

Título do produto técnico: Protocolo de bioensaio utilizando o mexilhão-dourado (espécie *Limnoperna fortunei*) para avaliação da citogenotoxicidade de compostos e amostras ambientais

Curso: Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Linha de Pesquisa: Toxicologia Experimental

Autores: Andressa Bernardi e Luciano Basso da Silva

Pesquisador responsável: Luciano Basso da Silva

Ano: 2024

- 1) As colônias de indivíduos adultos de *Limnoperna fortunei* (Figura 1) foram coletadas manualmente em local com baixo índice de poluição (Lago Guaíba, Praia do Lami, cidade de Porto Alegre). Os mexilhões foram transferidos para o laboratório em recipientes plásticos contendo água do lago.



Figura 1. Colônia de *Limnoperna fortunei* aderida a um tronco. Fonte: Laboratório de Citogenética Animal -

Feevale (2024).

- 2) No laboratório, os animais foram cuidadosamente separados e suas conchas foram suavemente escovadas com água da torneira para remover o biofilme aderido.
- 3) Os animais foram transferidos para um aquário contendo 3 L de água da torneira de clorada e aeração constante. Para a aclimação, os animais permanecerem por sete dias em sala com temperatura controlada (21 ± 1 °C) e fotoperíodo natural. Os animais não foram alimentados.
- 4) Após o período de aclimação, os animais são expostos às soluções-teste (ou amostras ambientais). Devem ser preparadas, pelo menos, três concentrações diferentes da substância/composto a ser testado.
- 5) A exposição pode ocorrer em baldes ou frascos de vidro (Becker), contendo de 1 L a 2 L da solução teste (diluída em água da torneira de clorada). Para cada tratamento (incluindo o controle negativo, água usada para a diluição) são expostos 15 animais (com aeração constante, temperatura controlada e fotoperíodo natural). A exposição ocorre durante sete dias. Os animais não são alimentados durante o período de exposição.
- 6) Após a exposição é feita a coleta de hemolinfa e preparação da lâmina. Inicialmente, deve ser preparada uma solução fixadora (etanol:ácido acético, na proporção 3:1). Para a coleta deve ser utilizada uma seringa para insulina (1 mL) contendo aproximadamente 100 µL de solução fixadora. A conchas devem ser abertas com auxílio de pinças e a punção deve ser realizada na região do músculo adutor do animal.
- 7) Após a coleta da hemolinfa, a amostra é despejada na extremidade de uma lâmina de citologia e realizado esfregaço do material. As lâminas devem ficar secando em posição horizontal durante 24 h.
- 8) Após a secagem, as lâminas são imersas em etanol absoluto por 10 min e, após este período, são retiradas e deixadas para secagem durante 24h.
- 9) A coloração é realizada com o corante Giemsa a 10% durante 10 min, seguida de lavagem em água corrente da torneira e finalizado com água destilada e secagem por 24h.

- 10) A análise das lâminas é realizada em microscópio óptico com aumento de 1.000X. São analisadas 1.000 hemócitos por animal, sendo contabilizado o número de células normais, binucleadas, contendo broto ou micronúcleo ou com necrose (Figura 2).
- 11) As frequências de cada alteração devem ser comparadas estatisticamente com o grupo controle.

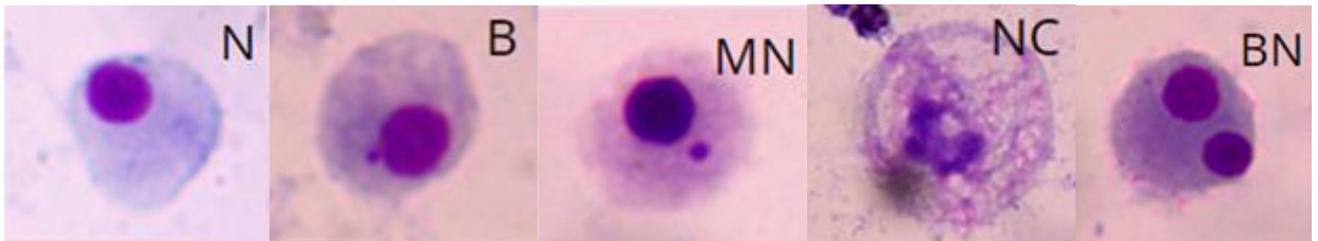


Figura 2: Hemócitos de mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*), com núcleo no formato normal (N) e anormalidades nucleares: broto (B), micronúcleo (MN), Necrose (NC), célula binucleada (BN). Fonte: Laboratório de Citogenética Animal - Feevale (2024)