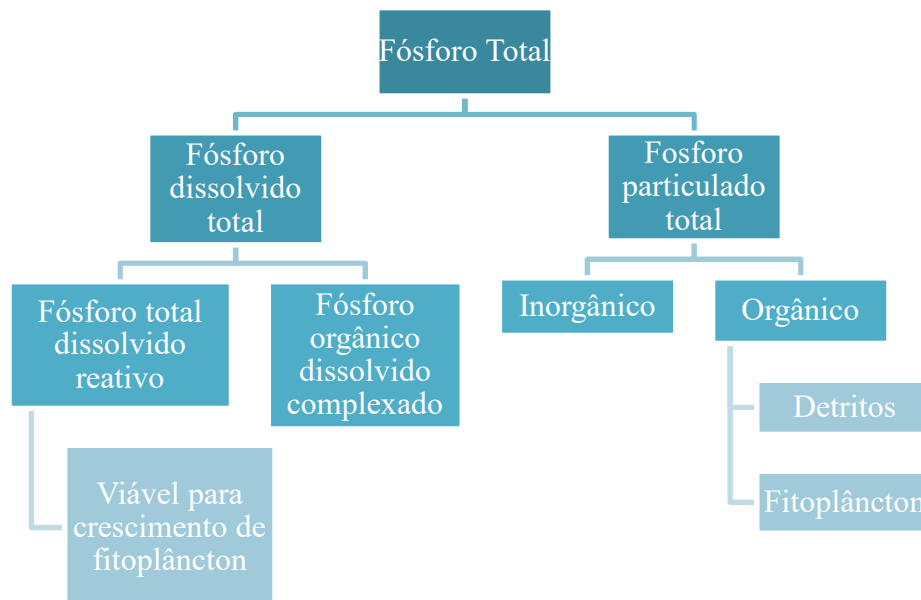


Figura 1. Representação das formas de fósforo presentes em ambientes aquáticos.
Fonte: Adaptado de Thomann e Mueller (1987)

O fosfato inorgânico a partir da matéria orgânica é catalisado por enzimas fosfatases produzidas por bactérias. Com a produção de fitases feita por bactérias e fungos, tem importância por transformar o fosfato inorgânico em ortofosfatos (ESTEVES, 1988). Assim o fosfato pode ser assimilado pelos organismos para processos metabólicos, porém este processo pode sofrer interferência de fatores como luz e pH (WETZEL, 1983).

Além disso, pode estar relacionado ao grau de trofia dos ambientes aquáticos, assim sua concentração deve ser vista como um potencial de eutrofização. A classificação de trofia pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) utiliza os valores de fósforo para a classificação do grau de trofia, conforme a **TABELA 3**.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE P-TOTAL EM RELAÇÃO AO ESTADO TRÓFICO DE LAGOS

Estado trófico	Fósforo Total Dissolvido ($\mu\text{g/L}$)
Ultraoligotrófico	< 5
Oligotrófico	5 – 10
Mesotrófico	10 – 30
Eutrófico	30 - 5000
Hipereutrófico	> 100

Fonte: Adaptado de Esteves (1988), citado por Vollenweider (1968)

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece valores de fósforo total para ambientes lóticos e lênticos em águas continentais que devem ser iguais ou inferiores aos valores apresentados na **TABELA 4** a fim do enquadramento dos corpos de água e estabelecer condições e padrões de lançamentos de efluentes.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO TOTAL SEGUNDO A RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357/05

CLASSES 1 e 2 – ÁGUAS DOCES	
PARÂMETRO	VALOR ESTABELECIDO
Fósforo total (ambiente lêntico)	0,02 mg/L P
Fósforo total (ambiente intermediário, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos para ambientes lênticos)	0,025 mg/L P
Fósforo total (ambientes lóticos e tributários para ambientes intermediários)	0,1 mg/L P
CLASSE 3 – ÁGUAS DOCES	
PARÂMETRO	VALOR ESTABELECIDO
Fósforo total (ambiente lêntico)	0,05 mg/L P
Fósforo total (ambiente intermediário, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos para ambientes lênticos)	0,075 mg/L P
Fósforo total (ambientes lóticos e tributários para ambientes intermediários)	0,15 mg/L P

Fonte: Adaptado CONAMA (2005)

O fósforo participa de processos biologicamente fundamentais, como estruturação de membranas celulares, armazenamento de energia e metabolismo celular (ESTEVES, 2011). Em ecossistemas aquáticos, o fósforo pode atuar como elemento limitante, contribuindo para o aumento da biomassa fitoplanctônica, sendo assimilado biologicamente na forma de fosfato, e tem suas origens tanto naturais quanto artificiais (ROCHA; ANDRADE; LOPES, 2015, VAROL, 2013). Embora seja um dos responsáveis pelo desencadeamento do processo de eutrofização, sua associação à ecotoxicidade e/ou toxicidade ocorre principalmente a partir de sua disponibilidade no ambiente aquático propiciar o crescimento de algas responsáveis pela liberação de toxinas e citotoxinas.

Similarmente, o nitrogênio, encontra-se nos cursos d'água nas formas: N_2 (nitrogênio molecular), NH_4^+ (íon amônio), NO_2^- (nitrito) e NO_3^- (nitrato), NH_3 (amônia), N_2O (óxido nitroso), nitrogênio orgânico dissolvido e nitrogênio orgânico particulado (ENRICH-PRAST, 2005). A representação esquemática das formas de nitrogênio encontradas no sistema aquático está apresentada na **Figura 2**.

Assim, o nitrogênio é um macronutriente importante presente na estrutura de proteínas e na composição celular, atuando como nutriente limitante da produção primária (WETZEL 1983). Os resíduos de nitrogênio adentram nos ambientes aquáticos por fontes naturais como excretas dos animais e restos alimentares, já suas ocorrências antrópicas são advindas da utilização de fertilizantes, detergentes, despejos domésticos e industriais (TOMASSO 1994; GROSS et al., 2000; SPERLING 1996). As formas de nitrogênio, como o nitrato e o íon amônio nos ambientes aquáticos são importantes por representarem as principais fontes de nitrogênio para os produtores primários (ESTEVES, 1998). Tal excesso possibilita o crescimento de algas favorecendo também a eutrofização (SPERLING, 2005).

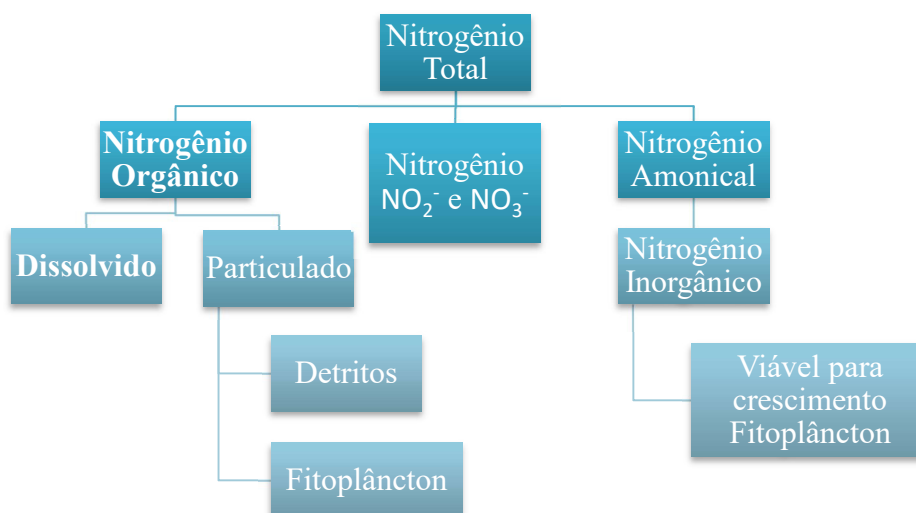


Figura 2. Representação das formas de Nitrogênio presentes em ambientes aquáticos.
Fonte: Adaptado de Thomann e Mueller (1987)

Como apresentado acima, nos ambientes aquáticos, tanto o nitrogênio quanto o fósforo podem contribuir para definir o grau de eutrofização de acordo com suas concentração, a **TABELA 5**, apresenta a concentração de compostos nitrogenados e sua possível relação com o grau de trofia.

TABELA 5 – CLASSIFICAÇÃO DOS AMBIENTES AQUÁTICOS, SEGUINDO AS DIFERENTES FORMAS NITROGENADAS (mg/L)

ESTADO TRÓFICO	N - Amoniacal	Nitrato	Nitrito
Oligotrófico	0,0 – 0,3	0,0 – 1,0	0,0 – 0,5
Mesotrófico	0,0 – 2,0	1,0 – 5,0	0,5 – 5,0
Eutrófico	2,0 – 15,0	5,0 – 50,0	5,0 – 15,0

Fonte: Adaptado de Esteves (1988)

Embora o nitrogênio seja um macronutriente importante para os organismos, em meio aquático, assume formas que podem se tornar tóxicas, tais como a amônia, o nitrito e o nitrato. A amônia encontra-se nos corpos d'água na forma ionizada e não ionizada constituindo a amônia total. Segundo autores, a forma mais tóxica é a amônia não ionizada, por sua capacidade de difusão pelas membranas celulares (FROMM & GILLETTE, 1968; YU & HIRAYAMA, 1986). O nitrito é um composto tóxico para organismos aquáticos presente no processo de nitrificação da amônia em nitrato ou ainda como produto da nitrificação do nitrato (TSAI & CHEN, 2002). O mecanismo de toxicidade do nitrito atua incapacitando a oxigenação dos tecidos, e como consequência a diminuição a quantidade de oxigênio para o metabolismo, podendo ocorrer hipóxia e mortalidade dos organismos (BROWNELL 1980; GROSS 2004; CHEN et al., 1986). Já o nitrato possui baixa toxicidade, entretanto em sistemas fechados pode acumular-se e/ou atuar em conjunto com outras formas nitrogenadas provocando efeitos letais e/ou subletais em diferentes espécies (THURSTON et al., 1978; SANTOS et al., 1993).

Alguns trabalhos já analisaram os efeitos de produtos nitrogenados, como OSTRENSKY (1993) que determinou o efeito subletal/letal (24 a 96h) da amônia em diferentes fases do ciclo de vida do camarão *Farfantepenaeus paulensis* e OSTRENSKY (1997) verificou o efeito letal na mistura de nitrito e amônia. Já as observações feitas por WOLFE & PATZ, 2002 descrevem os efeitos de um dos compostos nitrogenados, como o nitrato que reduz reações endógenas de nitrito e nitrosação produzindo compostos cancerígenos e ainda associado a efeitos genotóxicos e citogenéticos.

1.1.3. Risco ecológico e efeitos na biota

O enriquecimento dos ecossistemas por estes nutrientes (fósforo e nitrato) é preocupante. Quando em excesso, estes nutrientes podem acarretar possíveis deteriorações, como a mudança na composição de espécies, aumento da biomassa fitoplanctônica, aumento da turbidez da água, diminuindo a entrada de luz nos copos d'água e a redução do oxigênio no fundo (JOHANNESSEN & DAHL 1996; SHARP, 2010; ALEXANDER et al., 2008). Consequentemente, pode ocorrer a predominância de espécies tóxicas, como floração de algas e cianobactérias que afetam a sobrevivência dos organismos, uma vez que estas produzem citotoxinas (ZENG et al., 2019; CARPENTER, 2008; CARACO et al.; FISHER et al., 2006). As citotoxinas afetam animais domésticos e selvagens, assim como podem afetar a saúde humana (CARMICHAEL, 1992). Estudos com diferentes modelos biológicos descrevem casos de envenenamento de organismos expostos a cianotoxinas geralmente produzidas pelos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia* e *Oscillatoria* (RESSOM et al., 1994). O nível de contaminação dos corpos de água, constitui um fator limitante para os organismos que vivem nestes ecossistemas aquáticos, comprometendo a saúde do animal, por alterações citobioquímicas e genotóxicas (BRITO & LUZ, 2015; ARIAS et al., 2007).

Estabelecer uma associação entre efeitos ecológicos gerados pela poluição e a saúde dos organismos é difícil (STAHL, 1991). Embora a análise química das variáveis nitrogênio e fósforo forneçam informações importantes sobre as condições da água, são incapazes de inferir dados sobre os efeitos biológicos causados (CURADO et al., 2018; GRAZEFFE, 2009; COSTA & OLIVI 2008). Mudança nas características físicas e químicas do ambiente, leva a mudanças na composição de comunidades biológicas gerando uma perda na biodiversidade dos ecossistemas de água doce (MABERLY et al., 2002; CALISTO et al., 2004, 2005).

1.2. Hemócitos

Uma forma de avaliação da saúde geral dos organismos é através da análise da hemolinfa, que desempenha um papel fundamental no transporte de metabólitos, reparo de conchas e sistema imunológico (GOPALAKRISHNAN et al., 2009 ; MICHELSON, 1980). As células da hemolinfa

possuem morfologia variável, exibindo diferentes capacidades de adesão e fagocitose (MATRICON-GONDRANO & LETOCART, 1999) e são utilizadas como um importante biomarcador de poluentes em ecossistemas aquáticos, isto se deve pelo fato de que qualquer alteração no funcionamento dos hemócitos pode comprometer a saúde do organismo. Os hemócitos circulantes desempenham um papel na imunidade inata e estão relacionados ao reconhecimento de agentes externos, resposta fagocitária e reações citotóxicas (JOHNSTON & YOSHINO, 2001).

Diversos trabalhos são descritos analisando os hemócitos, como Auffret e Oubella (1994) que relataram uma diminuição no número de hemócitos em períodos de fome, já Dikkeboom et al., (1984) que descreveram que com o aumento da idade os moluscos tendem a diminuir o número de hemócitos. E o trabalho desenvolvido por CAJARAVILLE e colaboradores (1992) e ZAROOGIAN & YEVICH, (1993), relataram sobre a mobilização das células responsáveis pela defesa imunológica em presença de poluentes.

1.3. Biomarcadores

Alterações nas respostas biológicas sejam moleculares, celulares, morfológicas ou fisiológicas relacionadas à exposição a determinadas substâncias químicas ou efeitos tóxicos são denominados biomarcadores (VAN DER OOST et al., 2003). Os biomarcadores de exposição, refletem a distribuição das substâncias químicas através do organismo e são identificados como dose interna, assim a concentração do químico presente no ambiente refere-se à dose externa (LYNCH et al., 2011). Já os biomarcadores de efeito refletem a interação da substância química com os receptores biológicos (CEBULSKA-WASILEWSKA, 2003).

Os biomarcadores genéticos a partir de análises de genotoxicidade verificam efeitos, e fornecem informações relevantes sobre possíveis impactos no DNA. Organismos bivalves, tais como os gêneros *Perna* (SIU et al., 2008), *Mytilus* (BINELLI et al., 2010; VENIER & ZAMPIERON; BOCCHETTI et al., 2008), *Dreissena* (PAVLICA et al., 2000) e *Crassostrea* (BOLOGNESI et al., 2006) são utilizados em estudos para investigar a genotoxicidade das águas (SOUZA & FONTANELLI, 2006; BUSCHINI et al., 2004).

1.3.1. Citotoxicidade

Análises de citotoxicidade são usadas para identificação de danos celulares, efeitos tóxicos, morte celular e proliferação celular. O vermelho neutro (VN) é um corante muito utilizado na histologia, que é absorvido por difusão através da membrana dos lisossomos. Os lisossomos são organelas responsáveis pela reciclagem de “detritos” celulares (BRENNER et al., 2014). Entretanto compostos que podem danificar as membranas dos lisossomos resultam na diminuição da retenção do corante, sendo possível distinguir entre células danificadas ou mortas das células vivas através da intensidade de cor (BRENNER et al., 2014). COUGHLAN e

colaboradores (2009), relataram os efeitos da salinidade no molusco *Ruditapes philippinarum* usando o ensaio de retenção de vermelho neutro com soluções salinas adaptadas. MARTINEZ-GOMEZ e colaboradores (2015) desenvolveram um trabalho sobre a estabilidade da membrana lisossomal em mexilhões. Assim, demonstrando que o a análise da integridade lisossomal pode ser utilizado com sucesso como uma ferramenta ecotoxicológica sensível, ajudando na investigação dos efeitos de vários estressores em organismos aquáticos (GALLOWAY et al., 2004).

1.3.2. .Dano do DNA/ Sítio AP

O DNA está suscetível a uma diversidade de danos, como quebras de fitas, oxidação de base, desaminação e depurinação/despirimidinas, por exemplo. Dentre várias lesões no DNA genômico, as formadas pela perda de uma nucleobase, conhecida como sítios apurínicos/apirimidínicos (Sítio AP), são formadas a partir da clivagem N-glicosídica, esta responsável pela ligação de uma base purina/pirimidina ao açúcar desoxirribose (**Figura 3**). Fatores físicos, químicos, agentes oxidantes e mutagênicos podem ser responsáveis pela formação dos sítios AP. Estas lesões são reparadas por endonucleases durante o processo de reparo por excisão de base (BER), entretanto alguns sítios AP podem não ser reparados e assim se tornarem mutações após o processo de replicação e transmissão do DNA, perpetuando ao longo das gerações (GRECO & TOR, 2005; LOEB & PRESTON 1986; LINDAHL & NYBERG 1972; BOITEUX & GUILLET 2004).

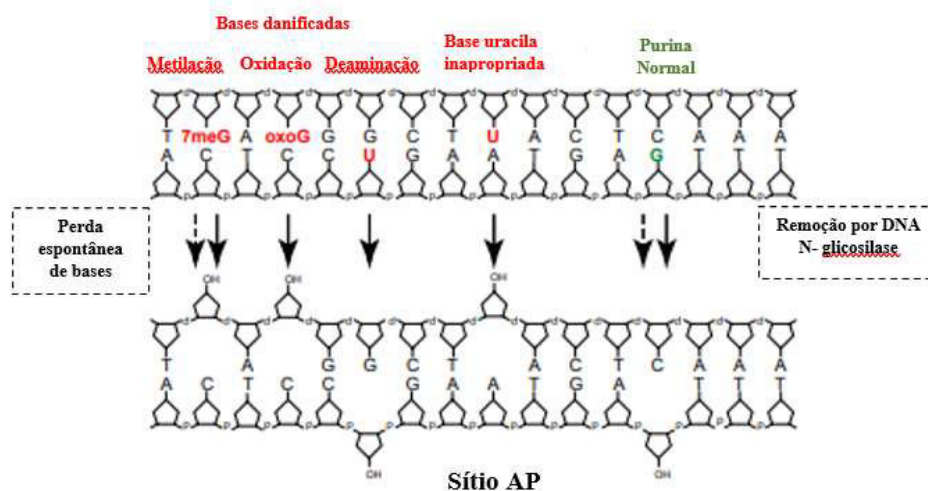


Figura 3. Formação dos sítios abásicos na molécula de DNA.

Fonte: Boiteux & Guillet 2004

Erros durante a replicação do DNA que não forem reparados, podem acarretar em anomalias cromossômicas e mutações, que podem ocorrer por causas naturais/genéticas. Ainda assim, podem ser causadas por agentes químicos, físicos ou biológicos que provocam alterações cromossômicas, como quebras do material genético (clastogênicos), mutações no DNA (mutagênicos), inseridos artificialmente nos ambientes aquáticos por ações antrópicas (LEE &

STEINERT, 2003; LARSEN, 2005).

Por isso a importância em desenvolver métodos para identificar e quantificar estes danos, assim como identificar o potencial de toxicidade genética de químicos que possam causar este tipo de dano no DNA.

1.3.3. *Modelo Biológico*

Ocupando diferentes habitats, os invertebrados são bons modelos para avaliação da integridade ecológica (GOULART & CALLISTO, 2003). Devido à facilidade de coleta, sensibilidade as mudanças físico-químicas dos ambientes, diversos programas de biomonitoramento de qualidade da água utilizam macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores. Enquanto alguns são muito sensíveis aos fatores que afetam o ecossistema, outros são tolerantes a estas perturbações (ALBERTONI & PALMA-SILVA, 2010). Os invertebrados possuem importante papel na reciclagem de nutrientes e matéria orgânica, formando um elo entre os produtores e como alimentos para outros níveis tróficos (REECE & RICHARDSON, 1999). O contato com o ambiente onde vivem, pode se tornar uma via de contaminação a partir da absorção de xenobióticos, através da alimentação, contato com a água e sedimento (PEREIRA & EBECKEN, 2009). Estes organismos devido a sua capacidade de acumular em seus tecidos diferentes elementos, como Pb (chumbo) e Zn (zinco), Hg (mercúrio), As (arsênio) e U (urânio) descritos por (HAYES *et al.*, 2015; VEGA *et al.*, 2012)

A glândula digestiva tem diversas funções, como secreção de enzimas digestivas para digestão extracelular e intracelular, absorção de nutrientes, além de um papel importante na desintoxicação (DIMITRIADIS 2001; PONTE e MODICA 2017). Já o manto é o primeiro órgão que separa o meio externo do meio interno do organismo, sendo responsável pela regulação iônica do animal atuando principalmente no processo de formação de concha (SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018), podem ser importantes ferramentas para estudos de biomonitoramento ambiental .

A espécie *Pomacea canaliculata* (LAMARCK, 1822), mostrada na **Figura 4** é um molusco endêmico da região tropical e subtropical da América do Sul, sendo considerada invasora em regiões não endêmicas e praga em cultivos de arroz em muitos países (BRITO & JOSHI, 2016; HAYES *et al.*, 2015). Em sua área endêmica os caramujos invadem lavouras de arroz no sul do Brasil, próximas a regiões costeiras de banhados e lagoas (SOSBAI, 2018; HICKEL & SCHEUERMANN, 2010).

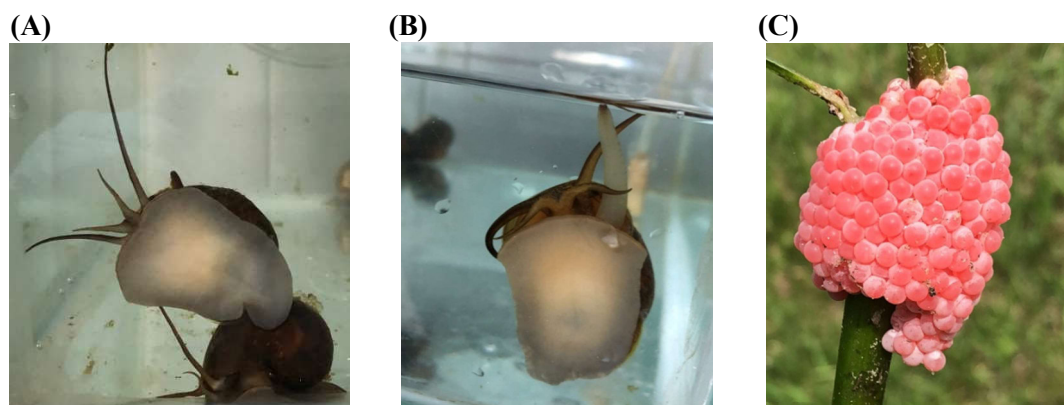


Figura 4 – (A) Músculo do pé em *Pomacea canaliculata*. (B) Sifão exposto. (C) Ovos.

Estudos ecotoxicológicos sobre concentrações de metais pesados demonstram que os caracóis da maçã possuem o potencial de acumular concentrações desses metais nos tecidos, de acordo com a **TABELA 6**. Assim em alguns casos existe uma correlação positiva entre a carga tecidual e a possíveis concentrações de tóxicos ambientais (HAYES et al., 2015).

TABELA 6 – Concentrações médias de metais (mg/kg de peso seco) nos tecidos de *Pomacea canaliculata* em estudos anteriores.

Espécies e tecidos	Cu	Cd	Pb	Zn	Localização	Referências
<i>Pomacea canaliculata</i> (cabeça - pé)	32 - 90	0.4 - 2.5	5.0 - 32	70 - 240	Guangdong, China	Deng et al., 2008
<i>Pomacea canaliculata</i> (víscera)	60 - 170	5.0 - 29	160 - 620	3000 - 6400	Guangdong, China	Deng et al., 2009
<i>Pomacea paludosa</i> (pé)	44 - 145	-	-	-	Florida, USA	Hoang et al., 2007
<i>Pomacea paludosa</i> (víscera)	75 - 229	-	-	-	Florida, USA	Hoang et al., 2008

Fonte: Hayes 2015

Efeitos adversos dos agentes tóxicos podem ser influenciados pela complexidade do meio ambiente, e por isso é indispensável à compreensão destes mecanismos de toxicidade e de sua interação com diferentes variáveis (FISCHER et al., 2013). Neste sentido, cabe ressaltar a importância de estudos que identifiquem potenciais tóxicos em variáveis como nitrogênio e fósforo, assim como a utilização do caramujo *Pomacea canaliculata* em estudos de monitoramento ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTONI, E.F.; PALMA-SILVA, C. Caracterização e importância dos invertebrados de água continentais com ênfase nos ambientes de Rio Grande. *Caderno de Ecologia Aquática*, Rio Grande, v. 5, n. 1, p. 9-27, 2010
- ALEXANDER, R. B.; SMITH, R. A.; SCHWARZ, G. E.; BOYER, E. W.; NOLAN, J. V. & BRAKEBILL, J. W. **Differences in Phosphorus and Nitrogen Delivery to The Gulf of Mexico from the Mississippi River Basin**. *Environmental Science and Technology*, v. 42, p. 822- 830,
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos**. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.
- AUFFRET, M., DUCHEMIN, M., ROUSSEAU, S., BOUTET, I., TANGUY, A., MORAGA, D., & MARHIC, A. (2004). **Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the “Erika” oil spill**. *Aquatic Living Resources*, 17(3), 297-302.
- BINELLI A, COGNI D, PAROLINI M, PROVINI A. **Multi-biomarker approach to investigate the state of contamination of the R. Lambro/R. Po confluence (Italy) by zebra mussel (Dreissena polymorpha)**. *Chemosphere* v. 79, p. 518–528, 2010.
- BOCCHETTI R, FATTORINI D, PISANELLI B, MACCHIA S, PILATO F, PELLEGRINI D, REGOLI F. **Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in Harbour areas**. *Aquatic Toxicology*, v. 89, p. 257–266, 2008.
- BOLOGNESI C, LANDINI E, ROGGERI P, FABBRI R, VIARENGO A. **Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies**. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 33(4), p. 287-92, 1999.
- BOLOGNESI, C., PERRONE, E., ROGGERI, P., PAMPANIN, D.M. & SCIUTTO, A. **Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions**. *Aquatic Toxicology*, 78S, S93-S98, 2006.
- BRITO, L. O.; LUZ, L. D. **Avaliação e monitoramento da qualidade das águas: usando análises moleculares**. *Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais*, v. 3, n. 2, p. 076-090, 2015.
- BROWNELL, CL. 1980. **Water quality requirements for first-feeding in marine fish larvae: ammonia, nitrite and nitrate**. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 44: 269-283
- BUSCHINI, A.; MARTINO, A.; GUSTAVINO, B.; MONFRINOTTI, M.; POLI, P.; ROSSI, C.; SANTORO, M.; DORR, A.J.M.; RIZZONI, M. **Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization**. *Mutation Research*, v. 557, p. 119-129, 2004.
- CARACO, N. F.; COLE, J. J.; STRAYER, D. L. **Top-down control from the bottom: Regulation of eutrophication in a large river by benthic grazing**. *Limnology and oceanography*, v. 51, p. 664-670,
- CARMICHAEL, W. W. **Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins**. A review. *Journal of Applied Bacteriology*. v.72, 445-459, 1992
- CARPENTER, S. R. **Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication**. *PNAS*, v. 105, n. 32, p. 11039-11040, 2008.
- CEBULSKA-WASILEWSKA, A. **Response to challenging dose of x-rays as a predictive assay for molecular epidemiology**. *Mutation Research*, 544: p. 289-297, 2003.
- CHEN, JC, CK CHIN & CK LEE. 1986. **Effects of ammonia and nitrite on larval development of the**

- shrimp *Penaeus monodon***. The First Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines 657-662.
- COSTA, C., OLIVI, P. **A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação**. Química Nova. 31 (7), p. 1820-1830, 2008.
- COUGHLAN, B.M., MORONEY, G.A., PELT, F.N.A.M. V., O'BRIEN, N.M., DAVENPORT, J., O'HALLORAN, J. **The effects of salinity on the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) using the neutral red retention assay with adapted physiological saline solutions**. Marine Pollution Bulletin, 2009.
- CURADO, A. L. et al. **Urban influence on the water quality of the Uberaba River basin: an ecotoxicological assessment**. Revista Ambiente & Água, v. 13, n. 1, 2018.
- ENRICH-PRAST, A. **Caminhos do nitrogênio em ecossistemas aquáticos continentais**. Pp. 209 - 227. In: F. Roland, D. Cesar & M. Marinho (eds). Lições de Limnologia. Rima, São Carlos, 2005.
- ESTEVES, F. A. (Org.) **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciencia, 2011.
- ESTEVES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. 2.ed Rio de Janeiro: Interciência, 1998.
- ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 1988.
- FISCHER B., POMATI F., EGGEN R. **The toxicity of chemical pollutants in dynamic natural systems: The challenge of integrating environmental factors and biological complexity**. Science of Total Environment 449, p. 253-259,
- FROMM, P. O.; GILLETTE, J. R. **Effect of ambient ammonia on blood ammonia and nitrogen excretion of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)**. Comparative Biochemistry and Physiology, Elsevier, v. 26, n. 3, p. 887-896, 1968.
- GOPALAKRISHNAN S, PANDEY N, TAMIZ AP, VERE J, CARRASCO R, SOMERVILLE R, TRIPATHI A, GINSKI M, PATERSON BM, ALKAN SS. **Mechanism of action of ZOT-derived peptide AT-1002, a tight junction regulator and absorption enhancer**. Int J Pharm. 2009
- GRAZEFFE, V. S. **Estabelecimento do teste do cometa em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) expostos à radiação gama (60 Co)**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências). São Paulo (Estado) Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças, 2009.
- GRECO, Y. TOR **Simple fluorescent pyrimidine analogues detect the presence of DNA abasic sites** J. Am. Chem. Soc., 2005.
- GROSS, A. **Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water**. Journal of the aquaculture society, 2004.
- H. ATAMNA, I. CHEUNG, B.N. AMES **A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000.
- H.A. DAHLMANN, V.G. VAIDYANATHAN, S.J. STURLA **Investigating the biochemical impact of DNA damage with structure-based probes: abasic sites, photodimers, alkylation adducts, and oxidative lesions** Biochemistry, 2009.
- HOWARTH, R.W. **Estimating atmospheric deposition in the northeastern United States: Relevance to Narragansett Bay**. In: Desbonnet, A., Costa-Pierce, B.A. (Eds.), Science for Ecosystem Based Management. Springer, NY, 2008.
- JHA A. N. **Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview**. Mutation Research, 2004.
- JOHANNESSEN, T.; DAHL, E. **Declines in oxygen concentrations along the Norwegian Skagerrak coast, 1927-1993: A signal of ecosystem changes due to eutrophication?** Limnology and Oceanography, 1996.

JOHNSTON, L. A.; YOSHINO, T. P. Analysis of lectin and snail plasma binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 1996.

JONES, R. A., KNOWLTON, M. K. **Limnology of Missouri reservoirs: An analysis of regional patterns**. Limnology Reservoirs: Research Management, 1993

K. KUBO, H. IDE, S.S. WALLACE, Y.W. KOW **A novel, sensitive, and specific assay for abasic sites the most commonly produced DNA lesion**. *Biochemistry*, 1992.

K. MIASKIEWICZ, R. OSMAN **Theoretical study on the deoxyribose radicals formed by hydrogen abstraction** *J. Am. Chem. Soc.*, 1994.

L.A. LOEB, B.D. PRESTON **Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites** *Ann. Rev. Genet.*, 1986.

LYNCH AM, SASAKI JC, ELESURU R, JACOBSON-KRAM D, THYBAUD V, DE BOECK M, AARDEMA MJ, AUBRECHT J, BENZ RD, DERTINGER SD, DOUGLAS GR, WHITE PA, ESCOBAR PA, FORNACE JR A, HONMA M, NAVEN RT, RUSLING JF, SCHIESTL RH, WALMSLEY RM, YAMAMURA E, VAN BENTHEM J, KIM JH. **New and emerging technologies for genetic toxicity testing**. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2011.

M. TANAKA, H. SONG, P.A. KUPFER, C.J. LEUMANN, W.E. SONNTAG **An assay for RNA oxidation induced abasic sites using the Aldehyde Reactive Probe** *Free Radic. Res.*, 2011.

M.J. LI, Y.P. WU, B.T. ZHANG, L.-H. GUO **Detection and application of DNA abasic sites** *Chin. J. Anal. Chem.*, 2013.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, C.; BIGNELL, J.; LOWE, D. **Lysosomal membrane stability in mussels**, *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, 2015.

MATRICON-GONDRAN, M.; LETOCART, M. **Internal Defenses of the Snail *Biomphalaria glabrata* II. Defense Cells Have Different Phagocytic Responses to Various Injected Foreign Materials**. *J Invertebr Pathol*, 1999.

N. KOJIMA, T. TAKEBAYASHI, A. MIKAMI, E. OHTSUKA, Y. KOMATSU **Construction of highly reactive probes for abasic site detection by introduction of an aromatic and a guanidine residue into an aminooxy group** *J. Am. Chem. Soc.*, 2009.

OSTRENSKY, A. **Estudos para viabilização tecnológica dos cultivos de camarões marinhos no litoral do Estado do Paraná, Brasil**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, 1997.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I. V.; VETMA, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. **Detection of micronuclei in hemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol**. *Mutation Research*, 2000.

RESSOM, R., SOONG, F.S., FITZGERALD, J., TURCZYNOWICZ, L., EL SAADI, O., RODER, D., MAYNARD, T. AND FALCONER, I. **Health Effects of Toxic Cyanobacteria (Blue-green Algae)**. National Health and Medical Council, The Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia, 1994.

ROCHA, F. C.; ANDRADE, E. M.; LOPES, F. B. **Water quality index calculated from biological, physical and chemical attributes**. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2015.

S. BOITEUX, M. GUILLET **Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*** *DNA Repair*, 2004.

S. NISHIZAWA, Y. SATO, N. TERAMAE **Recent progress in abasic site-binding small molecules for detecting single-base mutations in DNA** *Analytical Science*, 2014.

SANTOS, MHS, KF MIRANDA, LH POERSCH & WJ WASIELESKY. **Efeito agudo do nitrato sobre alevinos da tainha *Mugil platanus* (Pisces: Mugilidae)**. *Anais do Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de*

Camarões. 1993.

SHARP, J. H. **Estuarine oxygen dynamics: What can we learn about hypoxia from longtime records in the Delaware Estuary?** Limnology and Oceanography, 2010.

SHARPLEY, A.N. & HALVORSON, D.A. **The management of soil phosphorus availability and its impact on surface water quality.** In: LAL, R. & STEWART, B.A. Soil processes and water quality. Madison, American Society of Agronomy, 1994.

SHARPLEY, A.N. **Dependence of runoff phosphorus on extractable soil phosphorus.** Journal Environmental Quality, 1995.

SIU SYM, LAM PKS, MARTIN M, CALDWELL CA, RICHARDSON BJ. **The use of selected genotoxicity assays in green-lipped mussels (*Perna viridis*): A validation study in Hong Kong coastal waters.** Marine Pollution Bulletin, 2008.

SOUZA TS, FONTANELLI CS. **Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluents.** Mutation Research., 2006.

SPERLING, V. M. **Introdução a qualidade da água e ao tratamento de esgotos.** 3ed. Belo Horizonte. Departamento de engenharia sanitária e ambiental; universidade federal de Minas Gerais , 2005.

STAHL, R.G. **The genetic toxicology of organic compounds in natural Waters and wastewaters.** Ecotoxicology Environmental Safety, 1991.

T. LINDAHL, B. NYBERG **Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid.** Biochemistry, 1972.

TELLES, DIRCEU D' ALCKMIN et al, . **Ciclo Ambiental da Água: da chuva à gestão.** 1 ed. Blucher, São Paulo, 2013.

THURSTON, RV, RC RUSSO & CE SMITH. **Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat trout fry.** Transactions of the American Fisheries Society., 1978.

TOMASSO, J. R. **Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals.** Reviews in Fisheries Science, 1994.

TSAI & CHEN, SJ TSAI , JC CHEN **Toxicidade aguda de nitrato em juvenis de *Penaeus monodon* em diferentes níveis de salinidade** Aquicultura , 2002.

VAN DER OOST, R, BEYER, J AND VERMEULEN, N P. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review.** Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003.

VAN WIJNEN J, IVENS WP, KROEZE C, LÖHR AJ. **Coastal eutrophication in Europe caused by production of energy crops.** Science of the Total Environment 2015.

VAROL, M. **Temporal and spatial dynamics of nitrogen and phosphorus in surface water and sediments of a transboundary river located in the semi-arid region of Turkey.** Catena, 2013.

VENIER, P.; ZAMPIERON, C. **Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels from the Venice lagoon.** Environment International, 2005.

VON SPERLING, Marcos. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Lagoas de Estabilização,** v.03. Minas Gerais: ABES, 1996.

WETZEL, R. G. **Limnologia.** Tradução Maria José Boavida. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1993.

YU, J.-P.; HIRAYAMA, K. **The effect of un-ionized ammonia on the population growth of the rotifer in mass culture*** 1, 2. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1986.

ZENG G, ZHANG M, WANG P, LI X, WU P, SUN D. Genotoxicity effects of *Phanerochaete chrysosporium* against harmful algal bloom species by micronucleus test and comet assay. Chemosphere, 2019.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial tóxico de níveis de nitrogênio e fósforo característico de ambientes eutrofizados sobre o caramujo *Pomacea canaliculata*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o “estado de saúde”, a citotoxicidade e a genotóxicidade nos organismos expostos às variáveis isoladas (N e P) e associadas (N+ P), comparando as respostas dos diferentes tecidos estudados (borda do manto e glândula digestiva) para as diferentes análises.

3. HIPÓTESE

- Os níveis de nitrogênio e de fósforo de um ambiente eutrofizado gerarão danos genotóxicos e citotóxicos significativos em *Pomacea canaliculata*.
- A exposição às variáveis nitrogênio e fósforo isoladas e em conjunto gerarão genotoxicidade nos tecidos: Glândula digestiva e Borda do Manto.

CAPÍTULO 1

Análise do potencial tóxico de variáveis de ambiente eutrofizado em caramujos de água doce *Pomacea canaliculata*

Ingrid Pereira de Souza, Marta Marques de Souza, Simone Rutz Costa

(Manuscrito a ser submetido a revista Aquatic Ecology)

ABSTRACT

The enrichment of ecosystems by nutrients such as nitrogen and phosphorus is worrisome because it leads to possible deterioration, compromising the health status of the animal, by cytobiochemical and/or genotoxic alterations. The use of cytotoxicity analyses from the neutral red (VN) assay, allows the identification of cellular damage and toxic effects. For assessing the general health of organisms in aquatic ecosystems is the identification of changes in hemocyte function. And finally, the use of methods for the identification and quantification of DNA damage and potential chemicals that may cause this damage. Adverse effects of chemicals can be influenced by the complexity of the environment, and therefore an understanding of these mechanisms of toxicity and their interaction with different variables is indispensable. For the evaluation of ecological integrity several water quality biomonitoring programs use invertebrates, contact with the environment where they live can become a pathway of contamination, from the absorption of substances, through feeding, contact with water and sediment. For the experimental conditions, the animals were separated into 4 groups (CTR, N, F, and N+F) during the 96-hour period, using the hemolymph for hemocyte count and the digestive gland and mantle border tissues for cytotoxicity and DNA damage analyses (AP site). The results in the treatments with nitrogen (N) and nitrogen and phosphorus (N+F) for cytotoxicity (digestive gland) showed a significant decrease, whereas for DNA damage (mantle border) there was a significant increase, and the number of total hemocytes, only the treatment (N+F) showed a significant decrease compared to the control (CTR). Finally, this demonstrated that the nutrient nitrogen has a toxic potential on *P. canaliculata* snails, as well as the susceptibility of the tissues for the analyses used.

Keywords: genotoxicity; phosphor; illness; shellfish; cytotoxicity

1. Introdução

As interações entre fatores bióticos (bactérias, vegetais, animais, entre outros) e abióticos como características físico-químicas: pH, temperatura, nitrogênio e fósforo, estão ligados diretamente com o estado de saúde do ambiente (JAH, 2004). Os ecossistemas costeiros estão sob pressão ao aumento na entrada de nutrientes, o que reduz a qualidade da água e leva à eutrofização (VAN WIJNEN et al., 2015). O aumento de ações antrópicas muitas vezes contribui diretamente para o excesso de nutrientes nos corpos de água doce. Os despejos de esgotos domésticos não tratados, contaminantes agrícolas e industriais causam um aumento rápido na concentração de fósforo (P) e nitrogênio (N) na água, oriundos de detergentes e fertilizantes por exemplo.

O fósforo pode ser encontrado nos corpos d'água em diversas formas tais como fósforo particulado (orgânico e inorgânico) e fósforo dissolvido (orgânico e inorgânico) (SHARPLEY & HALVORSON, 1994; SHARPLEY, 1995). Apesar de não trazer prejuízos diretos, elevados índices de fósforo indicam fontes de poluição. Similarmente, o nitrogênio encontra-se nos corpos d'água nas formas de nitrogênio molecular, nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal (amônia) e nitrato e nitrito, sendo componente de proteínas e células de microorganismos (SPERLING, 2005).

O enriquecimento dos ecossistemas por estes nutrientes é preocupante, por acarretar possíveis deteriorações, como a mudança na composição de espécies, aumento da biomassa fitoplanctônicas, aumento da turbidez da água, diminuindo a entrada de luz nos corpos d'água e a redução do oxigênio no fundo (JOHANNESSEN & DAHL, 1996; SHARP, 2010; ALEXANDER et al., 2008). O nível de contaminação dos corpos de água constitui um fator limitante para os organismos que vivem nestes ecossistemas aquáticos, comprometendo a saúde do animal, por alterações citobioquímicas e genotóxicas (BRITO & LUZ, 2015; ARIAS et al., 2007).

Entretanto, estabelecer uma associação entre efeitos ecológicos gerados pela poluição e a saúde dos organismos é difícil (STAHL, 1991). Embora essas variáveis nitrogênio e fósforo, forneçam informações importantes sobre as condições da água, são incapazes de inferir dados sobre os efeitos biológicos causados (CURADO et al., 2018; GRAZEFFE, 2009; COSTA & OLIVI 2008). Alterações nas respostas biológicas, sejam moleculares, celulares ou fisiológicas, relacionadas à exposição a determinadas substâncias químicas ou efeitos tóxicos são denominados biomarcadores (VAN DER OOST et al., 2003). Os biomarcadores de

exposição indicam se o organismo foi exposto a substâncias químicas e poluentes (LYNCH et al., 2011). Já os biomarcadores de efeito são utilizados no monitoramento biológico da interação entre fatores ambientais, demonstrando efeitos adversos nos organismos (CEBULSKA-WASILEWSKA, 2003).

Um importante biomarcador de poluentes em ecossistemas aquáticos que faz uma avaliação da saúde geral dos organismos é a partir da análise das células da hemolinfa. Os hemócitos presentes na hemolinfa apresentam morfologia variável e desempenham um papel fundamental no transporte de metabólitos, reparo de conchas e sistema imunológico (GOPALAKRISHNAN et al.,; MATRICON-GONDRANO & LETOCART, 1999). Isto se deve pelo fato de que qualquer alteração no funcionamento dos hemócitos pode comprometer o estado de saúde do organismo. Os hemócitos circulantes desempenham um papel na imunidade inata e estão relacionados ao reconhecimento de agentes externos, resposta fagocitária e reações citotóxicas (JOHNSTON & YOSHINO, 2001). Para identificação de danos celulares, efeitos tóxicos, morte celular, proliferação celular e análises de citotoxicidade é utilizado o ensaio do vermelho neutro (VN). O vermelho neutro é um corante utilizado na histologia, que é absorvido por difusão através da membrana dos lisossomos. Entretanto, compostos que podem danificar as membranas dos lisossomos resultam na diminuição da retenção, sendo possível distinguir entre células danificadas ou mortas das células viáveis (CHEUNG et al., 1998; BRENNER et al., 2014)

Dentre várias lesões no DNA genômico, as formadas pela perda de uma nucleobase, conhecida como sítios apurínicos/apirimidínicos (Sítio AP), são formadas a partir da clivagem N-glicosídica, esta responsável pela ligação de uma base purina/pirimidina ao açúcar desoxirribose. Estas lesões são reparadas por endonucleases durante o processo de reparo por excisão de base (BER), entretanto alguns sítios AP podem não ser reparados e assim se tornarem mutações após o processo de replicação e transmissão do DNA, perpetuando ao longo das gerações (GRECO & TOR, 2005; LOEB & PRESTON 1986; LINDAHL & NYBERG 1972; BOITEUX & GUILLET 2004). Por isso a importância em desenvolver métodos para identificar e quantificar estes danos, assim como identificar o potencial de toxicidade genética de químicos que possam causar este tipo de dano no DNA.

Ocupando diferentes habitats, os invertebrados são bons modelos para a avaliação da integridade ecológica (GOULART & CALLISTO, 2003). Alguns organismos são muito sensíveis aos fatores que afetam o ecossistema, enquanto outros são tolerantes a estas perturbações (ALBERTONI & PALMA-SILVA, 2010). Os invertebrados possuem um

importante papel na reciclagem de nutrientes e na matéria orgânica, formando um elo entre os produtores e como alimentos para outros níveis tróficos (REECE & RICHARDSON, 1999). Assim, estes organismos são bastante utilizados em estudos de monitoramento ambiental devido à sua capacidade de acumular em seus tecidos diferentes elementos, como Pb e Zn, Hg, As e U descritos por (HAYES et al., 2015; VEGA et al., 2012).

A glândula digestiva tem diversas funções, como secreção de enzimas digestivas para digestão extracelular e intracelular, absorção de nutrientes, além de um papel importante na desintoxicação (DIMITRIADIS 2001; PONTE e MODICA 2017). Já o manto é o primeiro órgão que separa o meio externo do meio interno do organismo, sendo responsável pela regulação iônica do animal atuando principalmente no processo de formação de concha (SILLANPÄÄ; SUNDH; SUNDELL, 2018), podem ser importantes ferramentas para estudos de biomonitoramento ambiental .

A espécie *Pomacea canaliculata* (LAMARCK, 1822) é um molusco gastrópode endêmico da região tropical e subtropical da América do Sul (HAYES et al., 2015), sendo considerada invasora em regiões não endêmicas, e praga de cultivos de arroz em muitos países (BRITO& JOSHI, 2016). Estudos ecotoxicológicos sobre concentrações de metais pesados demonstram que os caracóis da maçã possuem o potencial de acumular concentrações desses metais nos tecidos. Assim em alguns casos existe uma correlação positiva entre a carga tecidual e a possíveis concentrações de tóxicos ambientais (HAYES et al., 2015).

Efeitos adversos dos agentes tóxicos podem ser influenciados pela complexidade do meio ambiente, e por isso é indispensável à compreensão destes mecanismos de toxicidade e de sua interação com diferentes variáveis (FISCHER et al., 2013). Neste sentido, cabe ressaltar a importância de estudos que identifiquem potenciais tóxicos em variáveis como nitrogênio e fósforo, assim como a utilização do caramujo *Pomacea canaliculata* em estudos de monitoramento ambiental.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultivo e Manutenção das desovas

Desovas dos gastrópodes foram obtidas de um único ponto no lago dos Biguás, localizado na Universidade Federal do Rio Grande -FURG (32° 04' 43'' S e 52° 10' 03'' W) Rio Grande, RS – Brasil. Os ovos foram armazenados em incubadora a 24,5 °C (ELETROlab®, Brasil), com fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro. Em aproximadamente 45 dias, os ovos que no momento da coleta eram rosados estavam completamente brancos. Após

a eclosão, os filhotes de caramujos foram transferidos para caixa plástica (45 x 30 x 30 cm) contendo 35 L de água desclorada. Após um mês da eclosão, os caramujos foram divididos em 4 aquários (30 x 20 x 15 cm) com 8 L de água desclorada a 22 °C e fotoperíodo e aeração constante. Os caramujos foram alimentados *ad libitum* com alface fresca a cada dois dias, assim como a renovação da água, que ocorria após alimentação. Os parâmetros de qualidade da água foram medidos com kits de aquarismo Alcon® a cada dois dias até que os caramujos atingissem o tamanho desejado para os experimentos. Após aproximadamente 80 dias, o comprimento da concha dos caramujos foi medido aleatoriamente e apresentaram um valor aproximado (~21 mm), considerado adequado para os ensaios de exposição.

2.2. Desenho Experimental e Amostragem

Os animais foram mantidos até alcançarem o estágio juvenil, aproximadamente (~21mm) para o início da exposição. Foram realizados 4 grupos experimentais. Os animais foram separados em grupos com $n = 8$ para cada tratamento, sendo um animal por recipiente (500 ml). Para as variáveis nitrogênio e fósforo foram utilizados os sais nitrato de sódio e fosfato de cálcio, respectivamente. Para a simulação do fósforo foi utilizado fosfato de cálcio (0,347g/L) e o nitrogênio foi utilizado nitrato de cálcio (0,512g/L), estas concentrações nominais foram usadas para a obtenção de condições hipereutróficas. No total foram três tratamentos e o controle de acordo com a **Figura 1**. No primeiro tratamento, contendo somente fosfato de cálcio representando a condição com alta concentração de fosfato, para o tratamento do nitrogênio foi utilizado somente nitrato de sódio, e por fim no tratamento de fósforo mais nitrogênio foi utilizado a mistura dos dois sais. No controle continha somente água desclorada (usada para o preparo das demais) e todos os tratamentos foram mantidos sob a mesma temperatura, fotoperíodo e aeração constante, os mesmos utilizados durante o cultivo dos animais. Após o período de exposição ($T = 96$ h) os animais foram crioadestesiados e retirados a hemolinfa e os tecidos: glândula digestiva e borda do manto

DESENHO EXPERIMENTAL



Figura 1. Desenho experimental: Esquema detalhado da exposição dos organismos aos tratamentos

2.3. Amostragem

Os animais foram crioanestesiados por 15 min e, com auxílio de uma seringa, foi perfurado o opérculo e retirada a cavidade pericárdica, para a coleta da hemolinfa. A mesma foi armazenada e mantida sobre o gelo até a fixação dos hemócitos para contagem. Na sequência foram retiradas a glândula digestiva e a borda do manto, que foram pesados e imediatamente submetidos à análise de citotoxicidade por vermelho neutro. Parte destes tecidos também foram armazenados a -20 °C para análises posteriores de genotoxicidade.

2.4. Análise das variáveis: Nitrogênio e Fósforo e Categorização do Ambiente

Foram coletadas amostras de água no início dos tratamentos (tempo 0h), e no final dos tratamentos (tempo 96h), e a quantificação de fósforo total foi feita a partir da digestão com persulfato de potássio e ácido sulfúrico, método colorimétrico do ácido ascórbico, e a do nitrogênio total, por digestão e titulação em meio ácido (Mackereth *et al.*, 1978).

2.5. Biomarcadores

2.5.1. Número de Hemócitos

Para a contagem do número de hemócitos foi utilizado 100 µl de hemolinfa de cada animal e acrescentado 400 µL de solução de fixação [Anticoagulante (em mM: 30 EDTA, 43

NaCl, 1,8 KCl, 10 HEPES, pH 7,6 CUETO et al., 2013) e formaldeído (0,5% em 1% CaCl₂); e as amostras foram refrigeradas até o momento das análises. Posteriormente com auxílio da câmara de Neubauer juntamente com o microscópio óptico (Microscópio Óptico O400S-OPTICAM) foi feita a contagem de número de células.

2.5.2. Citotoxicidade

Para verificar a viabilidade lisossomal após o período de 96 h, uma técnica conhecida como ensaio de citotoxicidade baseada na retenção de vermelho neutro foi realizada, de acordo com adaptação para amostras de tecido estabelecida por HAJ e Colaboradores (2019). Os tecidos frescos foram pesados e incubados em solução de vermelho neutro (400 µg/ml) durante um período de 2 h e após foram lavados em solução salina (solução anticoagulante) e fixados em formaldeído (0,5% em 1% CaCl₂) durante 1 h e posteriormente congelando as amostras. Finalizando com a extração do corante em álcool ácido (50% de álcool etílico – 1% de ácido acético), em temperatura ambiente, e a produção do homogeneizado, posteriormente à centrifugação, o sobrenadante analisado em espectrofotômetro de microplaca no comprimento de onda de 550 nm.

2.5.3. Extração do DNA e Sítio AP

O DNA dos tecidos foi extraído, em condições livres de DNase, pelo Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega; A1125) seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA total foi avaliada em um espectrofotômetro UV-VIS (Biodrop µLite, Analítica) a 260 e 280 nm. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

Os sítios abásicos (AP) foram detectados usando o *kit* de quantificação de danos ao DNA (BioVision; K253). As análises foram realizadas em triplicata. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O método é baseado na reação específica do reagente contido na sonda reativa de aldeído (ARP) com a forma de anel aberto dos sítios AP. O DNA genômico isolado foi tratado com reagente ARP e marcado com biotina. Os sítios apurínicos/apirimidínicos no DNA foram então quantificados usando um ensaio de avidina-biotina, seguido de detecção a 650 nm (leitor ELISA Synergy™ H1; BioTek). Os resultados foram apresentados como os sítios AP/ 10⁵ bp.

3. Análise Estatística

Foram calculadas a média e o desvio padrão ($X \pm SD$) dos resultados para apresentação

em gráficos e para análise estatística. As análises de citotoxicidade e do dano do DNA (sítio ap) foram feitas para cada tecidos (glândula digestiva e borda do manto) nos tratamentos. De acordo com a análise de interesse foi utilizado ANOVA de 1 fator e foram considerados os resultados estatisticamente significantes com $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4.4. Variáveis Nitrogênio e Fósforo e Categorização do Ambiente

Os dados qualitativos dos níveis de fósforo no tempo 0 h e após 96 h nos diferentes tratamentos (Figuras 2A e 2B). E os dados qualitativos das concentrações de níveis de nitrogênio no tempo 0 h e após 96 h nos diferentes tratamentos CTR, F, N, e N+F sugerem uma maior concentração de nitrogênio (Figuras 3A e 3B). Não foi utilizado análise estatística, pois foi utilizado uma amostra de água para o tempo 0h e uma para o tempo 96h.

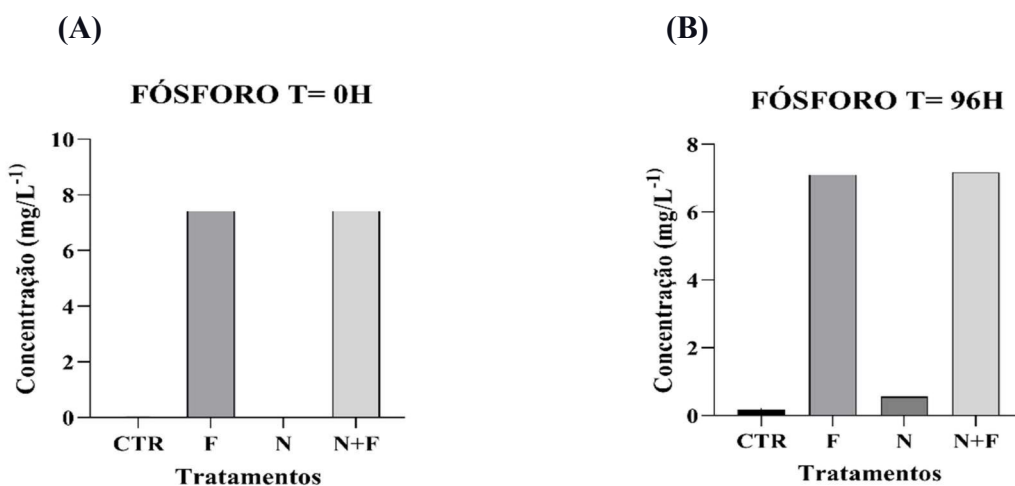


Figura 2. Níveis de fósforo (média) nos diferentes grupos experimentais observados no (A) tempo inicial (T=0h) e (B) no tempo final (T=96h).

(A) **(B)**

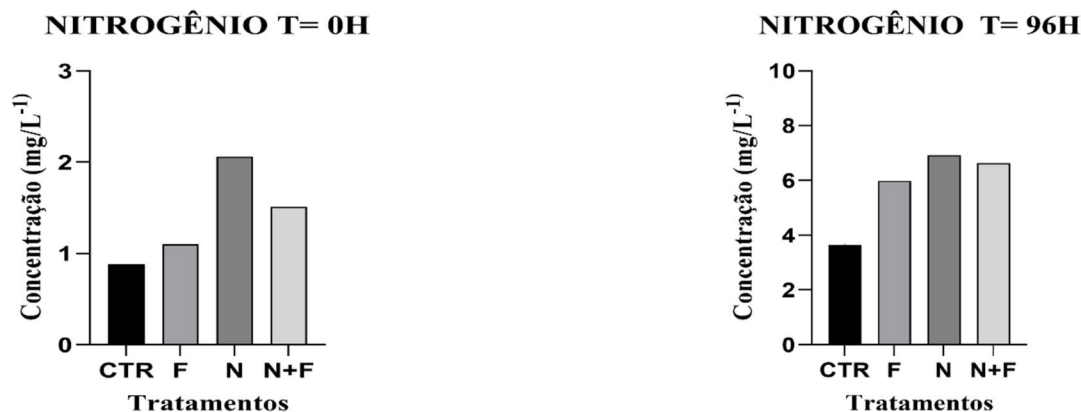


Figura 3. Níveis de nitrogênio (média) nos diferentes grupos experimentais no (A) tempo inicial (T= 0h) e (B) no tempo final (T=96h).

De acordo com a classificação de Wetzel (1983), as concentrações escolhidas para os tratamentos se enquadram em um grau de hipereutrofia.

4.5. Número total de hemócitos

Em relação a análise com a hemolinfa de gastrópodes, pode-se observar uma alteração significativa no número de hemócitos de acordo com os tratamentos. Os tratamentos (N) e (N+F) apresentaram uma diminuição significativa no número de hemócitos com relação ao controle (CTR), mas não apresentaram diferença ao tratamento (F). (**Figura 4**).

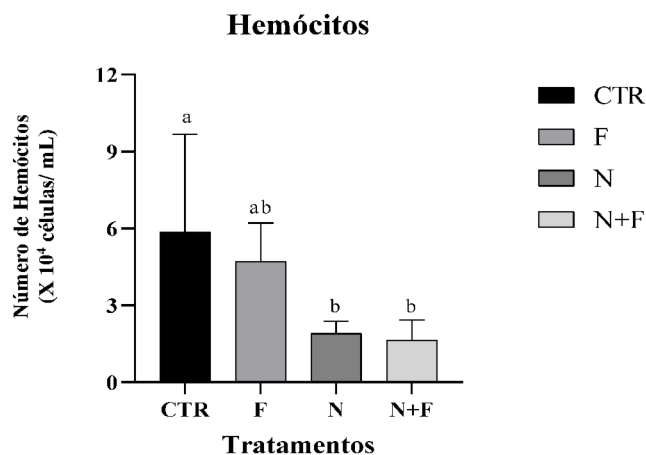


Figure 4. Número de hemócitos (média $\pm$ SD) na hemolinfa de *P. canaliculata* exposta apenas à água (CTR), a concentração de fosfato de cálcio (F), nitrato de sódio (N) e a de nitrato de sódio + fosfato de cálcio após 96 h de exposição. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos no tempo experimental avaliado ($p < 0,05$).

4.6. Citotoxicidade

A Figura 5A mostra que na glândula digestiva, o controle e o tratamento (F) foram

significativamente diferentes do tratamento (N+F) após 96h de exposição. No entanto, para borda do manto em todos os tratamentos, não houve diferença significativa (Figura 5B). A glândula digestiva apresentou diferença significativa em relação à borda do manto.

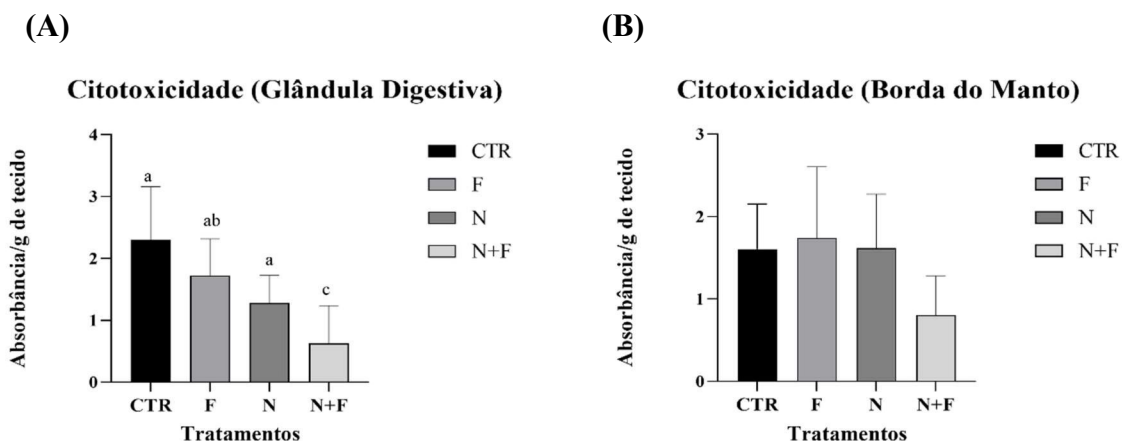


Figure 5 Citotoxicidade na glândula digestiva (A) e na borda do manto (B) (média ± SD) de gastrópodes *P. canaliculata* em diferentes grupos experimentais: controle (CTR), fosfato de cálcio (F), nitrato de sódio (N) e nitrato de sódio + fosfato de cálcio após 96 h de exposição. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

4.7. Dano no DNA/ Sítio AP

Na glândula digestiva não foram observadas diferenças significativas quanto ao dano de DNA (Figuras 6A). Já na borda do manto, a exposição dos gastrópodes aos diferentes tratamentos mostrou um valor significativamente maior de sítios AP, quando os animais foram expostos ao nitrato de sódio e ao fosfato de cálcio (N+P), de maneira combinada, após 96 h de exposição (Figuras 6B).

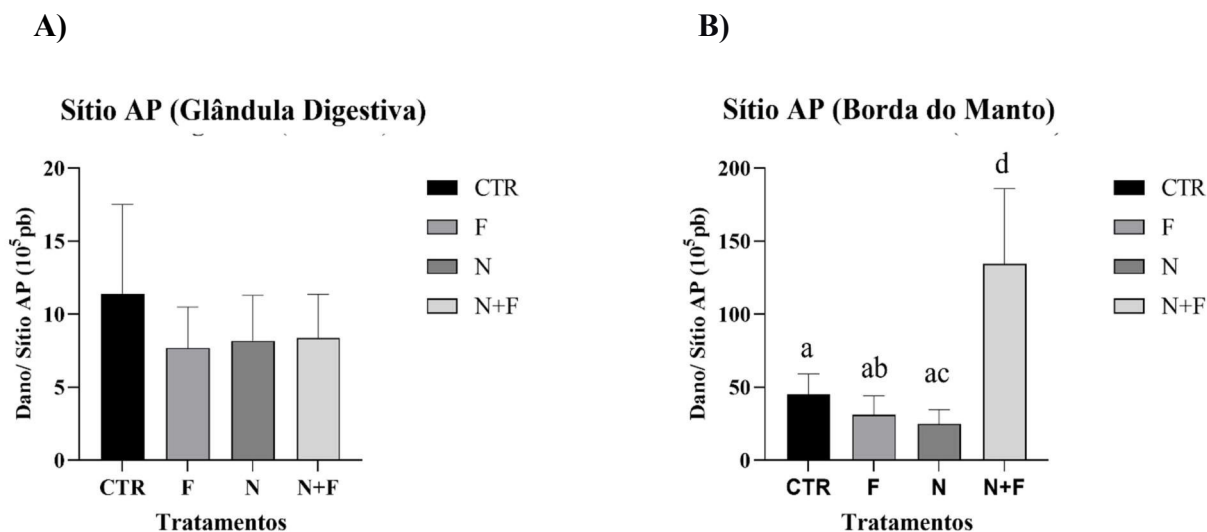


Figure 6. Danos de DNA relacionados à análise de sítios AP na (A) glândula digestiva e (B) na borda

do manto de *P. canaliculata* nos diferentes grupos experimentais: controle (CTR), fosfato de cálcio (F), nitrato de sódio (N) e nitrato de sódio + fosfato de cálcio (N+F) após 96 h. As letras (a, b, c e d) indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

5. Discussão

Nos últimos anos, a utilização de biomarcadores de citotoxicidade, danos no DNA e investigações de células específicas, como os hemócitos, têm se mostrado promissores na constatação de efeitos tóxicos, especialmente envolvendo contaminantes e poluentes nitrogenados. Nesse sentido, a avaliação da contagem do número de hemócitos totais (CHT) pode fornecer informações a respeito do estado de saúde de invertebrados, bem como, avaliar os possíveis efeitos sob condições estressantes (SÁNCHEZ et al., 2001; WINZER 2005). Considerando o papel destas células no sistema imune (reconhecimento e respostas fagocitárias) e os demais resultados, as alterações observadas no presente estudo podem sugerir uma avaliação geral da saúde dos organismos (gastrópodes).

A diminuição do número total de hemócitos em dois tratamentos (N e N+F), com alta concentração de nitrogênio, indica que tal enriquecimento da água pode ser prejudicial a *P. canaliculata*. A pesquisa de SÁNCHEZ e colaboradores (2001) investigou alterações na hemolinfa do camarão branco, *Litopenaeus setiferus*, sob o período de aclimação em laboratório. Os autores afirmam que o “estresse de cativeiro”, associado a mudanças de água e alimentação, causaram diminuição na CHT. Por outro lado, alterações nos parâmetros de qualidade da água, como a presença de poluentes, e mudanças na concentração natural de compostos nitrogenados, podem tornar organismos aquáticos mais suscetíveis a doenças (CHENG & CHEN, 2000; LE MOUILLAC, 2000).

O trabalho de CHENG & CHEN, (2002) também suporta essa informação sobre os possíveis efeitos tóxicos de formas nitrogenadas, associadas às alterações no meio, como pH, temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido. A pesquisa relatou diminuição das respostas imunológicas (também associadas aos hemócitos) do lagostim de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, afirmando que a diminuição observada foi resultante da condição da água, na qual os organismos foram expostos. Assim nossos resultados com *P. canaliculata* indicam uma redução no estado geral de saúde dos gastrópodes submetidos às condições (N) e (N+F).

Sabe-se que a glândula digestiva dos invertebrados, além da função digestiva, está fortemente ligada aos processos de detoxificação e esta envolvida com respostas ao estresse oxidativo, o que a torna um bom caminho de acesso à saúde dos animais. Assim, ao combinar

os resultados, da integridade lisossomal (através do método do vermelho neutro), neste tecido, indicou que a presença de N e N+F, nos tratamentos, resultou em citotoxicidade, considerando a menor retenção do corante nos lisossomos (consequência de danos na membrana).

Vale destacar que a composição química da água é essencial para definir o estado de saúde dos organismos aquáticos. Altas concentrações de compostos dissolvidos, ainda que naturais, podem causar alterações sérias nos organismos expostos. O estudo desenvolvido por MOORE & BRINGOLF, 2020 ilustra alguns efeitos da química da água, especialmente sobre a toxicidade de nitrato em larvas dos peixes dulcícolas *Promelas pimephales*. Os autores utilizaram larvas de *Promelas pimephales*, *Cyprinella trichoristia* e *Oreochromis ssp.*, no intuito de investigar se alterações na concentração de nitrato, associadas a distintos graus de dureza da água, interferem na sobrevivência larval. As concentrações letais de nitrato variaram de 228 à 1725 mg/L e os experimentos duraram por 7 dias. Os resultados revelaram que larvas de *P. pimephales* foram mais sensíveis ao nitrato em águas mais duras, enquanto *C. trichoristia* foram mais sensíveis em água mole, e *Oreochromis ssp.* foi a espécie menos sensível, independente da dureza da água.

De tal maneira, conclui-se que graus distintos de dureza da água influenciam na sensibilidade de larvas de peixes ao nitrato, ressaltando a importância da concentração de nutrientes dissolvidos para organismos aquáticos. Em nossos dados, houve a utilização apenas de uma espécie de gastrópode, mas que aparentemente apresentou uma alta sensibilidade, nos tratamentos que continham nitrogênio ou a associação deste com o fósforo. Por outro lado, alguns trabalhos relatam a dificuldade em definir a toxicidade do fosfato (PO_4^{3-}) para organismos aquáticos, pois a interação com outros compostos pode interferir em sua toxicidade (FISHER et al., 1991). Utilizando o peixe *Oryzias latipes* e o microcrustáceo *D. magna*, KIM et al., (2013) não conseguiu definir a toxicidade do (PO_4^{3-}) usando os sais CaHPO_4 e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fonte de fosfato, porém quando o fosfato interage com o sódio, aparenta ser menos tóxico do que as demais variações, uma vez que foram encontrados valores de toxicidade iguais a 3580 mg/L para *D. magna* e 720 mg/L para o do peixe-mosquito, *Gambusia affinis*, em exposições de 48 h.

Já em relação ao nitrogênio, suas formas possuem diferentes valores de toxicidade, porém o nitrato é considerado o composto com menor poder tóxico para organismos aquáticos quando comparado às formas de amônia (NH_3) ou amônio (NH_4^+) (WASIELESKY, 2000). Segundo ROMANO & ZENG (2007b) a toxicidade do nitrato é maximizada na presença de potássio. Ao comparar a sensibilidade do caranguejo *Scylla serrata* e do siri *Portunus pelagicus* ao NaNO_3 (nitrato de sódio) sozinho e em uma mistura desta substância com o KCl,

os valores de concentração letal foram menores na mistura do que na substância de nitrato de sódio somente com água de diluição.

Conforme apresentado anteriormente, a escolha de sais que representem o enriquecimento de nutrientes (N e F) na água ainda é difícil. Ainda sim apresentamos os valores de fósforo: 0,347g/L e nitrogênio: 0,512g/L que classificam o ambiente em hipereutrofico, sendo assim um ambiente com excesso de nutrientes. Neste trabalho a utilização de nitrato de sódio (NaNO_3) e fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) foi baseada em LAMBRECHT, et al., (2019). No entanto, os resultados indicam que as formas nitrogenadas possuem um potencial tóxico, contribuindo para a diminuição no número de hemócitos o que reflete nas respostas imunológicas dos organismos aquáticos, assim como a citotoxicidade afetando a membrana dos lisossomos a partir do ensaio do vermelho neutro.

No estudo envolvendo o mexilhão zebra *Dreissena polymorpha* e a amêijoia-asiática *Corbicula fluminea*, FISHER e colaboradores (1991) apresentaram valores de toxicidade distintos para esses organismos, onde a concentração letal encontrada para *D. polymorpha* foi igual a 92 mg/L e para *C. fluminea* não foi possível encontrar mortalidade para concentrações até 2000 mg/L de KH_2PO_4 (fosfato de potássio) em 24 h de exposição.

No mesmo sentido, REISH (1970) trabalhou com a tolerância de poliquetas das espécies *Nereis grubei*, *Neanthes arenaceodentata*, *Dorvillea articulata* e *Capitella capitata* ao fosfato, usando a substância KH_2PO_4 como fonte de fosfato e obteve valores médios de tolerância iguais a 0,920 mg/L, 1,900 mg/L, 2,100 mg/L e 2,400 mg/L, respectivamente, e observada mortalidade para as 3 primeiras espécies nas concentrações de 0,9 mg/L e para a última de 1,2 mg/L. Esses dados mostram que a toxicidade da substância tende a aumentar em função do tempo de exposição. Contudo, em nossos resultados o sal que utilizamos para a representação do fosfato (CaPO_3) não trouxe prejuízos celulares, moleculares ou diminuição do número de hemócitos para os moluscos. Sugerindo que a *P. canaliculata* são organismos resistentes à toxicidade do fosfato como relatado nos estudos, e/ou ao sódio da composição do sal, haja diminuindo a toxicidade do fosfato.

A utilização de análises de genotoxicidade são importantes ferramentas para biomonitoramento ambiental. O ensaio cometa utilizado no estudo de LEMOS et al., (2005) ajudou a conduzir uma avaliação ambiental de um lago, localizado na região metropolitana de Londrina-PR, resultando na presença de agentes genotóxicos no ambiente. Vários autores têm demonstrado a susceptibilidade de peixes *Geophagus spp.* aos efeitos genotóxicos (aumento na frequência de micronúcleos, índice de danos no DNA) e danos teciduais em brânquias e fígado quando expostos a poluição aquática por metais pesados (DORIA et al., 2017; GOMES

et al. 2019). Altas concentrações de metais, podem ter um efeito negativo sobre a biota, e o mesmo se aplica para concentrações de nitrogênio estando relacionados também a indução de metemoglobinemia e formação de nitrosaminas carcinogênicas (OLIVEIRA & SOUZA, 2015).

Lesões detectadas pelo ensaio cometa, como quebras de cadeias podem resultar na formação de aberrações cromossômicas e ainda em modificações no DNA, como a formação de sítio abásicos (sítios AP), induzindo a possíveis mutações genéticas. Entretanto, é importante ressaltar que estas lesões podem ser reparadas sem resultar em possíveis alterações genéticas permanentes (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

Estes caramujos foram propostos como bioindicadores de qualidade de água porém é de extrema importância saber a capacidade do animal de bioconcentrar e sua capacidade de reter um determinado elemento tóxico nos tecidos (VEGA et al., 2012). Alguns estudos relatam a toxicidade de metais e pesticidas utilizando a *Pomacea canaliculata* e estes apresentaram sensibilidade aos compostos (SAWASDEE & KÖHLER, 2009), tornando os organismos potenciais para ensaios de ecotoxicologia. Dom, 2013 descreveu que a toxicidade do cobre em *Pomacea spp*, pode depender da idade do animal e de parâmetros de qualidade de água, já (PEÑA & POCSIDIO, 2007) observou que em *Pomacea canaliculata* adulta a alimentação e o crescimento tem relação com o tempo de exposição e da concentração do composto.

Assim, os estudos apresentados até aqui, corroboram com os resultados deste trabalho, indicando o potencial tóxico do nitrogênio, englobando análises citotóxicas, genotóxicas e também no número total de hemócitos, o que permite acessar, de modo geral, a saúde dos organismos. Evidenciando, ainda, a possível influência do enriquecimento da água por nutrientes no estabelecimento de danos celulares e ou genéticos, demonstrando que a presença, especialmente de formas nitrogenadas, podem causar condições de estresse aos organismos. Em contrapartida, ainda há uma escassez de trabalhos que apontam nutrientes como possíveis tóxicos, sendo uma ferramenta de extrema importância para o biomonitoramento ambiental.

Para a simulação do nitrogênio e do fósforo, a partir da utilização dos sais (nitrato de sódio e fosfato de cálcio) observamos que houve uma diminuição no número de hemócitos (imunidade inata) nos tratamentos (N) e (N+F), já com relação ao tratamento (F) não teve nenhuma alteração. Os nossos resultados referentes ao ensaio de citotoxicidade, utilizando o vermelho neutro nos mostrou que há uma suscetibilidade a toxicidade que depende do tecido, no nosso caso a glândula digestiva apresentou um número menor de células viáveis com relação a borda do manto que não houve diferença significativa, lembrando ainda, que estes resultados

foram para os tratamentos (N) e (N+F), e nos tratamentos (F) não houve diferença. Já com relação ao dano no dna a partir dos sítios abásicos, os resultados foram distintos com relação ao de citotoxicidade e com o número de hemócitos, apresentando um número maior de Sítios APs no tratamento (N+F).

6. Conclusão

De modo geral, verificamos os efeitos dos nutrientes isolados e combinados, e se os mesmos apresentam algum potencial tóxico, sobre os caramujos de água doce *Pomacea canaliculata*. No primeiro ensaio, a avaliação do número de hemócitos apresentou uma diminuição nos tratamentos somente com nitrogênio e em sua combinação com o fósforo e com relação ao tratamento somente com fósforo não houve alteração com relação ao controle, indicando que o nutriente nitrogênio apresenta um grau de potencial tóxico. No segundo ensaio, verificou-se a integridade lisossomal utilizando dois tecidos: glândula digestiva e a borda do manto, e observamos uma maior suscetibilidade da glândula digestiva em relação aos tratamentos que continham nitrogênio. Ainda, analisamos com o terceiro ensaio utilizando uma técnica para a identificação de formações de sítios abásicos que podem ser formados por agentes internos e/ou externos ao DNA, identificando um maior número destes sítios no tratamento que continha tanto o nitrogênio quanto o fósforo.

Por fim, os resultados demonstram que o nutriente nitrogênio tem um potencial tóxico sobre os caramujos *P. canaliculata*, assim como a suscetibilidade dos tecidos para este, porém a literatura ainda é escassa em relação dos efeitos destes nutrientes sobre as espécies de água doce bem como gastrópodes. Nesse sentido, o presente trabalho contribui com informações relevantes a respeito das variáveis responsáveis pelo processo de eutrofização, e abrem precedentes para futuras pesquisas que aprofundem o entendimento não só destas variáveis mas também nas especificidades da espécie *P. canaliculata*.

7. Agradecimentos

Agradecemos a Universidade Federal do Rio Grande pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho. E um agradecimento especial ao Luiz Gustavo pelo suporte com o manejo dos animais. Ao técnico da botânica Pablo Guimarães pela ajuda com os cálculos, e aos técnicos da limnologia Cláudio Trindade e Clara Lima pelo auxílio prestado nas análises na químicas. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

8. Referências

- ALBERTONI, E.F.; PALMA-SILVA, C. **Caracterização e importância dos invertebrados de água continentais com ênfase nos ambientes de Rio Grande**. Caderno de Ecologia Aquática, Rio Grande, 2010.
- ALEXANDER, R. B.; SMITH, R. A.; SCHWARZ, G. E.; BOYER, E. W.; NOLAN, J. V. & BRAKEBILL, J. W. **Differences in Phosphorus and Nitrogen Delivery to The Gulf of Mexico from the Mississippi River Basin**. Environmental Science and Technology, 2008.
- ARAÚJO, THAÍS & BRIGHENTI, LUDMILA & SANTOS, HÉLIO & CASTRO, ANA & THOMÉ, RALPH. **Toxicidade de compostos nitrogenados em peixes influenciada por parâmetros físico-químicos da água: uma revisão narrativa**. Research, Society and Development, 2021.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos**. Ciência e Saúde Coletiva, 2007.
- BRENDLER-SCHWAAB S, HARTMANN A, PFUHLER S, SPEIT G. **The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing**. Mutagenesis, 2005.
- BRITO, FABIANO & JOSHI, RAVINDRA. **The Golden Apple Snail Pomacea Canaliculata: a Review on Invasion, Dispersion and Control**. Outlooks on Pest Management, 2016.
- BRITO, L. O.; LUZ, L. D. **Avaliação e monitoramento da qualidade das águas: usando análises moleculares**. Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais, 2015
- CEBULSKA-WASILEWSKA, A. **Response to challenging dose of x-rays as a predictive assay for molecular epidemiology**. Mutation Research, 2003.
- COSTA, C., OLIVI, P. **A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação**. Química Nova, 2008.
- CURADO, A. L. ET AL. **Urban influence on the water quality of the Uberaba River basin: an ecotoxicological assessment**. Revista Ambiente & Água, 2018.
- DORIA, H. B.; VOIGT, C. L.; CAMPOS, S. X.; RANDI, M. A. F. **Metal pollution assessment in a Brazilian hydroelectric reservoir: Geophagus brasiliensis as a suitable bioindicator organismo**. Revista Ambiente & Água, 2017.
- ESTEVES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. 2.ed Rio de Janeiro: Interciência, 1998.
- FISCHER B., POMATI F., EGGEN R. **The toxicity of chemical pollutants in dynamic natural systems: The challenge of integrating environmental factors and biological complexity**. Science of Total Environment, 2013.
- GOMES, L.C., CHIPARI-GOMES, A. R., MIRANDA, T. O., PEREIRA, T. M., MERÇON, J., DAVEL, V.C., BARBOSA, B. V., PEREIRA, A. C. H., FROSSARD, A., RAMOS, J. P. L. **Genotoxicity effect in Geophagus brasiliensis fish exposed to Doce River after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil**. Brazilian Journal of Biology. 2019.
- GOPALAKRISHNAN S, PANDEY N, TAMIZ AP, VERE J, CARRASCO R, SOMERVILLE R, TRIPATHI A, GINSKI M, PATERSON BM, ALKAN SS. **Mechanism of action of ZOT-derived peptide AT-1002, a tight junction regulator and absorption enhancer**. International Journal of Pharmaceutics , 2009.

GOULART, M.D., CALLISTO, M. **Bioindicadores de Qualidade de Água como Ferramenta em Estudos de Impacto Ambiental** Revista da FAPAM , 2003.

GRAZEFFE, V. S. **Estabelecimento do teste do cometa em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) expostos à radiação gama (60 Co). Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências).** São Paulo (Estado) Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças, 2009.

GRECO, Y. TOR **Simple fluorescent pyrimidine analogues detect the presence of DNA abasic sites.** Jornal of the American Chemical, 2005.

HAYES, KENNETH & BURKS, ROMI & CASTRO-VAZQUEZ, ALFREDO & DARBY, PHILIP & HERAS, HORACIO & MARTÍN, PABLO & QIU, JIAN-WEN & THIENGO, SILVANA & VEGA, ISRAEL & WADA, TAKASHI & YUSA, YOICHI & BURELA, SILVANA & CADIerno, MARÍA & CUETO, JUAN & DELLAGNOLA, FEDERICO & DREON, MARCOS & FRASSA, M. & GIRAUD BILLOUD, MAXIMILIANO & GODOY, MARTÍN & COWIE, ROBERT. **Insights from an Integrated View of the Biology of Apple Snails (Caenogastropoda: Ampullariidae).** Malacologia, 2015.

JHA A. N. **Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview.** Mutation Research, 2004.

JOHANNESSEN, T.; DAHL, E. **Declines in oxygen concentrations along the Norwegian Skagerrak coast, 1927-1993: A signal of ecosystem changes due to eutrophication?** Limnology and Oceanography, 1996.

JOHNSTON, LAURA & YOSHINO, TIMOTHY. **Larval *Schistosoma Mansoni* Excretory–Secretory Glycoproteins (ESPs) Bind to Hemocytes of *Biomphalaria Glabrata* (GASTROPODA) Via Surface Carbohydrate Binding Receptors.** The Journal of parasitology, 2001.

L.A. LOEB, B.D. PRESTON **Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites** Annual Review of Genetics, 1986.

LYNCH AM, SASAKI JC, ELESURU R, JACOBSON-KRAM D, THYBAUD V, DE BOECK M, AARDEMA MJ, AUBRECHT J, BENZ RD, DERTINGER SD, DOUGLAS GR, WHITE PA, ESCOBAR PA, FORNACE JR A, HONMA M, NAVEN RT, RUSLING JF, SCHIESTL RH, WALMSLEY RM, YAMAMURA E, VAN BENTHEM J, KIM JH. **New and emerging technologies for genetic toxicity testing.** Environmental and Molecular Mutagenesis, 2011.

MATRICON-GONDRAN, M.; LETOCART, M. **Internal Defenses of the Snail *Biomphalaria glabrata* II. Defense Cells Have Different Phagocytic Responses to Various Injected Foreign Materials.** J Invertebr Pathol, 1999.

MOORE, A. P., & BRINGOLF, R. B. **Comparative Toxicity of Nitrate to Common and Imperiled Freshwater Mussel Glochidia and Larval Fishes.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2020.

OLIVEIRA, K. G.; SOUZA, L. D. **Alteração das concentrações de nitrogênio e fosforo na bacia do rio Apodi-Mossoró em função dos efeitos da estiagem e espacialidade.** Blucher Chemistry Proceedings, 2015.

PEÑA, S. C. & G. N. POCSIDIO. **Influence of copper on the feeding rate, growth and reproduction of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata* Lamarck.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2007.

REECE, P.F. & RICHARDSON, J.S. **Biomonitoring with the reference condition approach for the detection of aquatic ecosystems at risk.** In: L. M. Darling (ed.) Proc. Biology and Management of Species and Habitats at Risk, 1999.

REISH, D. L. **The effects of varying concentrations of nutrient, chlorinity, and dissolved oxygen on polychaetous annelids.** Water Research, 1970.

- ROMANO, N.; ZENG, C. **Effects of potassium on nitrate mediated alterations of osmoregulation in marine crabs.** Aquatic Toxicology, 2007b.
- S. BOITEUX, M. GUILLET **Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*** DNA Repair, 2004.
- SHARP, J. H. **Estuarine oxygen dynamics: What can we learn about hypoxia from longtime records in the Delaware Estuary?** Limnology and Oceanography, 2010.
- SHARPLEY, A.N. & HALVORSON, D.A. **The management of soil phosphorus availability and its impact on surface water quality.** In: LAL, R. & STEWART, B.A. Soil processes and water quality. Madison, American Society of Agronomy, 1994.
- SHARPLEY, A.N. **Dependence of runoff phosphorus on extractable soil phosphorus.** Journal of Environmental Quality, 1995.
- SPERLING, V. M. **Introdução a qualidade da água e ao tratamento de esgotos.** 3ed. Belo Horizonte. Departamento de engenharia sanitária e ambiental; universidade federal de Minas Gerais, 2005.
- STAHL, R.G. **The genetic toxicology of organic compounds in natural Waters and wastewaters.** Ecotoxicol Environmental Safety, 1991.
- T. LINDAHL, B. NYBERG **Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid** Biochemistry, 1972.
- TAVARES, DA, LAMBRECHT, RW, DE ALMEIDA CASTILHO, MC, HENRY, R., & FERRAGUT, C. **Respostas epipelônicas ao enriquecimento de N e P e as relações com fitoplâncton e zooplâncton em um reservatório mesotrófico.** Aquatic Ecology, 2019.
- TELLES, DIRCEU D'; ALCKMIN et al, . **Ciclo Ambiental da Água: da chuva à gestão.** 1 ed. Blucher, São Paulo, 2013.
- VAN DER OOST, R, BEYER, J & VERMEULEN, N P. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review.** Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003.
- VEGA, I.A., ARRIBÉRE, M.A., ALMONACID, A.V., GUEVARA, S.R., CASTRO-VAZQUEZ, A., **Apple snails and their endosymbionts bioconcentrate heavy metals and uranium from contaminated drinking water.** Environmental Science and Pollution Research, 2012a.
- SAWASDEE, B. & H.-R. KÖHLER. **Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia).** Chemosphere, 2009.
- WASIELESKY, WJ. **Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: efeitos dos parâmetros ambientais.** Tese de doutorado. Fundação Universidade Federal de Rio Grande, 2000.