EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO MERCÚRIO EM *MACROBRACHIUM AMAZONICUM* SOB INFLUÊNCIA DO PH E DO CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO: AVALIAÇÃO GENOTÓXICA EM ÁGUAS PRETAS AMAZÔNICAS

ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF MERCURY IN *MACROBRACHIUM AMAZONICUM* UNDER THE INFLUENCE OF PH AND DISSOLVED ORGANIC CARBON: GENOTOXIC ASSESSMENT IN AMAZONIAN BLACKWATER

Giulia M. De Prá[1], Thamiris S. Gomes[1], Ana Beatriz F. B. Santos[1], Wilton R.D.S. Santos[1], Bruna C.C. Batista[1], Gabriela P. Marinsek[1, 3], Renata de Britto Mari[3], Susana Braz-Mota[2], Adalberto Luis Val[2], Helen Sadauskas-Henrique[1]

[1.] Universidade Santa Cecília, Laboratório de Ecofisiologia e Bioquímica de Organismos Aquáticos (LEBIO) – Santos, SP
[2.] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) – Manaus, AM
[3.] Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista (IB-CLP) – São Vicente, SP

E-mail: giu.maneira@gmail.com

Resumo **-** *A contaminação por mercúrio em rios de águas pretas amazônicos, como o Rio Negro, rico em carbono orgânico dissolvido (COD), é uma ameaça ambiental pela toxicidade e bioacumulação desse metal. Este estudo avaliou os efeitos da exposição de curto prazo (24 h) do camarão amazônico Macrobrachium amazonicum (n = 10; peso: 0,12 ± 0,002 g; comprimento: 5,4 ± 0,13 cm) ao $HgCl_2$ (220 ng L^{-1}, limite permitido CONAMA 357/2005) em quatro condições experimentais (pH 7, pH 7 + COD, pH 4 e pH 4 + COD). A concentração do mercúrio total foi medida na água e no músculo dos camarões. Foram realizadas análises da peroxidação lipídica (LPO) e danos em DNA. A presença do COD aumentou a permanência do mercúrio na água (independente do pH), no entanto, sem efeitos bioacumulativos no músculo (0,0013 ± 0,000095 mg kg^{-1}). A análise dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) no hepatopâncreas não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (P = 0,359). Por outro lado, a avaliação dos danos no DNA mostrou diferenças significativas entre os grupos em relação aos controles (P < 0,001). Mesmo no limite legal, o $HgCl_2$ causou*

danos ao DNA em M. amazonicum em 24 h de exposição, sem aumento de LPO e bioacumulação muscular. Em conjunto, os achados apontam efeito subletal relevante, com possível prejuízo às defesas do organismo, e mostram que a toxicidade do mercúrio é modulada pelos próprios componentes naturais da água do Rio Negro.

Palavras-chave: Mercúrio; *Macrobrachium amazonicum*; pH; COD; Ecotoxicologia.

Abstract **-** *Mercury contamination in Amazonian blackwater rivers, such as the Rio Negro, which is rich in dissolved organic carbon (DOC), represents an environmental threat due to the toxicity and bioaccumulation of this metal. This study evaluated the short-term (24 h) effects of exposure of the Amazonian shrimp Macrobrachium amazonicum (n = 10; weight: 0.12 ± 0.002 g; length: 5.4 ± 0.13 cm) to $HgCl_2$ (220 ng L^{-1}, CONAMA 357/2005 permissible limit) under four experimental conditions (pH 7, pH 7 + DOC, pH 4, and pH 4 + DOC). Total mercury concentrations were measured in water and shrimp muscle. Lipid peroxidation (LPO) and DNA damage analyses were also performed. The presence of DOC increased mercury persistence in the water (independently of pH), but without bioaccumulative effects in muscle tissue (0.0013 ± 0.000095 mg kg^{-1}). Analysis of lipid peroxidation levels in the hepatopancreas revealed no statistically significant differences among experimental groups ($P = 0.359$). In contrast, DNA damage assessment showed significant differences between exposed groups and controls ($P < 0.001$). Even at the legal limit, $HgCl_2$ caused DNA damage in M. amazonicum after 24 h of exposure, without increases in LPO or muscle bioaccumulation. Altogether, these findings indicate a relevant sublethal effect, with potential impairment of the organism's defenses, and demonstrate that mercury toxicity is modulated by the natural components of Rio Negro water.*

Keywords: Mercury; *Macrobrachium amazonicum*; pH; DOC; Ecotoxicology.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação por metais pesados em ecossistemas aquáticos é um dos maiores desafios ambientais da atualidade, principalmente em áreas como a Amazônia, onde os impactos podem afetar tanto a biodiversidade quanto as populações humanas que dependem desses recursos hídricos. Dentre os metais pesados, o mercúrio (Hg) é um dos mais preocupantes devido à sua alta toxicidade, persistência no ambiente e capacidade de bioacumulação e biomagnificação nas cadeias alimentares aquáticas. A liberação do mercúrio nas águas é principalmente causada por atividades antrópicas, como mineração, queimadas e a indústria, resultando em graves consequências para os organismos aquáticos e para o equilíbrio ecológico. Sua mobilização e transformação em metilmercúrio, que é a forma mais tóxica do metal, pode afetar diretamente a saúde de

espécies nativas, como peixes, crustáceos e outros organismos aquáticos, além de comprometer a qualidade da água e a segurança alimentar das populações que utilizam esses recursos para o consumo (Mergler *et al.*, 2007; Passos; Mergler, 2008).

O mercúrio pode afetar diversos aspectos fisiológicos dos organismos aquáticos, incluindo o sistema nervoso, o sistema imunológico e o metabolismo energético, causando danos celulares e promovendo estresse oxidativo. Estudos demonstram que a toxicidade do mercúrio é influenciada por diversos fatores, como a concentração do metal, o tipo de ambiente aquático e as condições físico-químicas da água.

O Rio Negro, um dos maiores rios de águas pretas do mundo, apresenta águas com pH naturalmente ácido (variando de 3,5 a 5,5) e concentrações significativas de carbono orgânico dissolvido (COD). Esses dois fatores são conhecidos por interagir com metais pesados, como o mercúrio, alterando sua forma e, consequentemente, sua toxicidade. A presença de COD no ambiente aquático pode reduzir a biodisponibilidade do mercúrio ao formar complexos insolúveis, dificultando sua absorção pelos organismos. No entanto, a interação entre essas variáveis no ambiente amazônico ainda não está bem compreendida, especialmente no que diz respeito ao impacto do mercúrio sobre organismos como o camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*). O *Macrobrachium amazonicum* é uma espécie de grande importância ecológica e econômica, sendo amplamente distribuído em rios da América do Sul, incluindo o Rio Negro (Coelho & Ramos-Porto, 1985.). Esse camarão desempenha um papel essencial nas cadeias alimentares aquáticas e é uma importante fonte de proteína para as comunidades ribeirinhas.

Este estudo é particularmente relevante devido à escassez de informações sobre os efeitos do mercúrio em espécies nativas da Amazônia e sobre como fatores ambientais, como o pH e o COD, podem influenciar na toxicidade desse contaminante nos ecossistemas de águas pretas. Além disso, este estudo pode fornecer dados essenciais para a implementação de políticas públicas voltadas para a proteção dos ecossistemas aquáticos da Amazônia e para a gestão da pesca, visando a conservação de espécies como o *Macrobrachium amazonicum*, que são fundamentais tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico.

Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos tóxicos do mercúrio para o camarão-da-amazônia em diferentes condições de pH e presença de COD através

da análise dos danos em lipídeos (TBARs) e em DNA (DNA strand breaks), além da análise da concentração de mercúrio água experimental e no músculo dos camarões.

2. Materiais e Métodos

Espécimes de *Macrobrachium amazonicum* foram obtidos na UNESP (Registro, SP) e transportados para o LEBIO-Unisanta. Em laboratório, foram aclimatados em tanque de 500 L com água reconstituída de baixa concentração iônica (Na^+ 30 µM, K^+ 20 µM, Ca^{2+} 10 µM, Mg^{2+} 8 µM, Cl^- 20 µM), simulando condições do Rio Negro, com renovação gradual e alimentação ad libitum. A água reconstituída foi preparada conforme USEPA (2002) em dois reservatórios (pH 7 e pH 4); os animais permaneceram 10 dias nesses meios antes dos experimentos.

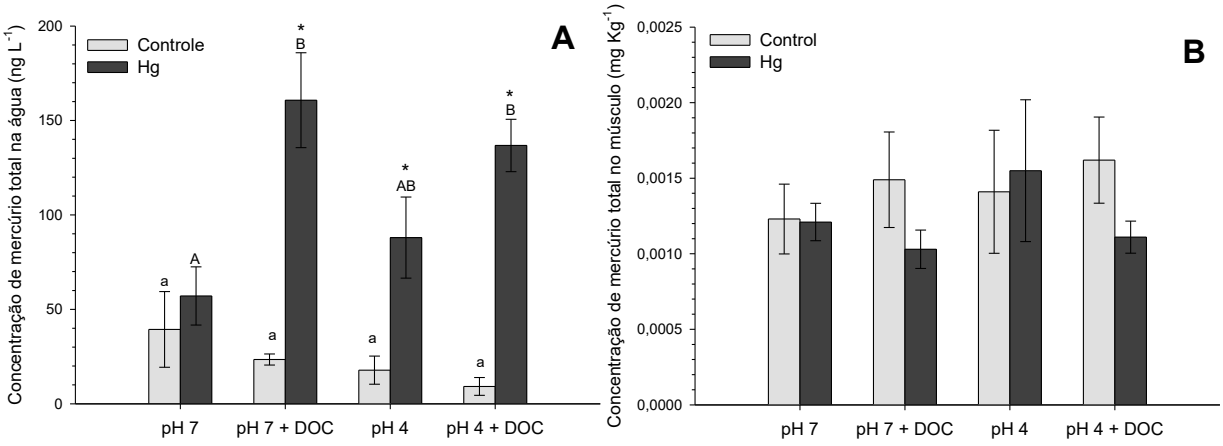
Os ensaios foram conduzidos em triplicata (n = 3) a 25 °C, em aquários de 7 L contendo 20 camarões cada (0,1 g L^{-1}). Oito grupos foram testados: controles em pH 7 e pH 4, com e sem carbono orgânico dissolvido (COD), e os correspondentes tratamentos com mercúrio (220 ng L^{-1}). A solução de COD (10 mg L^{-1}) foi preparada a partir de amostra concentrada do Rio Negro, e a solução de $HgCl_2$ atendeu ao limite da Resolução CONAMA 357/2005. As soluções permaneceram em repouso por 24 h para dispersão/complexação. O pH foi monitorado e ajustado a cada 2 h. Após 24 h, amostras de água foram coletadas para determinação de mercúrio total (DMA-80); os camarões foram medidos e pesados, e amostras de músculo (mercúrio total, DMA-80) e de hepatopâncreas (peroxidação lipídica e danos em DNA) foram coletadas e armazenadas a −80 °C até as análises. Em seguida, realizamos as análises de peroxidação lipídica (LPO) pelo ensaio TBARS, conforme protocolo padronizado no laboratório (Buege; Aust, 1978; Ohkawa; Ohishi; Yagi, 1979), e o dano ao DNA pelo método de precipitação alcalina (alkaline precipitation assay) conforme descrições de referência na literatura.

3. Resultados e Discussão

A concentração real de mercúrio total na água dos experimentos variou em função da presença e ausência do COD onde, na presença do COD, o mercúrio total ficou próximo ao valor nominal de 220 ng L^{-1} (i.e. 160, 7 ± 25,1 e 136,7 ± 13,8, para pH 7 e 4, respectivamente) (Figura 1A). Na ausência do COD, a concentração de mercúrio total foi de 57,1 ± 15,4 e 88,0 ± 21,4, representando uma diminuição de 2,8 e 1,5 vezes,

respectivamente, em relação aos mesmos tratamentos na presença de COD (Figura 1A). De qualquer forma, aumento significativo na concentração do mercúrio total foi observada entre os diferentes tratamentos e seus respectivos controles, com exceção do pH 7 na ausência do COD (Figura 1A). Apesar disso, 24 h de exposição ao mercúrio não causou sua bioacumulação no músculo dos camarões tanto na presença quanto na ausência do COD, independente do pH (7 ou 4) (Figura 1B).

Figura 1: Mercúrio total (média ± desvio padrão) na água (A) e músculo (B) de Macrobrachium amazonicum expostos a mercúrio (220 ng L^{-1}) na presença e ausência de carbono orgânico dissolvido (COD) isolado do Rio Negro em condições neutra (pH 7) e ácida (pH 4). Letras diferentes representam diferença estatística (P < 0,05) entre os diferentes tratamentos (minúscula para o controle e maiúsculo para o mercúrio (Hg)). Asterisco (*) indica diferença significativa (P < 0,05) entre os diferentes tratamentos e seus respectivos controles.



A análise dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) (Figura 2) no hepatopâncreas não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de tratamento. Embora tenham sido observadas variações nos valores médios, essas diferenças não foram suficientemente grandes para excluir a possibilidade de variação ao acaso.

Os danos em DNA (Figura 3) no hepatopâncreas aumentaram com a exposição ao mercúrio em todas as condições testadas (P < 0,001). Em pH 7, com ou sem COD, os valores sob mercúrio foram consistentemente maiores do que nos respectivos controles. Em pH 4, a diferença entre controle e mercúrio foi ainda mais evidente; em pH 4 + COD, o controle apresentou valores mais baixos, mas a exposição ao mercúrio manteve os danos elevados. No conjunto, os dados confirmam genotoxicidade aguda em 24 h, com resposta modulada por pH e pela presença de COD.

Figura 2: Peroxidação lipídica no hepatopâncreas (média ± desvio padrão) de Macrobrachium amazonicum expostos a mercúrio (220 ng L^{-1}) na presença e ausência de carbono orgânico dissolvido (COD) isolado do Rio Negro em condições neutra (pH 7) e ácida (pH 4).

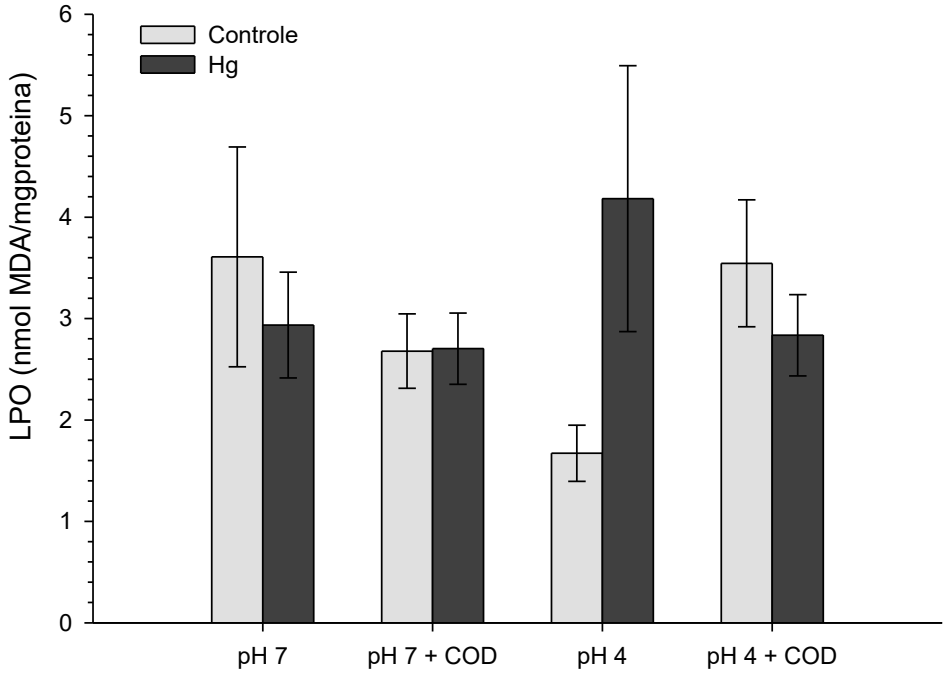
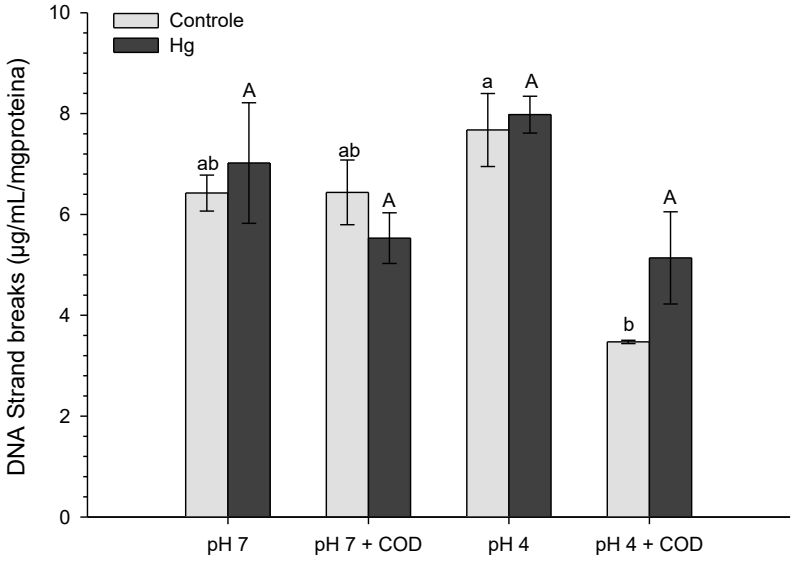


Figura 3: *Danos no DNA do hepatopâncreas (média ± desvio padrão) de Macrobrachium amazonicum expostos a mercúrio (220 ng L^{-1}) na presença e ausência de carbono orgânico dissolvido (COD) isolado do Rio Negro em condições neutra (pH 7) e ácida (pH 4). Letras diferentes representam diferença estatística (P < 0,05) entre os diferentes tratamentos (minúscula para o controle e maiúsculo para o mercúrio (Hg)).*



Os resultados obtidos mostram que a concentração de mercúrio total na água variou significativamente dependendo da presença ou ausência do COD. Quando o COD estava presente, os valores de mercúrio total se mantiveram mais próximos do nominal (220 ng L^{-1}), enquanto na sua ausência, houve uma redução expressiva na concentração. Isso sugere que o COD pode ter um papel na estabilização do mercúrio na coluna d'água, possivelmente formando complexos que impedem sua rápida sedimentação ou volatilização. Esse achado reforça estudos anteriores que demonstram a capacidade do COD de interagir com metais pesados e modificar sua biodisponibilidade (Guéguen & Dominik, 2003; Ravichandran, 2004).

Apesar dessa variação na concentração de mercúrio na água, não foi detectada bioacumulação do metal no músculo do *Macrobrachium amazonicum* após 24 horas de exposição, independentemente do pH ou da presença do COD. Isso pode estar relacionado ao curto tempo de exposição, que pode não ter sido suficiente para que o mercúrio fosse incorporado aos tecidos musculares, ou a mecanismos eficientes de excreção e metabolização do metal pelo camarão. Além disso, o músculo geralmente apresenta menor afinidade para a bioacumulação de mercúrio quando comparado a órgãos metabolicamente mais ativos, como o hepatopâncreas, o que pode justificar essa ausência de acúmulo (Lailson-Brito et al., 2011).

A exposição de 24 h ao mercúrio elevou significativamente o dano ao DNA no hepatopâncreas, indicando genotoxicidade aguda. Esse padrão é consistente com o uso do ensaio do cometa como biomarcador precoce em organismos aquáticos, capaz de responder antes de outros marcadores fisiológicos (Jiang et al., 2023; The Comet Assay-SETAC,2023).

A ausência de diferenças em LPO no mesmo intervalo é compatível com relatos de que respostas de peroxidação podem exigir maior duração/nível de estresse ou serem atenuadas por características da água; em sistemas com alto teor de matéria orgânica dissolvida, como o Rio Negro, grupos tiólicos do matéria orgânica dissolvida complexam o mercúrio e modulam sua biodisponibilidade, o que pode amortecer respostas oxidativas sem impedir efeitos genotóxicos iniciais (Rocha et al., 2000, 2003; Duarte et al., 2016; Chaves-Ulloa et al., 2016; Seelen et al., 2023).

De forma geral, os resultados indicam que o mercúrio tem um efeito tóxico significativo sobre o *Macrobrachium amazonicum*, afetando o hepatopâncreas, mesmo

sem ser detectado no músculo após 24 horas de exposição. Além disso, a presença do COD influenciou a disponibilidade do mercúrio na água. Esses achados evidenciam a complexidade das interações entre contaminantes e componentes naturais da água, ressaltando a importância de mais estudos para entender melhor os mecanismos envolvidos na toxicidade do mercúrio em ecossistemas aquáticos tropicais.

4. Conclusão

O mercúrio causou genotoxicidade em *M. amazonicum*, mesmo após um curto período de exposição (24 h). O COD contribuiu com a manutenção da concentração do mercúrio na água, no entanto, reduziu a genotoxicidade em pH 4. Este estudo demonstra os efeitos subletais do mercúrio para *M. amazonicum*, reforçando a importância de monitorar marcadores de DNA em avaliações de risco.

5. Referências

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 52, n. 2, p. 83–91, 2002.

CHAVES-ULLOA, R. et al. Dissolved organic carbon modulates mercury concentrations in insect subsidies from streams to terrestrial consumers. *Oecologia*, v. 182, p. 571–581, 2016.

COELHO, P. A.; RAMOS-PORTO, M. R. Camarões de água doce do Brasil: distribuição geográfica. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 2, n. 6, p. 405–410, 1985.

DE SCHAMPHELAERE, K. A. C.; JANSSEN, C. R. Effects of dissolved organic carbon concentration and source, pH, and water hardness on chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 23, n. 5, p. 1115–1122, 2004.

DUARTE, R. M. B. O. et al. Dissolved organic carbon from the upper Rio Negro protects zebrafish against ionoregulatory disturbances caused by low pH exposure. *Scientific Reports*, v. 6, p. 20377, 2016.

FUNES, V. et al. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environmental Pollution*, v. 139, n. 2, p. 214–223, 2006.

GUÉGUEN, C.; DOMINIK, J. Partitioning of trace metals between dissolved and particulate phases in a contaminated river: temporal variations and the role of DOC. *Applied Geochemistry*, v. 18, n. 4, p. 571–581, 2003.

HACON, S. S. et al. Mercury exposure through fish consumption in traditional communities in the Brazilian Amazon. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 14, p. 5263, 2020.

JIANG, N. et al. An overview of comet assay application for detecting environmental genotoxins in aquatic animals. *Agriculture*, v. 13, n. 3, p. 623, 2023.

LACERDA, L. D.; SALOMONS, W. *Mercury from Gold and Silver Mining: A Chemical Time Bomb?* Dordrecht: Springer, 1998.

LAILSON-BRITO, J.; DORNELLES, P. R.; AZEVEDO, A. F.; MALM, O. Mercury accumulation in marine organisms from Rio de Janeiro State, southeastern Brazil. *Química Nova*, v. 34, n. 3, p. 377–384, 2011.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302–310, 1978.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, p. 351–358, 1979.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; LACHANCE, B. DNA strand breaks in aquatic organisms measured by the alkaline precipitation assay: methodological considerations and environmental applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 32, p. 110–125, 1995.

OLIVE, P. L. The DNA precipitation assay: a rapid measure of DNA strand breaks in eukaryotic cells. *Radiation Research*, v. 114, p. 152–170, 1988.

MALM, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environmental Research*, v. 77, n. 2, p. 73–78, 1998.

NEW, M. B. et al. *Freshwater Prawns: Biology and Farming*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010.

NORDBERG, G. F. et al. *Handbook on the Toxicology of Metals*. 3. ed. Amsterdam: Academic Press, 2007.

MERGLER, D. *et al.* Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio*, v. 36, n. 1, p. 3–11, **2007.**

PASSOS, C. J. S.; MERGLER, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, supl. 4, p. S503–S520, 2008.

RAVICHANDRAN, M. Interactions between mercury and dissolved organic matter – a review. *Chemosphere*, v. 55, n. 3, p. 319–331, 2004.

ROCHA, J. C. et al. Reduction of mercury (II) by tropical river humic substances (Rio Negro). *Science of the Total Environment*, v. 261, p. 43–48, 2000.

ROCHA, J. C. et al. Influence of structural features of tropical river humic substances on their capability to reduce mercury (II). *Science of the Total Environment*, v. 307, p. 91–98, 2003.

ROULET, M. et al. Spatio-temporal geochemistry of mercury in waters of the Tapajós and Amazon rivers, Brazil. *Limnology and Oceanography*, v. 46, n. 5, p. 1141–1157, 2001.

SEELEN, E. et al. Dissolved organic matter thiol concentrations determine methylmercury bioavailability across the aquatic continuum. *Nature Communications*, v. 14, p. 6762, 2023.

SETAC. The comet assay, a sensitive biomarker of water quality assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 42, n. 10, p. 2350–2368, 2023.