

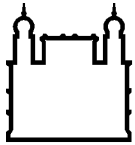
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

Perna perna (BIVALVIA: MYTILIDAE) DA PRAIA DE JURUJUBA,
NITERÓI, RJ: TAXONOMIA INTEGRATIVA DE HELMINTOS E
FUNGOS ASSOCIADOS, CONTAMINAÇÃO ELEMENTAR E
AVALIAÇÃO ESPECTROMÉTRICA

AMANDA GLEYCE LIMA DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro
Maio de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AMANDA GLEYCE LIMA DE OLIVEIRA

Perna perna (Bivalvia: Mytilidae) da Praia de Jurujuba, Niterói, RJ: taxonomia integrativa de helmintos e fungos associados, contaminação elementar e avaliação espectrométrica

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Orientadora: Dr^a. Cláudia Portes Santos Silva

Rio de Janeiro

Maio de 2022

Oliveira, Amanda Gleyce Lima de.

Perna perna (Bivalvia: Mytilidae) da Praia de Jurujuba, Niterói, RJ: taxonomia integrativa de helmintos e fungos associados, contaminação elementar e avaliação espectrométrica / Amanda Gleyce Lima de Oliveira. - Rio de Janeiro, 2022.

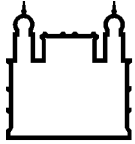
xx, 99 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2022.

Orientadora: Cláudia Portes Santos Silva.

Bibliografia: f. 80-97

1. bivalve comestível. 2. comercialização legal. 3. *Prosohynchooides* sp.. 4. contaminações fúngicas e elementares. 5. saúde pública. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AMANDA GLEYCE LIMA DE OLIVEIRA

Perna perna (BIVALVIA: MYTILIDAE) DA PRAIA DE JURUJUBA, NITERÓI, RJ:
TAXONOMIA INTEGRATIVA DE HELMINTOS E FUNGOS ASSOCIADOS,
CONTAMINAÇÃO ELEMENTAR E AVALIAÇÃO ESPECTROMÉTRICA

ORIENTADORA: Dr^a. Cláudia Portes Santos Silva

Aprovada em: 12 / 05 / 2022

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Aurea Maria Lage de Moraes - **Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dr^a. Maria João Santos (Universidade do Porto CIIMAR)

Prof. Dr. Douglas Fernandes Barbin (Universidade Estadual de Campinas)

Prof. Dr^a. Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dr^a. Melissa Querido Cárdenas (Instituto Oswaldo Cruz)

Rio de Janeiro, 12 de maio de 2022

Dedico essa pesquisa à Deus, aos meus pais (Rose e Valdemar) e às minhas irmãs (Ana Paula e Viviane), que sempre acreditaram em mim e me incentivam a seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), pela acolhida e pela assistência que tiveram comigo durante esses quatro anos.

À minha orientadora Dr^a. Cláudia Portes, por ter dividido seu conhecimento, pela sua dedicação, confiança e compreensão. Sou muito grata por tudo! Admiro você como profissional e pessoa.

À Dr^a. Clélia Cristina Mello-Silva Costa, que me informou sobre a seleção do Doutorado e me apresentou para a minha orientadora, além de acreditar em mim desde a época do Mestrado. Obrigada pelos ensinamentos e apoio.

Aos meus companheiros do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA): Lucas Keidel, Ana Carolina Camargo, Juliana Novo, Bruna Cristina dos Santos, Marcela Cortes, Danielle Iglesias, Everton Gustavo Nunes dos Santos e Gabriela Barbosa, pela ajuda nas tarefas, pelo incentivo e pelos momentos de descontração. Em especial a Vanessa Valladares, que esteve comigo em várias ocasiões: cursando as disciplinas, nos trabalhos de campo, nas análises do NIRS e conversas nos intervalos dos experimentos.

À Dr^a. Tatiana Dillenburg, Rafael Christian da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio) e em particular, Dr^a. Rachel Ann Hauser-Davis do LAPSA, pelo suporte na análise multielementar.

Ao pesquisador Mário Gatti e Alessandra von Randow do LAPSA, e Dr^a. Áurea Moraes, Renata Buarque, Fernanda da Silva e Ingrid dos Santos do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do IOC, por terem me recebido em seus laboratórios e contribuído na identificação dos fungos.

Ao Dr. Rodrigo Caldas, Lucas Keidel e Shanna Santos do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fiocruz, pelo auxílio nas análises histológicas.

À Marcione Brito da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelo apoio técnico na construção das árvores filogenéticas.

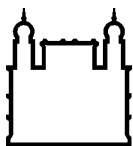
Aos pescadores da Praia de Jurujuba, em Niterói, principalmente ao Sr. João, por terem ajudado nas coletas dos mexilhões e peixes, e fornecido informações das amostras.

Ao IOC e ao Conselho Nacional de Pesquisa pelo auxílio financeiro ao projeto.

Enfim, a todos que torceram pelo meu sucesso e colaboraram de alguma maneira para o desenvolvimento desta tese. Simplesmente, muito obrigada.

“Ore como se tudo dependesse de Deus e
trabalhe como se tudo dependesse de
você.”

(Santo Inácio de Loyola)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

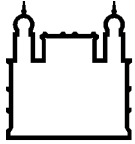
Perna perna (BIVALVIA: MYTILIDAE) DA PRAIA DE JURUJUBA, NITERÓI, RJ: TAXONOMIA INTEGRATIVA DE HELMINTOS E FUNGOS ASSOCIADOS, CONTAMINAÇÃO ELEMENTAR E AVALIAÇÃO ESPECTROMÉTRICA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Amanda Gleyce Lima de Oliveira

O mexilhão *Perna perna* possui grande importância alimentar e econômica no Brasil. Porém, a presença de helmintos, fungos e contaminantes, além da falta de controle no tamanho dos mexilhões extraídos são questões preocupantes. Neste contexto, este estudo teve como objetivo realizar a taxonomia integrativa de helmintos e fungos filamentosos em mexilhões *P. perna* da Praia de Jurujuba, Niterói, RJ, com avaliação de aspectos histopatológicos, além da análise de contaminação elementar e quimiométrica como medidas auxiliares de controle sanitário e comercialização. Os bivalves obtidos entre 2019 e 2021, foram pesados, medidos e sexados. As amostras foram analisadas por diferentes técnicas incluindo estereomicroscopia, histopatologia, genética, meios de cultura, espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICPMS) e espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS). Dos 69 mexilhões examinados para helmintos, 24,6% estavam parasitados por esporocistos e cercárias de trematódeos *Proisorhynchoides* sp. identificados pela morfologia e por novas sequências do 28S e 18S rDNA e ITS1, 5.8S e ITS2. A histopatologia dos mantos parasitados indicou ausência de reações inflamatórias associadas. A análise da contaminação elementar por ICPMS dos músculos adutores de 30 mexilhões indicou que os níveis médios de As, Cr, Se, e Zn excederam os limites das agências reguladoras nacionais e internacionais. No total, 84 colônias de fungos filamentosos foram isoladas, sendo identificados representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Didymella*, *Penicillium* e *Phaeoisaria*. Este é o primeiro registro de *Didymella* sp. em mexilhões e novas sequências de 26S e ITS1, 5.8 e ITS2 foram depositadas no Genbank. Para *Aureobasidium pullulans* são adicionadas sequências de 18S e ITS1, 5.8 e ITS2, e para *Phaeoisaria* sp., as sequências de 18S e 26S. Para fins comparativos de amostras para comercialização foram também avaliados mexilhões da Praia Vermelha, no Rio de Janeiro. O uso do NIRS evidenciou a separação de espécimes de *P. perna* < 50 mm e > 50 mm, das duas praias, com tendência de separação de adultos por área, o que pode contribuir para análises de procedência do produto. *Proisorhynchoides* sp. é aqui reportado pela primeira vez em mexilhões da costa do estado do Rio de Janeiro com dados genéticos e histopatológicos. Devido às altas concentrações elementares encontradas e à presença de fungos oportunistas e produtores de micotoxinas, sugere-se monitoramento de *P. perna* na área investigada. Adicionalmente o NIRS provou ser uma ferramenta potencial para diferenciação de *P. perna* jovens e adultos, podendo auxiliar na inspeção do tamanho dos mexilhões e no controle da extração ilegal de *P. perna*, favorecendo assim a manutenção de bancos naturais desses mexilhões.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Perna perna (BIVALVIA: MYTILIDAE) FROM JURUJUBA BEACH, NITERÓI, RJ: INTEGRATIVE TAXONOMY OF HELMINTHS AND FUNGI, ELEMENTAL CONTAMINATION AND SPECTROMETRIC EVALUATION

ABSTRACT

PhD THESIS IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Amanda Gleyce Lima de Oliveira

The mussel *Perna perna* has great food and economic importance in Brazil. However, the presence of helminths, fungi and contaminants, as well as the lack of control on the size of extracted mussels are issues of concern. In this context, this study aimed to perform an integrative taxonomy of helminths and filamentous fungi from *P. perna* mussels from the Jurujuba Beach, Niterói, RJ, with evaluation of histopathological aspects, as well as elemental and chemometric contamination analysis as auxiliary measures for sanitary control and commercialization. The bivalves obtained between 2019 and 2021 were weighed, measured and sexed. The samples were analyzed by different techniques including stereomicroscopy, histopathology, genetics, culture media, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) and near infrared spectroscopy (NIRS). Of the 69 mussels examined for helminths, 24.6% were parasitized by trematodes *Proisorhynchoides* sp. sporocysts and cercariae identified by morphology and new sequences of the 28S and 18S rDNA and ITS1, 5.8S and ITS2. Histopathology of the parasitized mantles indicated no associated inflammatory reactions. Elemental contamination analysed by ICPMS of the adductor muscles of 30 mussels indicated that the mean levels of As, Cr, Se, and Zn exceeded the limits of national and international regulatory agencies. In total, 84 colonies of filamentous fungi were isolated, and representatives of the genera *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Didymella*, *Penicillium*, and *Phaeoisaria* were identified. This is the first record of *Didymella* sp. in mussels and new 26S and ITS1, 5.8 and ITS2 sequences were deposited in Genbank. For *Aureobasidium pullulans*, 18S and ITS1, 5.8 and ITS2 sequences were added, and for *Phaeoisaria* sp., the 18S and 26S sequences. For comparative purposes of samples for commercialization, mussels from Vermelha Beach, in Rio de Janeiro, were also evaluated. The use of NIRS evidenced the separation of *P. perna* specimens < 50 mm and > 50 mm on both beaches with a tendency of separation of adults by area, which may contribute to analyses of product origin. *Proisorhynchoides* sp. is reported here for the first time in mussels from the coast of Rio de Janeiro state with genetic and histopathological data. Due to the high elemental concentrations found and the presence of opportunistic and mycotoxin producing fungi, surveillance of *P. perna* in the investigated area is suggested. Additionally, NIRS proved to be a potential tool for differentiation of juvenile and adult *P. perna*, and can help in the inspection of mussel size and control of illegal extraction of *P. perna*, thus favoring the maintenance of natural mussel beds.

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 <i>Perna perna</i>: o Mexilhão Marrom	1
1.2 Infecções e Contaminantes Ambientais	3
1.2.1 Trematódeos.....	3
1.2.2 Fungos filamentosos.....	4
1.2.3 Contaminantes elementares	5
1.3 Espectroscopia Vibracional	6
1.4 Justificativa	7
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo Geral	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS - GERAL	9
3.1 Área de Estudo	9
4 CAPÍTULO I. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Prosorhynchoides</i> sp. EM <i>Perna perna</i>	10
4.1 Materiais e Métodos	10
4.1.1 Coleta e processamento das amostras.....	10
4.1.2 Dissecção dos mexilhões e separação dos helmintos.....	10
4.1.3 Análises moleculares e filogenéticas	12
4.1.4 Histologia de <i>Perna perna</i>	13
4.2 Resultados	16
4.3 Discussão	25
5 CAPÍTULO II. FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS AOS MEXILHÕES <i>Perna perna</i>	29
5.1 Materiais e Métodos	29
5.1.1 Coleta e processamento das amostras.....	29
5.1.2 Identificação dos fungos filamentosos	29
5.1.3 Análises moleculares	31

5.2	Resultados	32
5.3	Discussão	38
6	CAPÍTULO III. CONTAMINAÇÃO ELEMENTAR EM MEXILHÕES <i>Perna perna</i>	55
6.1	Materiais e Métodos	55
6.1.1	Coleta e processamento das amostras.....	55
6.1.2	Análise multielementar.....	55
6.1.3	Cálculo da ingestão semanal tolerável provisória.....	57
6.1.4	Análises estatísticas	57
6.2	Resultados e Discussão	57
7	CAPÍTULO IV. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO COMO FERRAMENTA DE CONTROLE NA COMERCIALIZAÇÃO DE <i>Perna perna</i>	68
7.1	Materiais e Métodos	68
7.1.1	Coleta e processamento das amostras.....	68
7.1.2	Análises moleculares.....	68
7.1.3	Medição dos espectros	69
7.1.4	Análises quimiométricas	70
7.1.5	Análises estatísticas	70
7.2	Resultados	71
7.3	Discussão	75
8	CONCLUSÕES	78
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
10	ANEXOS	98
10.1	Anexo A: Artigo publicado referente ao Capítulo III.....	98
10.2	Anexo B: Fungos filamentosos identificados em cada <i>Perna perna</i> coletado próximo a Praia de Jurujuba, Niterói, RJ.	99

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa de parte do estado do Rio de Janeiro, destacando a Praia de Jurujuba, em Niterói, e a Praia Vermelha, no Rio de Janeiro, ambas localizadas na Baía de Guanabara (Adaptado de <https://www.google.com/maps>).11
- Figura 2. A- Amostras de mexilhões *Perna perna*. B- Exemplos maduros retirados das conchas, com coloração alaranjada na fêmea (exemplar em posição superior) e branca-creme no macho (exemplar em posição inferior). Barra: 2 cm.11
- Figura 3. Micrografias de *Prosohynchoïdes* sp.: A- Esporocistos filamentosos alaranjados/avermelhados sobre o manto de um *Perna perna* macho. B–D- Descobertas histológicas no manto de mexilhões parasitados por *Prosohynchoïdes* sp. corados com hematoxilina-eosina. B- Macho com mais de 50% do tecido conjuntivo do manto parasitado por esporocistos de trematódeo. Ausência de reações inflamatórias associadas ao parasitismo e gônadas. C- Macho com mais de 50% do tecido conjuntivo do manto parasitado por esporocistos de trematódeo. Detalhe dos esporocistos que contêm várias cercárias no tecido conjuntivo entre as gônadas. Não é observada qualquer reação inflamatória associada ao parasitismo detectado. D- Cercária no tecido conjuntivo do manto de um mexilhão fêmea com menos de 5% de manto parasitado. Não é observada qualquer reação inflamatória associada ao parasitismo detectado. E- Cercárias emergindo de esporocistos. F- Cercária infecciosa totalmente desenvolvida. Abreviaturas: base da cauda (BC), boca (B), cercárias (C), esporocistos (E), furca (F), gônadas (G), órgão cefálico (OC) e tecido conjuntivo (TC).18
- Figura 4. Topologia filogenética Bayesiana de Bucephalinae e subfamílias intimamente relacionadas construída a partir do gene 28S rDNA. Os valores de suporte nos nós são mostrados como probabilidades posteriores Bayesianas (> 0,50). A nova sequência é destacada com (*).22
- Figura 5. Topologia filogenética Bayesiana de Bucephalidae e famílias estreitamente relacionadas construída a partir do gene 18S rDNA. Os valores de suporte nos nós são mostrados como probabilidades posteriores Bayesianas (> 0,50). A nova sequência é destacada com (*).23
- Figura 6. Topologia filogenética Bayesiana de Bucephalinae e subfamílias estreitamente relacionadas construída a partir das regiões ITS1, 5.8S e ITS2.

Os valores de suporte nos nós são mostrados como probabilidades posteriores Bayesianas (> 0,50). As novas sequências são destacadas com (*).

.....	24
Figura 7. Procedimentos das amostras <i>Perna perna</i> para análises dos fungos. A- Mexilhões acondicionados individualmente em sacos plásticos estéreis selados B- Lavagem dos mexilhões na capela de fluxo laminar. C- Dissecção do mexilhão.	30
Figura 8. Fungos isolados das brânquias dos mexilhões <i>Perna perna</i> . A- Fungos que cresceram em placas de Petri com BDA, sendo isolados em tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura. B- Montagem de lâminas com pequenas porções do fungo que cresceu em CYA.....	30
Figura 9. Características morfológicas de <i>Aspergillus awamori</i> após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios marrons e vesícula, coloração lactofenol em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); estipe (E) e vesícula (V). Barra: 20 µm.....	39
Figura 10. Características morfológicas de <i>Aspergillus caespitosus</i> após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios esverdeados, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); estipe (E) e vesícula (V). Barra: 50 µm.....	40
Figura 11. Características morfológicas de <i>Aspergillus carbonarius</i> após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia do conidióforo com conídios marrons e pretos, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA), conídios (C) e estipe (E). Barra: 50 µm.....	41

Figura 12. Características morfológicas de *Aspergillus flavipes* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia do conidióforo com conídios esverdeados, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C) e estipe (E). Barra: 20 µm.....42

Figura 13. Características morfológicas de *Aspergillus japonicus* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios marrons claros, coloração lactofenol em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); conídios (C); estipe (E) e vesícula (V). Barra: 20 µm.....43

Figura 14. Características morfológicas de *Aspergillus niger* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios marrons escuros a pretos, coloração lactofenol em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); estipe (E) e vesícula (V). Barra: 20 µm.44

Figura 15. Características morfológicas de *Aspergillus sydowii* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios esverdeados, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C) e estipe (E). Barra: 20 µm.....45

Figura 16. Características morfológicas de *Aspergillus versicolor* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios esverdeados, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato

de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); estipe (E) e célula pé (CP). Barra: 50 µm.46

Figura 17. Características morfológicas de *Didymella* sp. após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos pinicídios marrons, coloração lactofenol em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA) e pinicídios (P). Barra: 20 µm.....47

Figura 18. Características morfológicas de *Penicillium raistrickii* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos, coloração lactofenol em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); fiálides (F) e métulas (M). Barra: 20 µm.48

Figura 19. Características morfológicas de *Cladosporium* sp. após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia do conidióforo com conídios, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA) e conídios (C). Barra: 20 µm.....49

Figura 20. Características morfológicas de *Phaeoisaria* sp. após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conídios e das hifas septadas, coloração lactofenol com azul de algodão em MEA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); clamidósporo (CL) e hifa (H). Barra: 20 µm.....50

Figura 21. Características morfológicas de *Aureobasidium pullulans* após sete dias de incubação. A- Crescimento fúngico no tubo de ensaio com ágar batata dextrose. B- Microscopia dos artroconídios negros, coloração lactofenol em

BDA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Batata Dextrose (BDA) e artroconídios (A). Barra: 20 µm.	51
Figura 22. Mexilhão <i>Perna perna</i> com as valvas abertas, mostrando no detalhe o músculo adutor posterior (MAP). Barra: 2 cm.....	55
Figura 23. Aquisição dos espectros por espectrofotômetro de infravermelho próximo a partir do mexilhão <i>Perna perna</i> . A- Espectros obtidos do conjunto muscular. B- Espectros obtidos da valva direita.....	70
Figura 24. Análise de Componentes Principais dos mexilhões <i>Perna perna</i> coletados na Praia de Jurujuba e na Praia Vermelha das cidades de Niterói e Rio de Janeiro, respectivamente (estado do Rio de Janeiro). A- Espectros por NIR obtidos a partir dos músculos. B- Espectros por NIR obtidos a partir das conchas.....	73
Figura 25. Análise de Componentes Principais dos músculos de <i>Perna perna</i> . A- Espectros de NIR obtidos de mexilhões da Praia Vermelha, Rio de Janeiro, RJ. B- Espectros de NIR obtidos de mexilhões da Praia de Jurujuba, Niterói, RJ.....	74
Figura 26. Análise de Componentes Principais dos espécimes de <i>Perna perna</i> maiores que 50 mm de comprimento total de concha coletados na Praia de Jurujuba e na Praia Vermelha das cidades de Niterói e Rio de Janeiro, respectivamente. Espectros de NIR obtidos a partir dos músculos dos mexilhões.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trematódeos digeneos utilizados nas análises filogenéticas com os seus respectivos números de acesso no GenBank.....	14
Tabela 2. Quantidade de mexilhões <i>Perna perna</i> coletados e parasitados de acordo com a classe de tamanho da concha.	17
Tabela 3. Divergência genética (Kimura 2-parâmetros, expresso em porcentagem) estimada usando as regiões 28S, 18S e ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA entre as espécies <i>Proisorhynchoides</i> obtidas do GenBank e as novas sequências relatadas no presente estudo, representadas por (*).	20
Tabela 4. Número de diferentes fungos filamentosos por órgão encontrados nos mexilhões <i>Perna perna</i> coletados próximos a Praia de Jurujuba, em Niterói, Rio de Janeiro.	33
Tabela 5. Número de colônias de fungos filamentosos por gênero isolados de órgãos de mexilhões <i>Perna perna</i> coletados próximos a Praia de Jurujuba, em Niterói, Rio de Janeiro.	33
Tabela 6. Recuperações de materiais de referência certificadas nas análises de ICP-MS aqui realizadas.	56
Tabela 7. Concentrações elementares (mg kg^{-1} de peso úmido) em amostras de mexilhão <i>Perna perna</i> da Praia de Jurujuba, Niterói, Rio de Janeiro (n = 30). ..	58
Tabela 8. Comparação das concentrações elementares em mexilhões <i>Perna perna</i> com estudos realizados em diferentes áreas da Baía de Guanabara e outros países. Os dados são expressos como média \pm DP (quando disponível) e intervalo (mg kg^{-1} peso úmido*).	60
Tabela 9. Concentrações médias de elementos no músculo adutor de amostras de mexilhão <i>Perna perna</i> da Praia de Jurujuba, Niterói, Rio de Janeiro em comparação com a legislação brasileira e internacional (mg kg^{-1} peso úmido).	64
Tabela 10. Ingestão Semanal Tolerável Provisória (PTWI) estimada de amostras de mexilhão <i>Perna perna</i> da Praia de Jurujuba, Niterói, Rio de Janeiro em comparação com PTWI recomendado da FAO/WHO ($\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal).	67
Tabela 11. Dados biométricos dos mexilhões <i>Perna perna</i> analisados por área de amostragem. Os dados são expressos como os valores mínimos - máximos (médias).....	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
µl	microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Ágar Batata Dextrose
BLAST	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	centímetro
COI	Citocromo c oxidase-1
Concea	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CYA	Ágar Extrato de Levedura Czapek
CYA20S	Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20%
EC	Comunidade Europeia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FSANZ	Padrões Alimentares Austrália Nova Zelândia
FT-NIR	Espectrofotômetro de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier
g	grama
IB	Inferência Bayesiana
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITS	Espaçador interno transcrito
LAPSA	Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental
LDA	Análise Discriminante Linear

MAFF	Ministério da Agricultura, Florestas e Pescas - Japão
MEA	Ágar Extrato de Malte
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHPRC	Ministério da Saúde da República Popular da China
mg kg ⁻¹	miligrama por quilograma
mm	milímetro
NCBI	Centro Nacional de Informação em Biotecnologia
NIRS	Espectroscopia no Infravermelho Próximo
°C	grau Celsius
OTA	Ocratoxina A
pb	pares de bases
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pmol	Picomol
PTWI	Ingestão Semanal Tolerável Provisória
PUC-Rio	Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
RJ	Rio de Janeiro
SAP/MAPA	Secretaria de Aquicultura e Pesca/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UV	Luz ultravioleta
WHO	Organização Mundial da Saúde

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Perna perna*: o Mexilhão Marrom

Perna perna (Linnaeus, 1758), conhecido como mexilhão marrom, é um molusco bivalve marinho, que pertence à família Mytilidae Rafinesque, 1815 e possui uma ampla distribuição geográfica (Resgalla Jr et al. 2008). Esses mexilhões habitam geralmente costões rochosos na região entre marés, fixando-se fortemente nas rochas através de uma estrutura filamentosa denominada bisso (Marques 1998).

É considerada uma espécie nativa do continente Africano, mas também pode ser encontrada no Mar Mediterrâneo, no Sri Lanka e no Sul da Índia. No continente europeu, foi observada apenas na costa Sul de Portugal. Com relação à costa das Américas, foi relatada no Golfo do México e em algumas ilhas do Caribe, além de Venezuela, Uruguai e Brasil (Hicks & Tunnell 1995; Acosta et al. 2006; Resgalla Jr et al. 2008; Carranza & Borthagaray 2009; Lourenço et al. 2012). No litoral brasileiro, ocorre desde o estado de Espírito Santo até o Rio Grande do Sul (Marques 1998). Silveira et al. (2006) registraram pela primeira vez *P. perna* no estado do Rio Grande do Norte. Entretanto, os autores acreditaram que devido à baixa densidade, três espécimes jovens, provavelmente os mexilhões não conseguiriam se estabelecer naquela área.

A coloração da massa visceral e do manto de *P. perna* sexualmente maduros é o que diferencia os sexos, sendo branca-creme nos machos e alaranjada nas fêmeas. Nessa fase reprodutiva, os animais apresentam o máximo de desenvolvimento dos folículos das gônadas e o manto é bastante espesso. O manto se torna pouco espesso e totalmente transparente quando ocorre o esvaziamento parcial ou total dos folículos (Lunetta 1969). Vale ressaltar que as gônadas dos mitilídeos são difusas, ocorrendo na massa visceral e expandindo-se para o manto (Lunetta 1969; Resgalla Jr et al. 2008).

A produção mundial de mexilhões cultivados atinge cerca de 2 milhões de toneladas por ano (FAO 2017). No Brasil, o cultivo de bivalves é representado principalmente por mexilhões, ostras e vieiras. Em 2020, a produção destes moluscos atingiu mais de 14,2 mil toneladas, o equivalente a 1,31% dos principais produtos da aquicultura brasileira, correspondendo ao valor de R\$ 78.020 mil reais (IBGE 2020). Entre estes, *P. perna* é o mais cultivado comercialmente no país

(Ferreira & Magalhães 2004; SAP/MAPA 2020). O sucesso de seu cultivo deve-se ao fato de apresentar taxas de crescimento aceleradas devido ao clima temperado do país, atingir um tamanho maior em comparação aos outros mitilídeos brasileiros, além de ser de fácil manuseio (Ferreira & Magalhães 2004; Resgalla Jr et al. 2008).

A extração comercial de *P. perna* representa uma fonte significativa de renda, quer complementar ou integral, e de consumo das populações costeiras humanas. É um alimento altamente nutritivo, com altos níveis de proteínas e sais minerais (Resgalla Jr et al. 2008). No entanto, os bivalves, incluindo *P. perna*, são amplamente aplicados em ações de monitoramento ambiental no Brasil (Lavradas et al. 2016; Campolim et al. 2018; Azevedo et al. 2019; Barbosa et al. 2019), pois são excelentes bioindicadores, devido a certas características específicas, como sua natureza sésil, resistência a diversas condições ambientais e hábitos alimentares por filtração, que resultam no acúmulo de diversos contaminantes biológicos e químicos em seus tecidos (Marques 1998; Resgalla Jr et al. 2008). Há relatos de trematódeos (Marchiori et al. 2010), fungos filamentosos (Grovel et al. 2003; Santos et al. 2017a) e elementos químicos (Lino et al. 2016) encontrados em bivalves em geral.

De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA 2006), a comercialização de *P. perna* a partir de estoques naturais é considerada apropriada quando se atinge o tamanho superior a 50 mm de comprimento total da concha. O crescimento dos bivalves é normalmente avaliado pelo comprimento da concha, e não pelo peso, que pode não ser fiável devido à presença de água dentro da concha (Marques 1998). Os espécimes de *P. perna* com tamanhos entre 20 a 30 mm de comprimento são classificados como jovens e sementes, enquanto que tamanhos iguais ou superiores a 50 mm são considerados adultos (IBAMA 2006).

A extração descontrolada de *P. perna* pode comprometer a manutenção de estoques naturais ao longo do tempo (Casarini & Henriques 2011). Neste contexto, o IBAMA (2006) estabeleceu um período que proíbe a extração, o fornecimento dos cultivos e a comercialização de *P. perna* de estoques naturais, em qualquer fase da vida do molusco, na costa Sudeste e Sul do Brasil, que decorre de 1º de setembro a 31 de dezembro. Estudos brasileiros avaliaram os efeitos das extrações irregulares desse bivalve. Lage e Jablonski (2008) entrevistaram pescadores de diferentes locais da Baía de Guanabara, no Rio de Janeiro, e constataram que existia uma preocupação em evitar a constante extração de mexilhões de uma determinada área

com a intenção de preservar os estoques naturais. Além disso, evitavam coletar indivíduos de tamanhos menores, com base em análises visuais. No entanto, Casarini e Henriques (2011) atribuíram a ligeira diferença encontrada entre o estoque de mexilhões adultos disponíveis e a produção extrativa na Baía de Santos, São Paulo, a subtração de espécimes de tamanho inferior a 50 mm. Esta ausência de controle sobre o tamanho dos mexilhões foi também salientada por Sodré et al. (2008), o que resultou na baixa densidade populacional em alguns costões rochosos do estado do Espírito Santo, e, em alguns casos, na extinção local. Rech e Scherer (2020) relataram um declínio, tanto em termos de tamanho como de abundância dos *P. perna* disponíveis nos costões rochosos da Ilha de Santa Catarina.

Os pratos preparados com mexilhões são comuns em restaurantes costeiros do Brasil, representando uma atração turística, porque os mariscos não estão normalmente presentes na comida diária dos brasileiros (Ferreira & Magalhães 2004; Sodré et al. 2008). Nos restaurantes locais, os mexilhões são normalmente vendidos pré-cozidos e sem conchas (Lage & Jablonski 2008; Sodré et al. 2008), o que impede a identificação precisa dos indivíduos jovens e adultos. Um problema adicional é a precária inspeção ou controle sanitário dos bivalves destinados ao consumo humano (Ferreira & Magalhães 2004; Lage & Jablonski 2008).

1.2 Infecções e Contaminantes Ambientais

1.2.1 Trematódeos

Os bivalves são conhecidos como hospedeiros intermediários de trematódeos, nos quais as formas larvais como esporocistos e cercárias se desenvolvem antes de chegarem a um hospedeiro definitivo, geralmente peixes (Gibson 2002; Marchiori et al. 2010). Os trematódeos bucefalídeos parasitam bivalves, e as suas larvas são consideradas os parasitos metazoários mais deletérios dos bivalves marinhos (Lauckner 1983; Cribb et al. 2001). No Sul e Sudeste do Brasil, as infecções causadas por larvas pertencentes ao gênero *Bucephalus* von Baer, 1827, são frequentemente relatadas em *P. perna* (Umiji et al. 1976; Carneiro-Schaefer et al. 2017), e podem comprometer o desenvolvimento do mexilhão, levando à castração (Magalhães 1998; Silva et al. 2002).

Os esporocistos e cercárias podem ser identificados por meio de análises estereomicroscópicas. No entanto, o diagnóstico pode ser incerto quando a infecção

ainda se encontra nas suas fases iniciais. Por conseguinte, são sugeridos estudos histopatológicos como um método adicional para classificar o grau de infecção do hospedeiro e evitar possíveis erros devido às análises feitas apenas com o estereomicroscópio (Magalhães 1998). Registros anteriores que empregaram esta análise complementar relatam um aumento de 8,7 a 10,8% na quantidade de bivalves parasitados em comparação com a detecção visual de rotina (Magalhães 1998; Cochôa & Magalhães 2008; Carneiro-Schaefer et al. 2017).

As larvas de bucefalídeos não podem ser identificadas em nível de gênero/espécie com base nas características morfológicas, devido à falta de caracteres taxonômicos que só aparecem na forma adulta. Portanto, alguns autores preferem identificar os trematódeos encontrados em bivalves apenas como bucefalídeos (Lasiak 1993; Calvo-Ugarteburu & McQuaid 1998; Loureiro et al. 2001). A este respeito, as técnicas moleculares podem constituir uma alternativa interessante à identificação em nível de espécie (Eydal et al. 2013).

1.2.2 Fungos filamentosos

Os fungos são microorganismos heterotróficos e eucariontes capazes de atuar como simbiontes, parasitas, saprófitos e decompositores, sendo amplamente distribuídos na natureza, no solo, na água e suspensos no ar (Dube 2013). Alguns fungos são utilizados na produção de alimentos e bebidas, na indústria farmacêutica e no controle biológico de pragas (Dube 2013; Tortora et al. 2017). No entanto, há fungos que possuem propriedades patogênicas e toxicológicas, o que pode representar um risco para humanos, animais e plantas (Grovel et al. 2003; Dube 2013).

A reprodução dos fungos pode ser sexuada ou assexuada. Morfologicamente, podem apresentar duas formas de crescimento: leveduras e filamentosos. As leveduras geralmente são ovais ou esféricas. Os filamentosos produzem longos filamentos e formam um emaranhado, denominados de hifas e micélio, respectivamente. As hifas podem ter septos transversais (septadas) ou não (asseptadas) (Levinson 2016; Tortora et al. 2017). As diferenças morfológicas, macroscópicas e microscópicas, dos fungos filamentosos são características importantes para a identificação do gênero e, às vezes, da espécie. Além disso, a velocidade de crescimento do fungo (lenta, moderada ou rápida) também pode ser levada em consideração (Moraes et al. 2009; Powers-Fletcher et al. 2016). O uso de

técnicas moleculares pode auxiliar quando não é possível identificar apenas com características morfológicas os fungos com precisão (Yazdani et al. 2011).

A ocorrência de fungos filamentosos isolados de moluscos bivalves foi investigada em mexilhões *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 e *Perna canaliculus* (Gmelin, 1791) cultivados na França, na Argélia e na Nova Zelândia, respectivamente (Sallenave-Namont et al. 2000; Matallah-Boutiba et al. 2012; Li et al. 2022), em vieiras *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) cultivado no Sudeste do Brasil (Santos et al. 2017a) e ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), além de mexilhões *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) e *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758) e amêijoas *Anadara broughtonii* (Schrenck, 1867) das águas russas do Mar do Japão (Zvereva & Vysotskaya 2005; Borzykh & Zvereva 2012a, 2012b, 2014, 2015, 2018). Em relação a *P. perna*, foi encontrado apenas um estudo associado a fungos, no Sudeste do Brasil (Santos et al. 2020).

Grovel et al. (2003) e Santos et al. (2017a; 2020) relatam que não houve nenhum efeito deletério visível nos moluscos contaminados por fungos. No entanto, as possíveis consequências da interação de fungos filamentosos com bivalves ainda não são conhecidas.

1.2.3 Contaminantes elementares

As entradas de metais e metalóides em diferentes compartimentos ambientais podem ocorrer por meio de processos naturais, como vulcanismo e intemperismo, ou devido a atividades antropogênicas, ou seja, efluentes domésticos e industriais (Alloway & Ayres 1997). Esses compostos químicos estão entre as principais classes de poluentes ambientais, uma vez que não são biodegradáveis e, dependendo de seus níveis no ambiente, podem apresentar elevada toxicidade. Alguns metais são essenciais aos organismos vivos, enquanto os elementos não essenciais não apresentam função metabólica. Cada organismo possui um nível de tolerância específico para ambos os tipos de metais que, quando acima de um determinado limite, pode causar efeitos tóxicos e / ou letais (Rosa et al. 2012; Coleman et al. 2017).

Certos metais apresentam a capacidade de bioacumulação em ecossistemas aquáticos. Isso pode ocorrer tanto diretamente, pela exposição ambiental, quanto indiretamente, pela ingestão de alimentos contaminados (Streit 1998). Um exemplo clássico deste último ocorreu na década de 1950, com o acúmulo da forma mais tóxica do mercúrio, o metilmercúrio, na Baía de Minamata, Japão, levando a

sintomas neurológicos e casos de toxicidade congênita em humanos, gatos e aves aquáticas (Fujiki & Tajima 1992). Avaliações posteriores relataram atrasos no desenvolvimento cognitivo em crianças pré-escolares que consumiam regularmente peixes contaminados com mercúrio (Freire et al. 2010). Portanto, o consumo limitado de peixes e mariscos é recomendado, uma vez que está comprovado que altos níveis de metilmercúrio resultam em comprometimento neurológico em recém-nascidos (WHO 2017). Outros elementos neste contexto também são de grande preocupação, como arsênio, cádmio, cromo e chumbo, que são conhecidos por bioacumular em toda a teia trófica e podem levar a efeitos carcinogênicos em organismos expostos (MacFarquhar et al. 2010; Rosa et al. 2012). Em relação à vida selvagem, estudos têm relatado alterações bioquímicas, reprodutivas e de crescimento deletérias em diversos organismos, como bivalves e peixes, devido à exposição a altas concentrações de metais e metalóides (Ebrahimi & Taherianfard et al. 2011; Yee-Duarte et al. 2018). Além disso, esses organismos são consumidos rotineiramente por humanos, o que pode levar a problemas de saúde pública.

1.3 Espectroscopia Vibracional

A Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS) é uma das ferramentas que tem sido utilizada para estimar parâmetros de qualidade alimentar e medir o armazenamento e consumo de energia em bivalves (Fluckiger et al. 2011; Bartlett et al. 2018), como também monitorizar toxinas marinhas (Lopes et al. 2018), além de diferenciar espécies de moluscos de amostras cultivadas no campo e em laboratório (Valladares et al. 2021). Essa ferramenta é uma tecnologia espectroscópica que avalia os tipos de vibrações moleculares de acordo com a combinação de ligações covalentes, tais como -CH, -NH, -OH e -SH (Siesler et al. 2002; Lopes et al. 2018). Um espectro NIR, portanto, fornece através de dados qualitativos e quantitativos o fenótipo químico de uma amostra. É considerado um método rápido, sem necessidade de tratamento prévio das amostras, e não destrutivo (Siesler et al. 2002; Valladares et al. 2021).

No que diz respeito aos aspectos bioquímicos e fisiológicos, os *P. perna* jovens investem menos energia na atividade reprodutiva do que os animais adultos (Resgalla Jr et al. 2008). Considerando a importância econômica e gastronômica do mexilhão no país e no mundo, o controle ineficiente do tamanho do mexilhão para venda, além do impacto ambiental da extração irregular, propõe-se neste estudo a

utilização do NIRS para a diferenciação do mexilhão jovem e adulto, comercializado no estado do Rio de Janeiro, com base nos seus fenótipos químicos.

1.4 Justificativa

Estudos sobre a ocorrência e o impacto de parasitos em bivalves marinhos ainda são escassos no Brasil. Por isso, novos estudos taxonômicos de helmintos de *P. perna* com dados morfológicos e genéticos precisam ser realizados. É importante ainda avaliar a qualidade alimentar dos mexilhões, por meio da presença de fungos filamentosos e de elementos químicos, pois esses bivalves são rotineiramente consumidos por humanos.

Devido à dificuldade de identificar a origem e a fase de vida (jovem ou adulto) de um mexilhão extraído, é necessário o desenvolvimento de novos métodos para minimizar os danos causados pela extração comercial de mexilhões jovens ou de áreas contaminadas, a fim de se preservar a fauna de mexilhões local, e conseqüentemente a saúde humana.

Este estudo integrado foca, portanto, tanto na pesquisa básica quanto na aplicada, porque o consumo de mexilhões parasitados e/ou contaminados representa sem dúvida uma questão de saúde pública.

A tese foi dividida em quatro capítulos e a metodologia específica está inserida em cada capítulo:

CAPÍTULO I. Avaliação morfológica, histopatológica e molecular de *Prosohynchoides* sp. em *Perna perna*.

CAPÍTULO II. Fungos filamentosos associados aos mexilhões *Perna perna*.

CAPÍTULO III. Contaminação elementar em mexilhões *Perna perna* (Anexo A).

CAPÍTULO IV. Espectroscopia de infravermelho próximo como ferramenta de controle na comercialização de *Perna perna*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a taxonomia integrativa de helmintos e fungos filamentosos de mexilhões *Perna perna* da Praia de Jurujuba, Niterói, RJ com avaliação de aspectos histopatológicos, além da análise de contaminação elementar e quimiométrica como medidas auxiliares de controle sanitário e de comercialização desses moluscos.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar e caracterizar o perfil morfológico e genético das espécies de helmintos encontrados em *P. perna*;
- Analisar possíveis lesões histopatológicas no molusco hospedeiro;
- Investigar a ocorrência de fungos filamentosos em *P. perna* e proceder à sua identificação;
- Determinar as concentrações elementares nesses mexilhões;
- Diferenciar por quimiometria exemplares jovens de adultos de *P. perna*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS - GERAL

3.1 Área de Estudo

O bairro de Jurujuba, em Niterói, localizado a leste da entrada da Baía de Guanabara, no estado do Rio de Janeiro (RJ), destaca-se pelo estabelecimento de uma comunidade tradicional de pescadores, próximo à Praia de Jurujuba (22°55'53"S, 43°06'35"O) (Figura 1). Na região, há uma mitilicultura (cultivo de mexilhões), que serve para consumo próprio e fonte de renda dos pescadores. Além da mitilicultura, os mexilhões são extraídos dos costões rochosos adjacentes. Em 2015, a Enseada de Jurujuba, que inclui a Praia de Jurujuba, apresentava uma produção estimada de até 800 quilos de mexilhões por dia, sustentando cerca de 90 famílias locais (O Globo 2015). A venda de mexilhões é destinada principalmente à população e restaurantes locais. Os mexilhões do presente estudo foram coletados por esses pescadores. Para fins comparativos para a construção do modelo quimiométrico, alguns mexilhões também foram coletados na Praia Vermelha, no bairro da Urca, Rio de Janeiro, RJ, localizada no lado oposto a entrada da mesma baía (22°57'16"S, 43°09'50"O) (Figura 1).

Este estudo foi autorizado pelo IBAMA, licença nos 68263-1, 68263-2 e 68263-3, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA, Fiocruz n.^{os} L-008/2018 e L-020/2018-A1), de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), e realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. O acesso ao patrimônio genético foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o n.º A20BC45.

4 CAPÍTULO I. Avaliação morfológica, histopatológica e molecular de *Prosorhynchoides* sp. em *Perna perna*

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Coleta e processamento das amostras

No período de 2019 a 2020, sessenta e nove espécimes de *P. perna* foram coletados na mitilicultura e nos costões rochosos adjacentes da Praia de Jurujuba, Niterói, RJ (Figura 1). As amostras foram colocadas em vasilhas contendo água do mar e gelo, e transportadas em caixa de poliestireno ao Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz (LAPSA, IOC) na Fiocruz (Figura 2A). Os animais frescos foram numerados, pesados (com conchas), medidos e divididos em sete classes de tamanho, compreendendo intervalos de 9 mm de 60 a 129 mm de comprimento. As valvas foram abertas com o auxílio de uma lâmina e o sexo foi determinado (Figura 2B). Todos os instrumentos foram limpos com álcool 70% entre as disseções individuais. Além disso, quatro anchovas *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766), uma corvina *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) e um xerelete *Caranx latus* Agassiz, 1831, coletados na mesma área, foram examinados em busca de parasitos adultos relacionados.

4.1.2 Dissecação dos mexilhões e separação dos helmintos

Depois de retirados das conchas, os órgãos internos dos mexilhões foram separados e examinados sob estereomicroscópio em solução salina a 0,7% para a coleta de tecidos e parasitos. Os esporocistos detectados foram rompidos com agulhas histológicas para libertação das cercárias. As larvas foram fixadas em álcool 70% para estudos morfológicos ou congeladas para análises moleculares. Os espécimes em álcool 70% foram corados no Carmim de Semichon ou Tricrômico de Gomori e montados em bálsamo do Canadá. As medidas são apresentadas em micrômetros, com a variação mínima e máxima seguida pela média entre parênteses. Os mantos dos mexilhões também foram congelados para análises moleculares. O tubo digestório dos peixes amostrados foi também examinado em solução salina sob um estereomicroscópio.

Os dados de prevalência seguem Bush et al. (1997), que consiste no número de hospedeiros infectados com um ou mais indivíduos de uma determinada espécie de parasito, dividido pelo número total de hospedeiros analisados para aquele parasito.

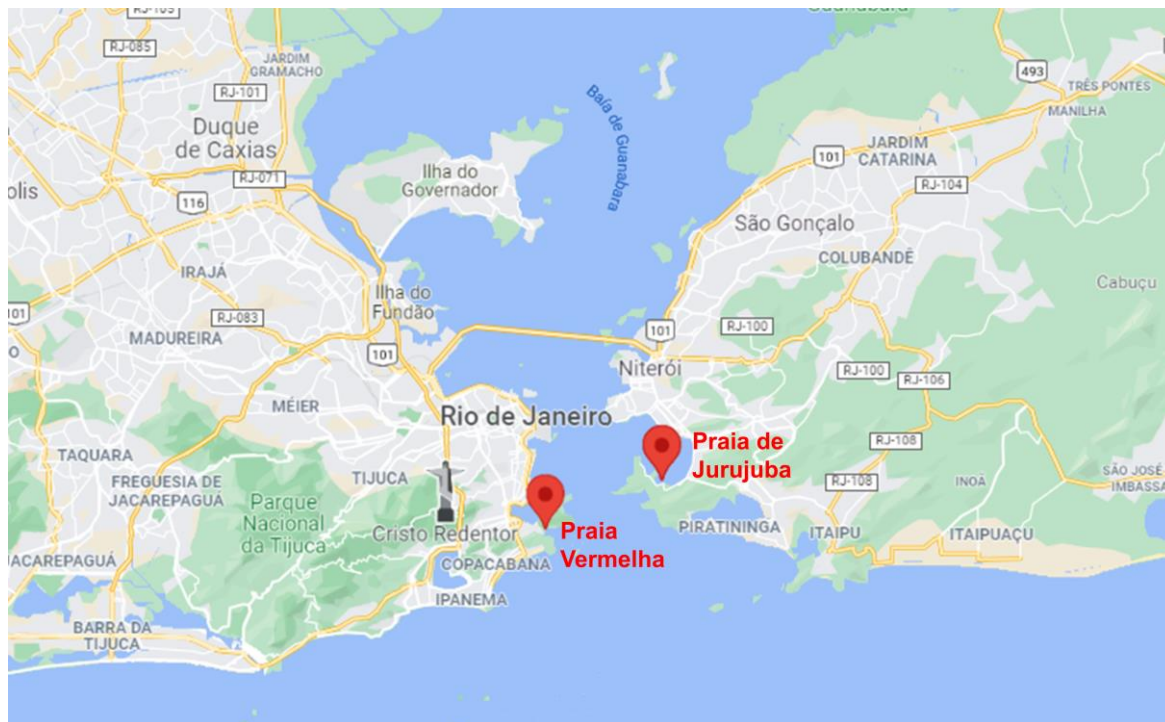


Figura 1. Mapa de parte do estado do Rio de Janeiro, destacando a Praia de Jurujuba, em Niterói, e a Praia Vermelha, no Rio de Janeiro, ambas localizadas na Baía de Guanabara (Adaptado de <https://www.google.com/maps>).

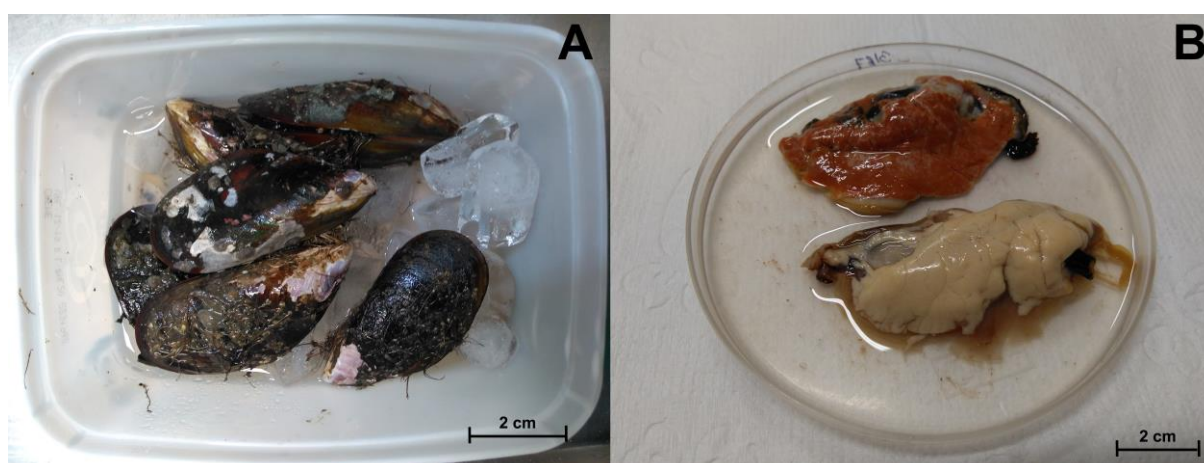


Figura 2. A- Amostras de mexilhões *Perna perna*. B- Exemplos maduros retirados das conchas, com coloração alaranjada na fêmea (exemplar em posição superior) e branco-creme no macho (exemplar em posição inferior). Barra: 2 cm.

4.1.3 Análises moleculares e filogenéticas

A extração de DNA dos mexilhões e esporocistos congelados foi realizada utilizando o Mini Kit QIAamp DNA (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Para os mexilhões, as regiões ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA foram amplificadas usando os *primers* BD1 (5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') e BD2 (5'-TATGCTTAARTTCAGCGGGT-3') (Luton et al. 1992), e os *primers* LCO1490 (5'-GGGTCAACAAAAATCATAAAGATTGGG-3') e HCO2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA-3') foram utilizados para a amplificação do gene mitocondrial citocromo c oxidase-1 (COI) (Folmer et al. 1994). Em relação aos esporocistos, as regiões ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA foram também amplificadas utilizando BD1 e BD2, enquanto que o gene 18S rDNA foi amplificado usando os *primers* SB3a (5'-GGGAGGCAAGTCTGGTGC-3') e A27a (5'-CCATACAAAATGCCCCCGTCTG-3') (Hall 1999) e o 28S rDNA, foi amplificado usando os *primers* LSU5 (5'-TAGGTCGACCCGCTGAAYTAAAGCA-3') e 1500R (5'-GCTATCCTGAGGGAACTTCG-3') (Tkach et al. 2003). Todas as reações em cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas com um total de 15 µl, contendo 7,5 µl de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), 1,5 µl de cada primer com concentração final de 10 pmol, 2,0 µl de água ultrapura e 2,5 µl de DNA da amostra, e os parâmetros de ciclagem foram utilizados conforme descritos pelos autores citados anteriormente.

Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% em Tris-borato de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), corados com SybrGreen DNA Gel Stain (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) e visualizados no transiluminador sob luz ultravioleta (UV). Os amplicons das PCRs foram purificados utilizando o ExoSap-IT (USB® Products Affymetrix Inc., Cleveland, Ohio, EUA). As reações de sequenciamento do ciclo do DNA foram realizadas usando o BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o sequenciamento foi realizado por meio da Plataforma de Sequenciamento (PDTIS) na Fiocruz. As novas sequências geradas de ambas as cadeias foram verificadas e editadas utilizando o software MEGA versão X (Kumar et al. 2018), e depois foram comparadas com outras sequências disponíveis na base de dados do GenBank empregando o programa Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (BLAST) do servidor do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al. 1990). As estimativas de

divergência evolutiva entre as sequências foram realizadas no MEGA X utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros (K2p) (Tamura et al. 2004).

A fim de explorar as relações filogenéticas de cada região de DNA, as sequências nucleotídicas foram alinhadas com o algoritmo CLUSTALW usando o MEGA X (Thompson et al. 1994). As árvores filogenéticas por Inferência Bayesiana (IB) foram conduzidas utilizando a análise da cadeia de Monte Carlo Markov (MCMC) disponível no software BEAST v2.6.3 (Bouckaert et al. 2019). Os parâmetros de probabilidade definidos para a análise Bayesiana foram baseados no teste Akaike Information Criteria (AIC) em jModelTest2 (Nylander 2004). O modelo selecionado foi o GTR para 28S, e o HKY para as regiões 18S e ITS1, 5.8S e ITS2, ambos empregando o modelo de nascimento-morte (BDM). As probabilidades posteriores foram calculadas através de 10.000.000 de gerações, amostrando cada 1.000ª árvore a ser salva. O Tracer v1.7.2 (Rambaut et al. 2018) foi utilizado para validar a convergência e a mistura para assegurar todos os valores efetivos de tamanho de amostra (ESS) superiores a 200. As árvores foram apresentadas como árvores de Credibilidade Máxima (MCC) usando o software TreeAnnotator v2.6.3 após descartar os primeiros 10% como burn-in, e visualizadas usando o programa FigTree v1.4.4 (Rambaut 2018). Para o enraizamento das árvores, as melhores sequências utilizadas como *outgroups* foram *Olssonium turneri* Bray & Gibson, 1980 e *Pleorchis uku* Yamaguti, 1970 para 28S rDNA, *Proctoeces lintoni* Siddiqi & Cable, 1960 e *Proctoeces maculatus* (Looss, 1901) para 18S rDNA e *Pseudolepidipidon balistis* Manter, 1940 para as regiões ITS1, 5.8S e ITS2. As sequências do GenBank utilizadas para a filogenética analisada estão listadas na Tabela 1.

4.1.4 Histologia de *Perna perna*

Os fragmentos dos mantos dos mexilhões foram fixados em álcool 70% ou formalina Millionig de Carson para os procedimentos histológicos de rotina. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz), RJ. Os tecidos foram emblocados em parafina, cortados em secções de 5 µm e montadas em lâminas não silanizadas, que depois foram coradas com hematoxilina-eosina (Carson & Cappellano 2015). A presença de esporocistos e cercárias nos tecidos foi avaliada sob um microscópio de luz Leica DM LS2 e fotografadas utilizando a câmera acoplada Moticam 10 mp e software Motic images plus v. 2.0 (Motic China Group Co.).

Tabela 1. Trematódeos digeneos utilizados nas análises filogenéticas com os seus respectivos números de acesso no GenBank.

Espécies	28S rDNA	18S rDNA	ITS1-5.8S-ITS2 rDNA
<i>Bucephalus cynoscion</i> Hopkins, 1956	KT273397	-	KT273396; KT273397
<i>Bucephalus gorgon</i> (Linton, 1905)	KT273400	-	KT273400
<i>Bucephalus margaritae</i> Ozaki & Ishibashi, 1934	KT273395	-	KT273395
<i>Bucephalus polymorphus</i> von Baer, 1827	AY289248	-	AY289241
<i>Dicrogaster contracta</i> Looss, 1902	-	FJ211255; FJ211256	-
<i>Dollfustrema durum</i> Nolan, Curran, Miller, Cutmore, Cantacessi & Cribb, 2015	KT213572	-	-
<i>Dollfustrema hefeiense</i> Liu in Zhang et al., 1999	KT273386	-	KT273386
<i>Dollfustrema vaneyi</i> (Tseng, 1930)	-	-	EF198191
<i>Grammatorcynicola brayi</i> Bott & Cribb, 2005	KT213573	-	-
<i>Grammatorcynicola nolani</i> Bott & Cribb, 2005	KT213574	-	-
<i>Heterobucephalopsis perardua</i> Nolan, Curran, Miller, Cutmore, Cantacessi & Cribb, 2015	KT213571	-	-
<i>Heterobucephalopsis yongi</i> Cutmore, Nolan & Cribb, 2018	MH754949	-	-
<i>Megasolena</i> sp.	-	JQ782538	-
<i>Olssonium turneri</i> Bray & Gibson, 1980	AY222283	-	-
<i>Parabucephalopsis parasiluri</i> Wang, 1985	AB640884	-	-
<i>Paurorhynchus hiodontis</i> Dickerman, 1954	KT273401	-	-
<i>Pleorchis uku</i> Yamaguti, 1970	DQ248216	-	-
<i>Proctoeces lintoni</i> Siddiqi & Cable, 1960	-	JQ782521	-
<i>Proctoeces maculatus</i> (Looss, 1901)	-	AY222161	-
<i>Prosorhynchoides</i> sp.	LC498576	JQ782530; JQ782531; JQ782533	-
<i>Prosorhynchoides apogonis</i> Bott & Cribb, 2005	KT213576	-	-
<i>Prosorhynchoides borealis</i> Bartoli, Gibson & Bray, 2006	-	JN182208	JN182210; JN182212
<i>Prosorhynchoides caecorum</i> (Hopkins, 1956)	KT273393	-	KT273392
<i>Prosorhynchoides carvajali</i> Muñoz & Bott, 2011	-	JQ782535	-
<i>Prosorhynchoides cutmorei</i> Hammond, Cribb & Bott, 2018	MG953232	-	-
<i>Prosorhynchoides galaktionovi</i> Hammond, Cribb, Nolan & Bott, 2019	MN310396	-	-
<i>Prosorhynchoides gracilescens</i> (Rudolphi, 1819)	AY222224	AJ228789	-
<i>Prosorhynchoides longoviferus</i> (Manter, 1940)	KT273387	-	KT273387
<i>Prosorhynchoides megacirrus</i> (Rigglin & Sparks, 1962)	KT273391	-	KT273391

Tabela 1. Trematódeos digeneos utilizados nas análises filogenéticas com os seus respectivos números de acesso no GenBank [Continuação].

Espécies	28S rDNA	18S rDNA	ITS1-5.8S-ITS2 rDNA
<i>Prosorhynchoides kohnae</i> Hammond, Cribb, Nolan & Bott, 2019	MN310397	-	-
<i>Prosorhynchoides moretonensis</i> Hammond, Cribb & Bott, 2018	MG953230	-	-
<i>Prosorhynchoides ovatus</i> (Linton, 1900)	KT273399	-	KT273399
<i>Prosorhynchoides ozakii</i> (Nagaty, 1937)	AB640885	-	-
<i>Prosorhynchoides paralichthydis</i> (Corkum, 1961)	KT273398	-	KT273398
<i>Prosorhynchoides scomberomorus</i> (Corkum, 1968)	KT273389	-	KT273388
<i>Prosorhynchoides waeschenbachae</i> Hammond, Cribb & Bott, 2018	MG953231	-	-
<i>Prosorhynchus longisaccatus</i> Durio & Manter, 1968	KT213575	-	-
<i>Prosorhynchus pacificus</i> Manter, 1940	KT273385	-	KT273385
<i>Pseudolepidapedon balistis</i> Manter, 1940	-	-	KJ820760
<i>Rhipidocotyle angusticollis</i> Chandler, 1941	KT273383	-	KT273383
<i>Rhipidocotyle campanula</i> (Dujardin, 1845)	JQ346713	-	-
<i>Rhipidocotyle fennica</i> Gibson, Taskinen & Valtonen, 1992	KM068119	-	-
<i>Rhipidocotyle galeata</i> (Rudolphi, 1819)	AY222225	AY222119	-
<i>Rhipidocotyle lepisostei</i> Hopkins, 1954	KT273390	-	-
<i>Rhipidocotyle transversale</i> Chandler, 1935	KT273394	-	KT273394
<i>Rhipidocotyle tridecapapillata</i> Curran & Overstreet, 2009	KT273384	-	-
<i>Saccocoelium brayi</i> Blasco-Costa, Balbuena, Raga, Kostadinova & Olson, 2010	-	FJ211227	-
<i>Saccocoelium tensusum</i> Looss, 1902	-	FJ211252	-

4.2 Resultados

Os 69 mexilhões analisados mediram de 60 a 121 ($86,1 \pm 14,4$) mm em comprimento total e pesaram 15,5 a 113,6 ($49,3 \pm 21,9$) g. Foram identificados 36 fêmeas e 32 machos; não foi possível identificar o sexo de um indivíduo. A análise molecular confirmou que a espécie hospedeira era *P. perna* e novas sequências das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 e COI foram depositadas no GenBank sob os números de acesso OK560853 e OK559744, respectivamente.

A análise sob estereomicroscópio indicou que 16 dos 69 (23,2%) mexilhões estavam infectados com esporocistos de filamentos alaranjados/avermelhados. Alguns esporocistos eram menos volumosos e apresentavam uma pigmentação menos intensa do que outros. Treze dos mexilhões infectados eram machos, dois eram fêmeas e um era de sexo indeterminado (Figura 3A). Os locais de infecção incluíram 100% no manto (16/16), 43,7% na massa visceral (7/16), 37,5% nas brânquias (6/16), 37,5% na glândula digestiva (6/16) e 31,2% no músculo (5/16). Em comparação, a análise histopatológica indicou 13 indivíduos parasitados (18,8%), 12 previamente determinados como infectados na análise estereomicroscópica (nove machos, duas fêmeas, e um indeterminado). As cargas parasitárias no manto foram variáveis nos 13 mexilhões parasitados detectados no exame histopatológico, nove exibindo mais de 50% de tecido parasitado e três com 5 a 50% de tecido parasitado. Além disso, uma fêmea não detectada anteriormente como infectada na análise estereomicroscópica exibiu uma baixa carga parasitária (< 5%), como revelado pela avaliação histopatológica (Figura 3B-D). A análise estereomicroscópica detectou quatro casos positivos não detectados pela histopatologia. O aumento da carga parasitária levou a um aumento da substituição do tecido do bivalve por massas esporocísticas. Portanto, considerando ambos os métodos de análise (histopatológico e estereomicroscópico), a prevalência global da infecção foi de 24,6% (17/69), 13 machos (76,5%), 3 fêmeas (17,6%), e 1 indeterminada (5,9%). O comprimento total da concha de todos os mexilhões parasitados variou de 77 a 121 ($91,8 \pm 11,5$) mm, com as maiores incidências de mexilhões parasitados nas classes de tamanho de 80 a 89 mm e 90 a 99 mm (Tabela 2). O exame histopatológico indicou esporocistos e/ou cercárias de trematódeos dentro dos tecidos conjuntivos dos mexilhões sem reações inflamatórias associadas. Não foram observadas gônadas masculinas ou femininas no manto de 77% (10/13) de mexilhões

parasitados, oito (80%) com mais de 50% de tecido parasitado e dois (10%) com 5 a 50% de tecido parasitado. Com relação aos mexilhões não parasitados, não foram observadas gônadas em 4% (2/56). Estes dois indivíduos, contudo, foram classificados como parasitados na análise estereomicroscópica.

Tabela 2. Quantidade de mexilhões *Perna perna* coletados e parasitados de acordo com a classe de tamanho da concha.

Classe de tamanho (mm)	Número de mexilhões coletados	Número de mexilhões parasitados
60 – 69	10	0 (0%)
70 – 79	13	2 (11,8%)
80 – 89	15	6 (35,3%)
90 – 99	19	5 (29,4%)
100 – 109	8	3 (17,6%)
110 – 119	3	0 (0%)
120 – 129	1	1 (5,9%)
Total	69	17

Os esporocistos eram filamentosos com dilatações irregulares, contendo no seu interior cercárias transparentes em diferentes fases de desenvolvimento (Figura 3B–E). O corpo da cercária, dorsoventralmente achatado, media $147 \times 94 \mu\text{m}$, com órgão cefálico alongado na extremidade anterior. Cauda na extremidade posterior do corpo medindo $36 \times 80 \mu\text{m}$; cauda bifurcada com braços laterais longos (furca) mediu $240 \mu\text{m}$ quando contraída, mas podem estender-se muito mais vezes o comprimento do corpo. A boca no meio do corpo, rodeada por uma pequena faringe muscular, era compatível com espécies de Bucephalidae Poche, 1907 (Figura 3F). Os peixes examinados não continham parasitos bucefalídeos.

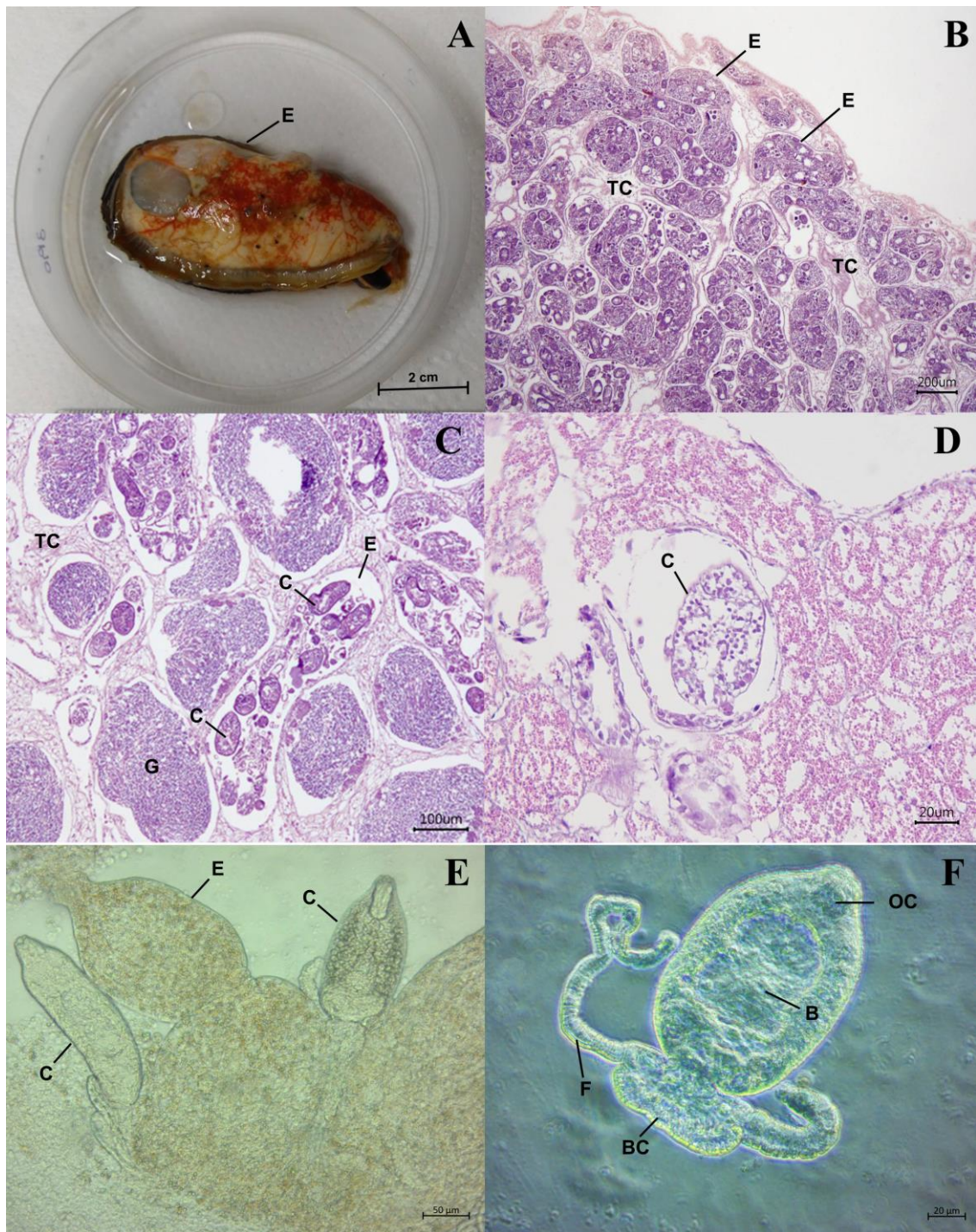


Figura 3. Micrografias de *Prosrhynchoides* sp.: A- Esporocistos filamentosos alaranjados/avermelhados sobre o manto de um *Perna perna* macho. B–D- Descobertas histológicas no manto de mexilhões parasitados por *Prosrhynchoides* sp. corados com hematoxilina-eosina. B- Macho com mais de 50% do tecido conjuntivo do manto parasitado por esporocistos de trematódeo. Ausência de reações inflamatórias associadas ao parasitismo e gônadas. C- Macho com mais de 50% do tecido conjuntivo do manto parasitado por esporocistos de trematódeo. Detalhe dos esporocistos que contêm várias cercárias no tecido conjuntivo entre as gônadas. Não é observada qualquer reação inflamatória associada ao parasitismo detectado. D- Cercária no tecido conjuntivo do manto de um mexilhão fêmea com menos de 5% de manto parasitado. Não é observada qualquer reação inflamatória associada ao parasitismo detectado. E- Cercárias emergindo de esporocistos. F- Cercária infecciosa totalmente desenvolvida. Abreviaturas: base da cauda (BC), boca (B), cercárias (C), esporocistos (E), furca (F), gônadas (G), órgão cefálico (OC) e tecido conjuntivo (TC).

No total, foram obtidas 11 sequências dos esporocistos encontrados nos mexilhões, sendo duas parciais do 28S rDNA (números de acesso: OK429320 e OK429321), seis parciais do 18S (OK429323, OK429324, OK429325, OK429326, OK429327 e OK429328) e três das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 (OK429329, OK429330 e OK429331). Os valores estimados da divergência genética usando a distância-p entre as nossas sequências das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 foram de 0,2%, com OK429330 diferindo por dois nucleotídeos. Nenhuma variação intraespecífica foi notada para as sequências 28S e 18S (Tabela 3). As análises moleculares tanto dos esporocistos como das cercárias obtidas neste estudo foram compatíveis com espécies pertencentes ao gênero *Prosorhynchoides* Dollfus, 1929.

A sequência mais próxima da 28S rDNA no GenBank de acordo com BLAST foi *Prosorhynchoides moretonensis* Hammond, Cribb & Bott, 2018, com uma identidade de 97,2%. A distância K2p foi de 2,9% com 30 nucleotídeos divergentes de um total de 1059 pb. A sequência para *Prosorhynchoides paralichthydis* (Corkum, 1961), embora com 96,5% de semelhança, apresentava uma distância de K2p inferior (2,4%). Para a sequência parcial do 18S rDNA, a identidade com *Prosorhynchoides borealis* Bartoli, Gibson & Bray, 2006 foi de 98,8% para 415 pb com uma distância de K2p de 1,2% (5 nucleotídeos divergentes). Para os ITS1, 5,8S e ITS2 rDNA, *P. paralichthydis* mostrou uma distância K2p de 6,0-6,1%, com 69 nucleotídeos divergentes e 93,7-93,8% de identidade em 972 pb. *Prosorhynchoides borealis* exibiu uma distância de K2p que variou entre 5,6-8,0% (Tabela 3).

A análise por IB do 18S rDNA indicou que *P. borealis* e *Prosorhynchoides gracilescens* (Rudolphi, 1819) eram as espécies mais próximas da nova sequência, com suporte de um (Figura 4). Com relação às regiões 28S rDNA e ITS1, 5.8S e ITS2, as análises produziram topologias semelhantes, com as novas sequências formando um clado com *Prosorhynchoides ovatus* (Linton, 1900), *P. paralichthydis* e *Bucephalus gorgon* (Linton, 1905). No entanto, na árvore filogenética para ITS1, 5.8S e ITS2, as novas sequências e *P. paralichthydis* estavam ainda mais próximas com um suporte de 0,97 (Figuras 5–6). Espécies pertencentes aos gêneros *Prosorhynchoides*, *Bucephalus* e *Rhipidocotyle* Diesing, 1858 foram agrupadas em diferentes clados e quase todos os ramos tiveram bons suportes, representando grupos polifiléticos. Nenhuma sequência idêntica para o esporocisto aqui estudado foi encontrada na base de dados do GenBank e a análise por IB indicou ser uma espécie diferente que ocorre na costa do Rio de Janeiro.

Tabela 3. Divergência genética (Kimura 2-parâmetros, expresso em porcentagem) estimada usando as regiões 28S, 18S e ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA entre as espécies *Prosorhynchoides* obtidas do GenBank e as novas sequências relatadas no presente estudo, representadas por (*).

28S rDNA																
OK429320 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)																
OK429321 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)	0,0															
KT273398 <i>Prosorhynchoides paralichthydis</i>	2,4	2,4														
MG953230 <i>Prosorhynchoides moretonensis</i>	2,9	2,9	3,6													
MG953231 <i>Prosorhynchoides waeschenbachae</i>	3,0	3,0	3,3	0,9												
MN310397 <i>Prosorhynchoides kohnae</i>	3,3	3,3	3,5	1,4	1,1											
MG953232 <i>Prosorhynchoides cutmorei</i>	3,3	3,3	3,5	1,8	1,5	1,0										
AY222224 <i>Prosorhynchoides gracilescens</i>	3,5	3,5	3,6	3,9	3,4	4,2	4,0									
MN310396 <i>Prosorhynchoides galaktionovi</i>	3,5	3,5	3,5	1,6	1,3	0,7	1,2	4,0								
KT273399 <i>Prosorhynchoides ovatus</i>	4,1	4,1	4,6	5,1	5,1	5,7	5,6	4,9	5,3							
LC498576 <i>Prosorhynchoides</i> sp.	5,5	5,5	5,9	5,3	5,0	5,4	5,4	5,4	5,4	7,2						
KT273391 <i>Prosorhynchoides megacirrus</i>	7,3	7,3	7,1	7,1	7,0	7,4	7,4	7,2	7,3	8,2	5,1					
KT273393 <i>Prosorhynchoides caecorum</i>	8,0	8,0	7,7	7,2	7,2	7,6	7,6	7,5	7,5	8,1	5,6	1,5				
AB640885 <i>Prosorhynchoides ozakii</i>	8,6	8,6	7,9	7,7	7,6	8,0	8,0	8,6	7,9	9,8	6,9	6,2	7,0			
KT273389 <i>Prosorhynchoides scomberomorus</i>	9,6	9,6	8,8	8,7	8,9	9,4	9,5	9,4	9,5	10,5	8,0	6,7	6,5	6,1		
KT273387 <i>Prosorhynchoides longoviferus</i>	9,9	9,9	9,4	9,4	9,3	10,3	10,3	10,5	10,1	10,9	8,4	7,4	8,3	6,9	6,1	
KT213576 <i>Prosorhynchoides apogonis</i>	10,0	10,0	9,7	10,4	10,4	10,6	10,3	10,8	10,6	11,2	10,4	12,7	12,7	13,0	12,7	13,4
18S rDNA																
OK429323 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)																
OK429324 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)	0,0															
OK429325 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)	0,0	0,0														
OK429326 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)	0,0	0,0	0,0													
OK429327 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)	0,0	0,0	0,0	0,0												
OK429328 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0											
JN182208 <i>Prosorhynchoides borealis</i>	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2									

Tabela 3. Divergência genética (Kimura 2-parâmetros, expresso em porcentagem) estimada usando as regiões 28S, 18S e ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA entre as espécies *Prosorhynchoides* obtidas do GenBank e as novas sequências relatadas no presente estudo, representadas por (*) [Continuação].

18S rDNA											
AJ228789 <i>Prosorhynchoides gracilescens</i>	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,2				
JQ782535 <i>Prosorhynchoides carvajali</i>	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,8	6,1			
JQ782533 <i>Prosorhynchoides</i> sp.	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,9	7,1	1,5		
JQ782531 <i>Prosorhynchoides</i> sp.	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	7,1	7,4	1,7	0,2	
JQ782530 <i>Prosorhynchoides</i> sp.	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	7,4	7,7	2,0	0,5	0,2
ITS1-5.8S-ITS2 rDNA											
OK429329 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)											
OK429330 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)	0,0										
OK429331 <i>Prosorhynchoides</i> sp. (*)	0,2	0,2									
JN182212 <i>Prosorhynchoides borealis</i>	5,6	5,6	5,6								
KT273398 <i>Prosorhynchoides paralichthydis</i>	6,0	6,0	6,1	6,5							
JN182210 <i>Prosorhynchoides borealis</i>	8,0	8,0	7,9	0,0	7,7						
KT273399 <i>Prosorhynchoides ovatus</i>	9,3	9,3	9,4	7,1	9,0	8,4					
KT273391 <i>Prosorhynchoides megacirrus</i>	14,8	14,8	14,8	12,1	12,6	13,9	16,0				
KT273393 <i>Prosorhynchoides caecorum</i>	17,2	17,2	17,1	13,8	15,2	15,9	17,2	4,6			
KT273387 <i>Prosorhynchoides longoviferus</i>	17,4	17,4	17,5	13,1	16,3	15,9	17,8	13,7	16,0		
KT273388 <i>Prosorhynchoides scomberomorus</i>	18,7	18,7	19,0	13,1	17,0	16,5	17,8	15,9	17,1	11,4	

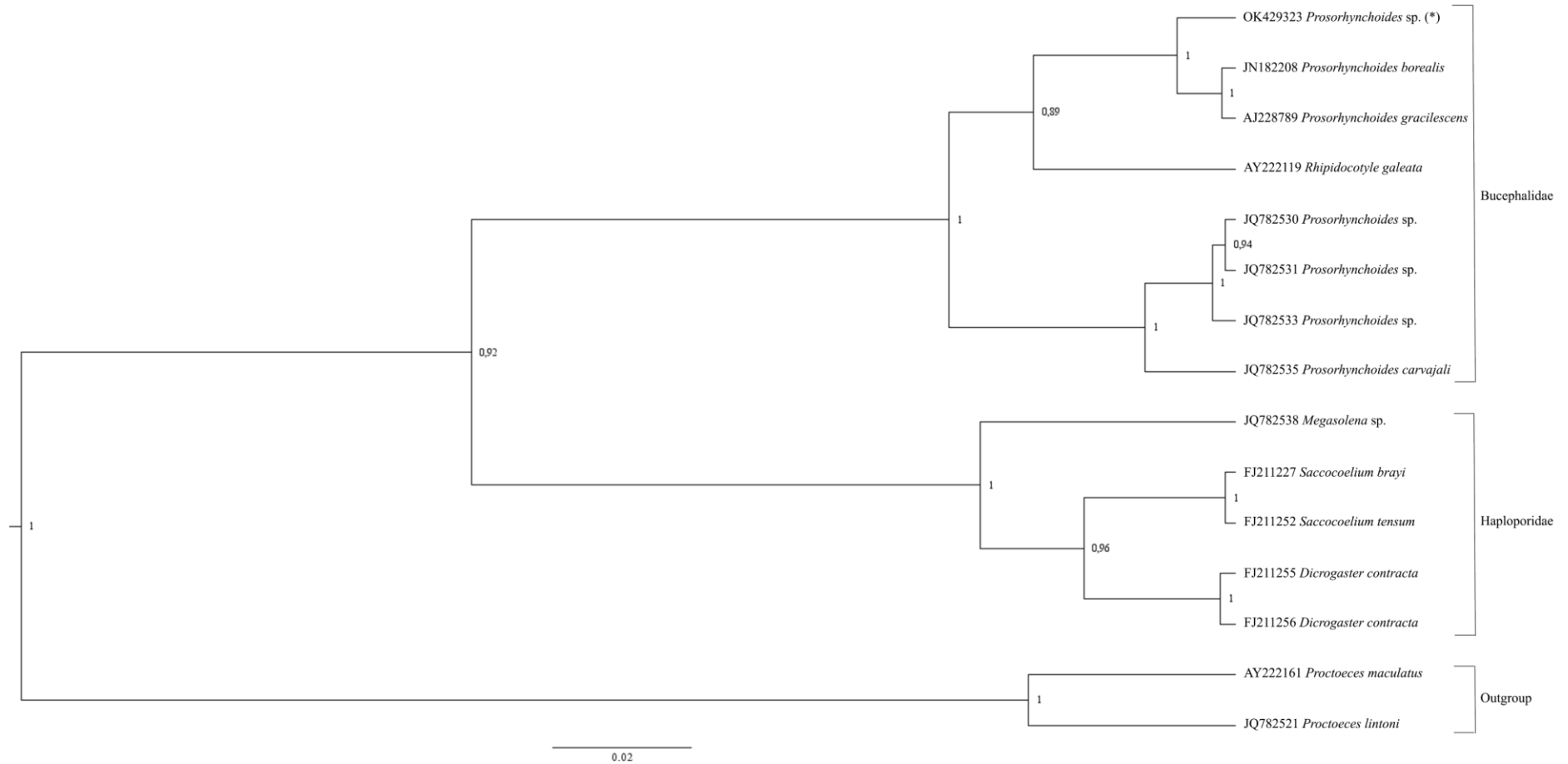


Figura 5. Topologia filogenética Bayesiana de Bucephalidae e famílias estreitamente relacionadas construída a partir do gene 18S rDNA. Os valores de suporte nos nós são mostrados como probabilidades posteriores Bayesianas (> 0,50). A nova sequência é destacada com (*).

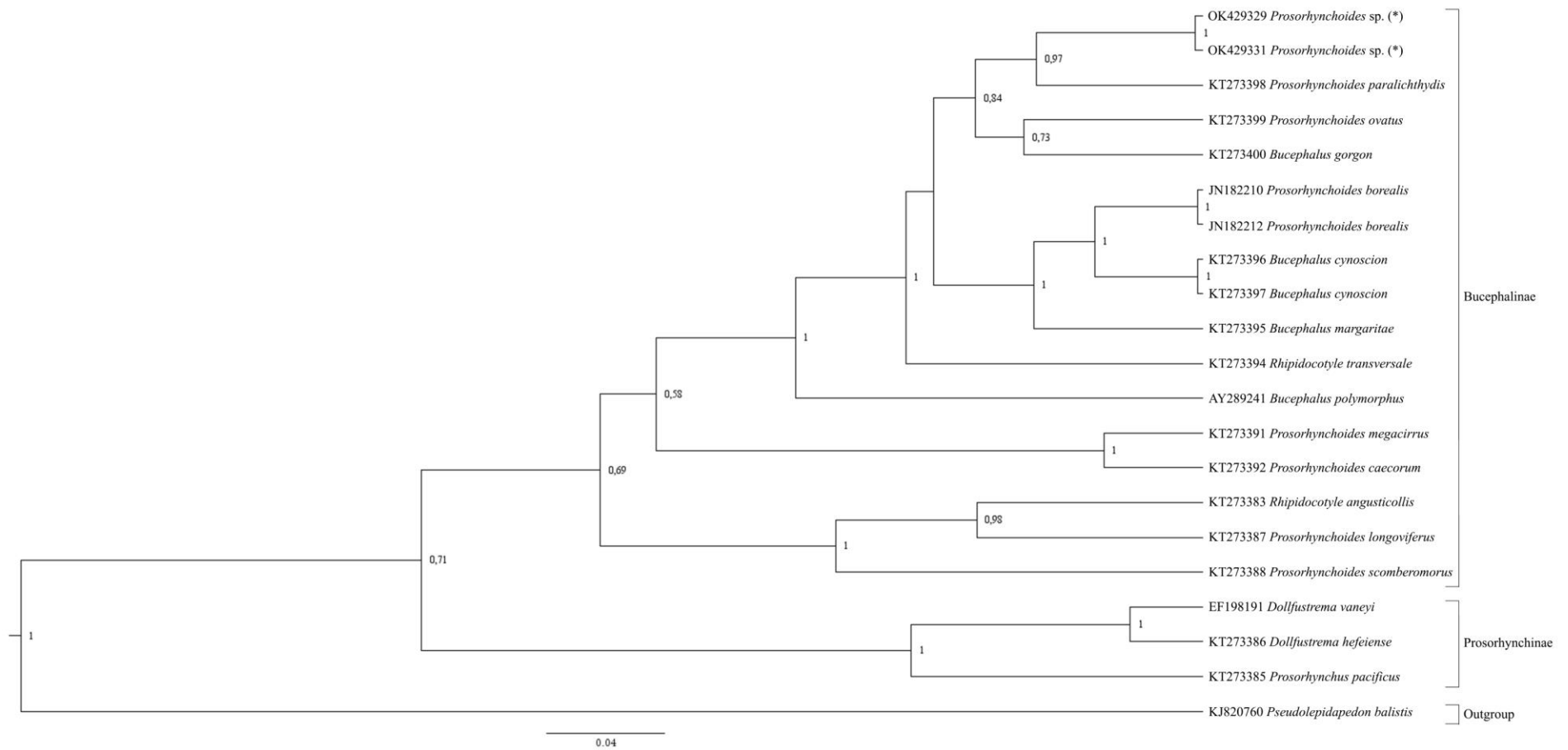


Figura 6. Topologia filogenética Bayesiana de Bucephalinae e subfamílias estreitamente relacionadas construída a partir das regiões ITS1, 5.8S e ITS2. Os valores de suporte nos nós são mostrados como probabilidades posteriores Bayesianas (> 0,50). As novas sequências são destacadas com (*).

4.3 Discussão

Todos os indivíduos de *P. perna* aqui analisados tinham mais de 50 mm de comprimento e, segundo o IBAMA (2006), devem ser classificados como adultos. Os mexilhões maiores e, portanto, mais velhos, são mais propensos a abrigar infecções por bucefalídeos (Lasiak 1993). Isto é corroborado pelos nossos dados, onde as classes de tamanho com maior índice de parasitismo foram as de 80 a 89 mm e 90 a 99 mm. Contudo, as diferenças relacionadas com as classes de tamanho foram relatadas por Magalhães (1998), que identificou os mexilhões parasitados da classe de tamanho de 30 a 40 mm, aumentando gradualmente o número de indivíduos parasitados até à classe de 60 a 70 mm, e diminuindo nas classes de tamanho seguintes.

A intensa coloração alaranjada/avermelhada dos esporocistos nos órgãos internos dos mexilhões machos facilitou a distinção macroscópica entre indivíduos infectados e não infectados. No entanto, é necessária uma avaliação mais cuidadosa no caso das fêmeas, pois, durante o seu período reprodutivo, os mexilhões *P. perna* machos apresentam manto branco cremoso, e as fêmeas, alaranjado (Lunetta 1969; Resgalla Jr et al. 2008). O mexilhão de sexo indeterminado exibia manto transparente, provavelmente associado à fase de esvaziamento dos folículos das gônadas, como relatado por Lunetta (1969), ou devido à castração parasitária (Magalhães 1998), uma vez que este indivíduo estava altamente parasitado.

Lauckner (1983) relatou que tanto os hospedeiros bivalves machos como fêmeas são geralmente infectados e castrados por bucefalídeos em proporções semelhantes e que os esporocistos podem infiltrar-se em praticamente todos os órgãos, com exceção do pé, formando uma rede densamente entrelaçada. Todos os *P. perna* parasitados exibiram esporocistos e cercárias no manto com focos de infecção opcionais noutros órgãos, exceto o pé. Lasiak (1993) também relatou o manto como a principal fonte de infecção, afetando outros órgãos em fases de infecção mais avançadas. Embora o número de fêmeas *P. perna* (36) coletadas neste estudo fosse ligeiramente superior ao dos machos (32), os machos exibiram a maior taxa de infecção (13 machos x 3 fêmeas infectados), em concordância com Addum e Oliveira (2010), que também observaram maior prevalência de bucefalídeos nos machos. De acordo com Magalhães (1998), a preferência do

parasito durante as fases iniciais do ciclo biológico por manto e glândula digestiva dos mexilhões indica a necessidade significativa dos trematódeos por substâncias nutritivas.

As observações parasitológicas estereomicroscópicas indicaram 16 mexilhões parasitados, enquanto apenas 13 foram confirmados na análise histopatológica, provavelmente devido ao tamanho restrito das amostras do manto na parafina. No entanto, uma avaliação histopatológica positiva foi negativa à primeira vista na análise estereomicroscópica, devido às baixas cargas parasitárias. Estes métodos complementares são, portanto, importantes para melhor confirmar o parasitismo de esporocistos e cercárias nos mexilhões.

Embora não tenha sido observada qualquer reação inflamatória associada no manto dos mexilhões parasitados, o intenso parasitismo observado em 69% dos indivíduos analisados pode ter contribuído para a ausência de gônadas em 80% destes moluscos, em contraste com a ausência de gônadas em 4% dos mexilhões não parasitados, tal como revelado pelo exame histopatológico. Esta hipótese é apoiada por outros autores que descreveram a castração de mexilhões parasitados por *Bucephalus* spp. (Magalhães 1998; Silva et al. 2002). Embora o consumo de mexilhões parasitados por bucefalídeos não seja prejudicial para humanos (Resgalla Jr et al. 2008), as possíveis provas de castração em *P. perna* podem comprometer a renovação da população na área de estudo investigada.

A prevalência da infecção por trematódeo em *P. perna* aqui observada foi de 24,6%, próximo do valor reportado por Marchiori et al. (2010) (21,6%), no estado de Santa Catarina, Brasil. Umiji et al. (1976) relataram prevalência mais elevada, variando de 30 a 35%, próximo a costa do estado de São Paulo. No entanto, esta prevalência difere bastante da maioria dos relatos para a costa brasileira, geralmente mais baixa, variando de 1,6 a 16,1% (Lima et al. 2001; Silva et al. 2002; Galvão et al. 2006; Cochôa & Magalhães 2008; Garcia & Magalhães 2008; Addum & Oliveira 2010; Silva et al. 2012; Carneiro-Schaefer et al. 2017; Stakowian et al. 2020). Foram também identificadas baixas prevalências que variam entre 1 a 12% na costa da África do Sul (Lasiak 1993; Calvo-Ugarteburu & McQuaid 1998). Loureiro et al. (2001) notaram uma associação entre o aumento da incidência de parasitas e poluentes ambientais na Baía de Guanabara. Considerando que todos os mexilhões examinados eram adultos e que a área de estudo apresenta sinais de poluição (Fries et al. 2019), não só o tamanho, mas também a qualidade da água

pode ser um fator de interferência no que diz respeito à elevada prevalência de parasitismo aqui observada.

Os dados moleculares baseados nas regiões 28S, 18S e ITS1, 5.8S e ITS2 indicam que as larvas de bucefalídeos observadas em *P. perna* é uma espécie de *Prosorhynchoides*. Atualmente, este gênero compreende 80 espécies aceitas (WoRMS 2021), com *Prosorhynchoides arcuatus* (Linton, 1900) que ocorre no Rio de Janeiro (Kohn 1962), reportado em *P. saltatrix*. No entanto, não há sequências disponíveis para o adulto desta espécie para comparação até a presente data. *Prosorhynchoides carvajali* Muñoz & Bott, 2011, descrito em peixes marinhos do Chile, foi referido em peixes de água doce (*Acestrorhynchus falcistrostris* (Cuvier, 1819)) no estado do Amazonas (Fernandes et al. 2017). A árvore filogenética do 18S rDNA incluiu *P. carvajali* do Chile (Muñoz et al. 2015) e as poucas sequências de bucefalídeos disponíveis no GenBank. A análise por IB considerou *P. borealis* e *P. gracilescens* como as espécies mais próximas em comparação com a larva que parasitava os *P. perna* analisados, enquanto *P. carvajali* foi colocada num clado bem diferenciado.

Relatos anteriores de trematódeos parasitando *P. perna* no Brasil foram relacionados principalmente a *Bucephalus* sp. (Umiji et al. 1976; Lima et al. 2001; Silva et al. 2002; Galvão et al. 2006; Cochôa & Magalhães 2008; Garcia & Magalhães 2008; Addum & Oliveira 2010; Silva et al. 2012; Carneiro-Schaefer et al. 2017; Stakowian et al. 2020). Marchiori et al. (2010) investigaram o ciclo de vida de um parasita e os seus hospedeiros intermediários e definitivo, identificando-o como *Bucephalus margaritae* Ozaki & Ishibashi, 1934, através de estudos experimentais e coletas realizadas ao longo da costa do Sul do Brasil. No entanto, não existem sequências genéticas disponíveis para os espécimes citados nos estudos acima. Uma sequência de *B. margaritae* do México foi incluída nas árvores filogenéticas das regiões 28S e ITS1, 5.8S e ITS2, embora não tenha ficado próxima das novas sequências. *Bucephalus varicus* Manter, 1940 não foi incluída na árvore 28S rDNA, pois foi posteriormente considerada sinônimo de *B. margaritae* por WoRMS (2021).

As sequências de ITS são utilizadas para explorar a validade das espécies, e variações genéticas inferiores a 1,0% entre sequências de espécies digeneas são frequentemente consideradas variações intraespecíficas (Nolan & Cribb 2005). Sendo assim, as três sequências aqui obtidas das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 são da mesma espécie, visto que a variação genética observada foi de apenas 0,2%.

As análises filogenéticas das sequências moleculares aqui obtidas revelaram que o trematódeo detectado em *P. perna*, está inserido num clado bem suportado com representantes da subfamília Bucephalinae, incluindo espécies pertencentes aos gêneros *Prosorhynchoides*, *Bucephalus* e *Rhipidocotyle*. Um resultado polifilético semelhante nesta subfamília foi observado nas árvores filogenéticas de 28S e ITS rDNA relatados em outros estudos (Nolan et al. 2015; Hammond et al. 2020; Shirakashi et al. 2020). Nolan et al. (2015) concluíram que existem problemas claros com a circunscrição destes gêneros, principalmente devido ao fato de algumas espécies terem sido transferidas de um destes três gêneros para outro. Isto explica porque os gêneros não formaram clados monofiléticos nas árvores filogenéticas.

A falta de conhecimento de outros hospedeiros envolvidos no ciclo de vida do parasito na área investigada e a ausência de sequências de formas adultas relacionadas para comparação impossibilitaram a identificação em nível de espécie da larva de *Prosorhynchoides* sp. aqui relatada. No entanto, este estudo contribui para o conhecimento de novas sequências moleculares de *Prosorhynchoides* sp. que parasita *P. perna* na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, localizada na costa Sudeste do Brasil. Outros estudos relativos a este trematódeo em hospedeiros potenciais neste mesmo local devem ser realizados a fim de compreender o seu ciclo de vida e os hospedeiros envolvidos.

5 CAPÍTULO II. Fungos filamentosos associados aos mexilhões

Perna perna

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Coleta e processamento das amostras

Um total de 31 exemplares de *P. perna* foi coletado em fevereiro, março e novembro de 2019, e janeiro de 2020, próximo a Praia de Jurujuba, Niterói, RJ. Os mexilhões foram devidamente acondicionados individualmente em sacos plásticos estéreis selados para evitar a contaminação (Figura 7A). As amostras foram colocadas em uma caixa de poliestireno e encaminhadas ao laboratório. Os animais foram pesados ainda dentro dos sacos para evitar contaminação. Na capela de fluxo laminar, os mexilhões frescos foram lavados externamente com Tween 80 (0,1%) e água destilada estéril (Figura 7B). Após abertura das valvas com espátula estéril, o sexo foi determinado e os órgãos internos de cada indivíduo foram separados (pé, brânquias e glândula digestiva) (Figura 7C). No total, 93 amostras foram numeradas, lavadas com PBS 0,85% e água destilada estéril, centrifugadas, colocadas em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) (Difco™) e cloranfenicol, e incubadas durante sete dias à temperatura ambiente (Santos et al. 2017a). Todas as conchas foram posteriormente medidas.

5.1.2 Identificação dos fungos filamentosos

As colônias de fungos que cresceram foram transferidas para tubos de ensaio com tampa contendo BDA para o isolamento (Figura 8A). Para a identificação dos fungos isolados foi realizada a técnica do ponto de inóculo (Pitt & Hocking 2009): foram utilizadas placas de Petri contendo diferentes meios de cultura (de acordo com a literatura específica para identificação do gênero) e incubadas em câmara climática Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), em diferentes temperaturas, entre 7 a 21 dias: Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA) (Difco™), CYA com sacarose a 20% (CYA20S) e Ágar Extrato de Malte (MEA) (Difco™) a 25 °C, além de uma quarta placa em CYA a 37 °C.

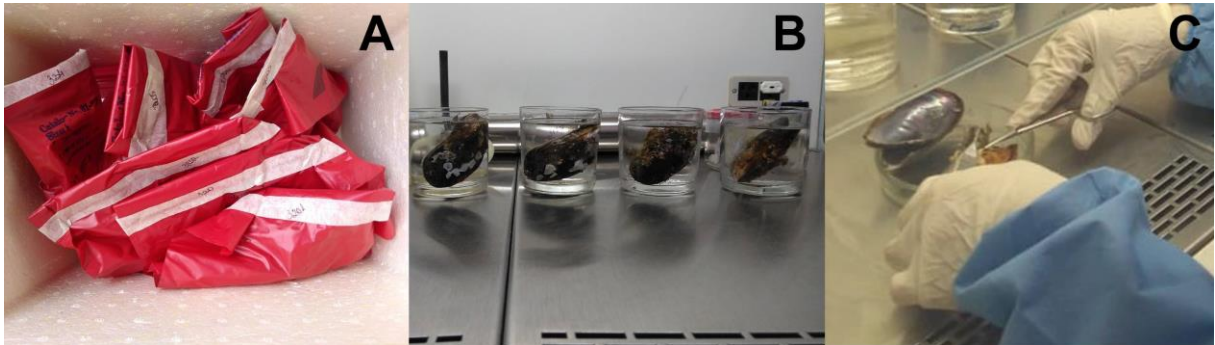


Figura 7. Procedimentos das amostras *Perna perna* para análises dos fungos. A- Mexilhões acondicionados individualmente em sacos plásticos estéreis selados B- Lavagem dos mexilhões na capela de fluxo laminar. C- Dissecção do mexilhão.

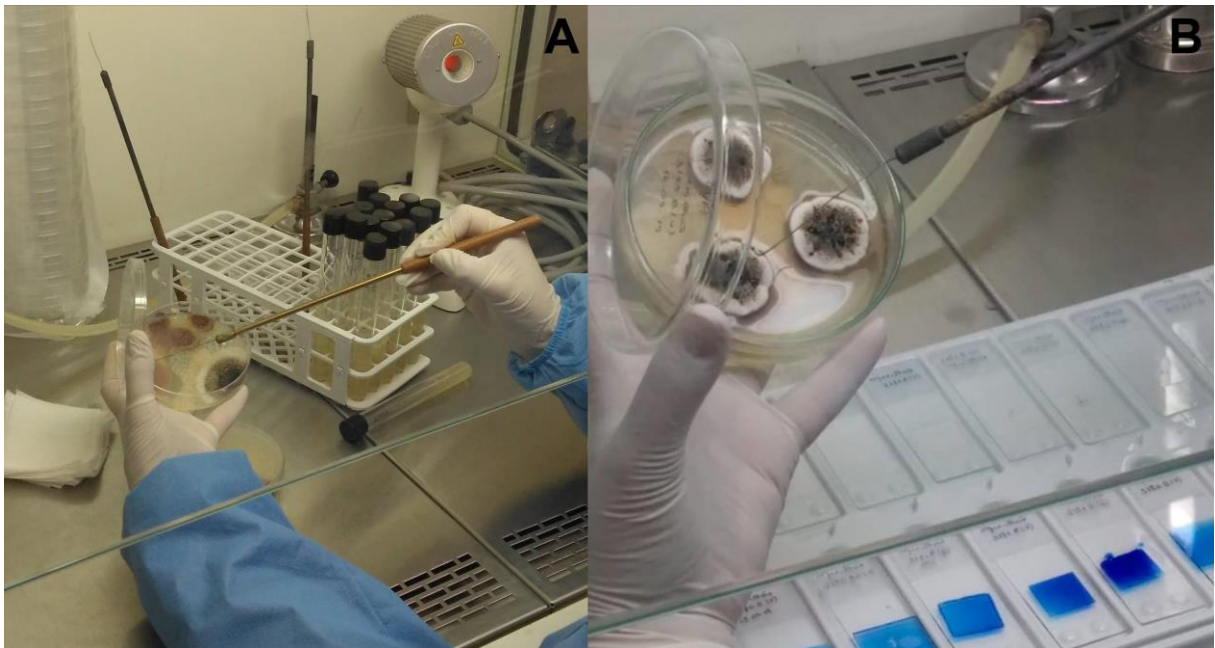


Figura 8. Fungos isolados das brânquias dos mexilhões *Perna perna*. A- Fungos que cresceram em placas de Petri com BDA, sendo isolados em tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura. B- Montagem de lâminas com pequenas porções do fungo que cresceu em CYA.

Após o período de incubação, foi possível verificar as características macroscópicas como textura, grau de esporulação, cores de micélios, pigmentos solúveis, exsudados e reversos de colônias. Posteriormente, lâminas de pequenas porções do material foram coradas com lactofenol com e sem a adição de azul de algodão (Figura 8B) e observadas sob um microscópio óptico Zeiss Axiophot para a identificação das características microscópicas. Foram avaliados: cor, dimensão, forma e textura dos estiletes; presença e forma da vesícula; padrões de ramificação de conidióforos (piálidos solitários a múltiplos níveis de ramificação resultando em padrões globalmente simétricos ou assimétricos); presença ou ausência de mótulas entre vesículas e fiálides; presença, tamanho, forma e ornamentação dos conídios; e ou presença de conídios com e sem hila protuberante. A técnica de microcultivo também foi realizada para melhor análise das características microscópicas (Rivalier & Seydel 1932). As características morfológicas foram fotografadas utilizando a câmera acoplada Moticom 10 mp e software Moticom images plus v. 2.0 (Moticom China Group Co.). As medidas são apresentadas em micrômetros. As espécies/gêneros foram identificadas seguindo as classificações de Raper e Fennell (1965), Ellis (1971, 1976), Pitt (2000), Klich (2002) e Bensch et al. (2012).

Os dados de prevalência e abundância foram avaliados segundo Bush et al. (1997) com modificações onde a prevalência é o número de hospedeiros infectados com um ou mais indivíduos de um determinado gênero de fungo, dividido pelo número total de hospedeiros analisados para aquele fungo; e a abundância é o número de um determinado fungo em relação a cada órgão examinado.

5.1.3 Análises moleculares

Alguns isolados foram repicados em tubos de ensaio contendo BDA. Após sete dias de cultivo, o DNA genômico desses fungos foi extraído de acordo com Ricci et al. (2011). A amplificação do gene 26S rRNA foi realizada utilizando os *primers* NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTTCAAGACGG-3') (Ricci et al. 2011), e os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foram utilizados para as regiões ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA (White et al. 1990). Para o gene 18S rDNA, foram utilizados os *primers* FF2 (5'-GGTTCTATTTTGTGGTTTCTA-3') e FR1 (5'-CTCTCAATCTGTCAATCCTTATT-3') (Zhou et al. 2000) e EF4 (5'-GGAAGGG[G/A]TGTATTTATTAG-3') e EF3 (5'-TCCTCTAAATGACCAAGTTTG-3') (Gontia-Mishra et al. 2014). As PCRs foram

realizadas com um total de 50 µl, contendo 0,5 µl de Taq polimerase, 1,0 µl de cada *primer* com concentração final de 10 pmol, 5,0 µl do tampão kit (10x), 5 µl de dNTP's, 3,0 µl de MgCl₂, 29,5 µl de água ultrapura e 5,0 µl de DNA da amostra, e os parâmetros de ciclagem utilizados foram realizados conforme descritos por Kurtzman e Robnett (1998) e pelos autores citados anteriormente. Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% em EDTA, corados com SybrGreen DNA Gel Stain (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) e visualizados no transiluminador sob UV. Os amplicons da PCR foram purificados utilizando o EasyPure® PCR Purification Kit (TransGen Biotech Co., LTD). As reações de sequenciamento do ciclo do DNA foram realizadas pelo método de Sanger e o sequenciamento foi realizado na Plataforma PDTIS/Fiocruz. As novas sequências geradas de ambas as cadeias foram verificadas e editadas utilizando o software MEGA versão X (Kumar et al. 2018), e depois foram comparadas com outras sequências disponíveis na base de dados GenBank empregando o programa BLAST do NCBI (Altschul et al. 1990).

5.2 Resultados

O comprimento total da concha dos 31 exemplares de *P. perna* variou de 63 a 115 mm, com uma média de $91,6 \pm 11,8$ mm, e o peso do mexilhão variou de 21,62 a 113,6 g, com uma média de $60,7 \pm 20,3$ g. Foram identificados 17 fêmeas e 13 machos. Não foi possível determinar o sexo de um indivíduo devido ao manto transparente.

Aparentemente, nenhuma das amostras mostrou sinais visíveis de contaminação fúngica, porém, após as culturas, a presença de fungos filamentosos foi detectada em 30 dos mexilhões analisados (96,7%). O único mexilhão não contaminado era macho. No total, 84 colônias de fungos foram isoladas. A distribuição entre os órgãos foi: 30 colônias nos pés, 27 nas brânquias e 27 nas glândulas digestivas. Oito destas colônias não foram identificadas devido à ausência de estruturas reprodutivas e foram classificadas como *Mycelia sterilia* (Anexo B).

Considerando pés, brânquias e glândulas digestivas examinadas a partir de 31 mexilhões, totalizando 93 amostras de órgãos, 48,4% (45/93) destes apresentaram apenas um fungo. Contudo, a contaminação múltipla de fungos no mesmo órgão também ocorreu com um a dois fungos nos pés e brânquias e um a quatro na glândula digestiva (Tabela 4).

Tabela 4. Número de diferentes fungos filamentosos por órgão encontrados nos mexilhões *Perna perna* coletados próximos a Praia de Jurujuba, em Niterói, Rio de Janeiro.

Número de fungos	Pé	Brânquias	Glândula digestiva	Total de órgãos
1	16 (69,6%)	19 (82,6%)	10 (58,8%)	45 (48,4%)
2	7 (30,4%)	4 (17,4%)	5 (29,4%)	16 (17,2%)
3	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,9%)	1 (1,1%)
4	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,9%)	1 (1,1%)
Total	23	23	17	

Os fungos foram identificados por meio das características morfológicas macroscópicas e microscópicas, com exceção dos gêneros *Aureobasidium* Viala & Bayer 1891, *Didymella* Saccardo, 1880 e *Phaeoisaria* Höhn, 1909 que precisaram de análises moleculares como complemento. O gênero mais predominante foi *Aspergillus* Micheli, 1729, com um total de 34 colônias que ocorreram em todos os órgãos analisados: 12 nos pés, 13 nas brânquias e 9 na glândula digestiva. *Didymella* apresentou 30 colônias, seguida de *Penicillium* Link 1809 com 9 colônias; estas também foram encontradas nos três órgãos examinados de *P. perna*. *Aureobasidium*, *Cladosporium* Link, 1816 e *Phaeoisaria* apresentaram uma colônia cada na glândula digestiva (Tabela 5).

Tabela 5. Número de colônias de fungos filamentosos por gênero isolados de órgãos de mexilhões *Perna perna* coletados próximos a Praia de Jurujuba, em Niterói, Rio de Janeiro.

Fungos Filamentosos	Pé	Brânquias	Glândula digestiva	Número por gênero
<i>Aspergillus</i> sp.	12	13	9	34 (40,5%)
<i>Didymella</i> sp.	11	11	8	30 (35,7%)
<i>Penicillium</i> sp.	5	2	2	9 (10,7%)
<i>Aureobasidium</i> sp.	0	0	1	1 (1,2%)
<i>Cladosporium</i> sp.	0	0	1	1 (1,2%)
<i>Phaeoisaria</i> sp.	0	0	1	1 (1,2%)
<i>Mycelia sterilia</i>	2	1	5	8 (9,5%)
Total	30	27	27	

Os fungos identificados em nível de espécie foram: *Aspergillus awamori* Nakaz, 1907; *Aspergillus caespitosus* Raper & Thom, 1944; *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom, 1916; *Aspergillus flavipes* (Bainier & Sartory) Thom & Church, 1926; *Aspergillus japonicus* Saito, 1906; *Aspergillus niger* Tiegh, 1867, *Aspergillus sydowii* (Bainier & Sartory) Thom & Church, 1926, *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab. 1908; *Penicillium raistrickii* G. Sm., 1933 e *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal)

G. Arnaud, 1918. Essas espécies e os outros gêneros citados anteriormente são analisados a seguir:

Aspergillus awamori

Local: pé e brânquias.

Total de colônias: 6.

Superfície das colônias é preta em todos os meios de culturas. Colônias com 60 a 68 mm de diâmetro em CYA a 25 °C; reverso sulcado creme. Colônias com 58 a 63 mm de diâmetro em MEA a 25 °C; reverso preto a cinza. Colônias com 40 a 45 mm de diâmetro com borda branca e tons amarelados em CYA20S a 25 °C; reverso amarelado. Colônias com 50 a 58 mm de diâmetro em CYA a 37 °C; reverso preto escuro com borda amarelada (Figura 9A-B). Vesículas globosas com conídios marrons e paredes variando de lisas a levemente rugosas (Figura 9C).

Aspergillus caespitosus

Local: pé e glândula digestiva.

Total de colônias: 5.

Colônias sulcadas atingindo 25 a 26 mm de diâmetro em CYA, e 33 a 34 mm de diâmetro em CYA20S a 25 °C; coloração da superfície verde a branco, e do reverso, amarelado. Colônias lisas verde com borda branca na superfície e no reverso, atingindo 18 a 20 mm de diâmetro em MEA a 25 °C. Não houve crescimento em CYA a 37 °C (Figura 10A-B). Conídios levemente rugosos esverdeados (Figura 10C).

Aspergillus carbonarius

Local: pé.

Total de colônias: 1.

Superfície das colônias preta em todos os meios de culturas. Colônias sulcadas com cor creme no reverso, atingindo 45 a 60 mm de diâmetro em CYA, e 65 a 68 mm de diâmetro em CYA20S a 25 °C. Colônias atingindo 55 a 70 mm de diâmetro em MEA a 25 °C; reverso cinza. Colônias atingindo 43 a 54 mm de diâmetro em CYA a 37 °C; reverso com cinza a amarelado, borda branca (Figura 11A-B). Conidióforo com conídios rugosos marrons a pretos (Figura 11C), vesículas maiores com métulas e fiálides, e conidióforos com parede lisa. Conídios maiores do que 7 µm.

Aspergillus flavipes

Local: pé.

Total de colônias: 1.

Colônias sulcadas rosadas com tons verdes e brancos, atingindo 28 a 30 mm de diâmetro com exsudatos marrons em CYA a 25 °C. Colônias com coloração verde e branco também sulcadas, atingindo 43 a 45 mm de diâmetro em CYA20S a 25 °C, pigmentos solúveis. A coloração do reverso de ambos os meios de cultura era vermelha/marrom. Colônias verdes atingindo 21 a 25 mm de diâmetro em MEA a 25 °C; reverso esverdeado com borda branca. Não houve crescimento em CYA a 37 °C (Figura 12A-B). Conídios esverdeados (Figura 12C).

Aspergillus japonicus

Local: glândula digestiva.

Total de colônias: 1.

Colônias pretas a cinza na superfície atingindo 66 a 68 mm de diâmetro em CYA20S a 25 °C; reverso pálido a amarelado (Figura 13A-B). Cabeças conidiais unisseriadas, conídios marrons claros predominantemente lisos e vesícula globosa (Figura 13C).

Aspergillus niger

Local: pé, brânquias e glândula digestiva.

Total de colônias: 8.

Superfície das colônias preta em todos os meios de culturas. Colônias atingindo 50 a 60 mm de diâmetro em CYA, e 58 a 62 mm de diâmetro em CYA20S a 25 °C. O reverso de ambos os meios era levemente amarelado. Colônias atingindo 50 a 60 mm de diâmetro em MEA a 25 °C; reverso preto com tons brancos. Colônias atingindo 55 a 60 mm de diâmetro em CYA a 37 °C; reverso preto escuro com tons amarelados (Figura 14A-B). Cabeças conidiais unisseriadas, conídios rugosos a espinhosos e menores, com coloração marrom escuro a preto (Figura 14C).

Aspergillus sydowii

Local: pé, brânquias e glândula digestiva.

Total de colônias: 3.

Colônias sulcadas de coloração verde, branco e rosado atingindo 19 a 20 mm de diâmetro com exsudados vermelhos a marrons em CYA a 25 °C; a coloração do

reverso era vermelha/marrom com pigmentação difusa da mesma cor. Colônias em CYA20S a 25 °C semelhantes a CYA, porém, sem exsudados e coloração rosa, atingindo 33 a 35 mm de diâmetro, com pigmentos solúveis. Colônias atingindo 22 a 23 mm de diâmetro em MEA a 25 °C; reverso pálido para amarelo. Em todos esses meios, o reverso tem borda branca. Não houve crescimento em CYA a 37 °C (Figura 15A-B). Conídios esverdeados (Figura 15C).

Aspergillus versicolor

Local: brânquias.

Total de colônias: 4.

Colônias sulcadas de coloração verde e branca atingindo 22 a 23 mm de diâmetro com exsudados vermelhos a marrons em CYA a 25 °C; a coloração do reverso era vermelha/marrom com pigmentação difusa da mesma cor. Colônias em CYA20S a 25 °C semelhantes a CYA, porém, sem exsudados, atingindo 30 a 33 mm de diâmetro. Colônias atingindo 18 a 20 mm de diâmetro em MEA a 25 °C; reverso pálido para amarelo. Em todos esses meios, o reverso com borda branca. Não houve crescimento em CYA a 37 °C (Figura 16A-B). Conídios bastante rugosos, coloração cinza esverdeado (Figura 16C).

Didymella sp.

Local: pé, brânquias e glândula digestiva.

Total de colônias: 30.

Colônias marrons com bordas brancas em todos os meios de cultura, e o reverso com pigmentação escura da mesma cor. Colônias sulcadas atingindo 48 a 50 mm de diâmetro em CYA, e 40 a 41 mm de diâmetro em CYA20S a 25 °C. Colônias aveludadas atingindo 45 a 48 mm de diâmetro em MEA a 25 °C. Não houve crescimento em CYA a 37 °C (Figura 17A-B). Micélios fortemente pigmentos. Presença de pinicídios (Figura 17C). Foram obtidas duas sequências moleculares, sendo uma parcial do 26S rDNA (número de acesso: ON246999) e outra, das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 (ON247031).

Penicillium raistrickii

Local: pé e glândula digestiva.

Total de colônias: 2.

Colônias verdes na superfície e amareladas no reverso, ambos com bordas brancas, em todos os meios de cultura. Colônias sulcadas atingindo 35 a 40 mm de diâmetro com exsudados transparentes em CYA a 25 °C, e 43 a 45 mm de diâmetro em CYA20S a 25 °C. Colônias lisas com crescimento mais lento em MEA a 25 °C, atingindo 23 a 25 mm de diâmetro. Não houve crescimento em CYA a 37 °C (Figura 18A-B). Conidióforos com conídios redondos e lisos (Figura 18C).

Cladosporium sp.

Local: glândula digestiva.

Total de colônias: 1.

Colônias verdes escuras com borda branca na superfície e no reverso em todos os meios de cultura. Colônias sulcadas atingindo 26 a 29 mm de diâmetro em CYA, e 30 a 31 mm de diâmetro em CYA20S a 25 °C. Colônias lisas atingindo 12 a 15 mm de diâmetro em MEA a 25 °C. Não houve crescimento em CYA a 37 °C (Figura 19A-B). Presença de hifas septadas com pigmentação e conídios redondos (Figura 19C). Formam estruturas escuras quando ocorre a ruptura das hifas, tanto as células conidiógenas como as conídias exibem locus conidiógenos (cicatrizes) com uma estrutura coronária única. Há células de conexão.

Phaeoisaria sp.

Local: glândula digestiva.

Total de colônias: 1.

Colônias lisas verdes na superfície e no reverso, atingindo 13 a 18 mm de diâmetro em CYA, 12 a 20 mm de diâmetro em MEA, e 5 a 7 mm de diâmetro em CYA20S, todos a 25 °C. O reverso das colônias em MEA com pigmentação escura. Não houve crescimento em CYA a 37 °C (Figura 20A-B). Células conidiógenas marrons claras, aciculares ou cilíndricas com parte apical afunilada. Presença de hifas septadas (Figura 20C). Foram obtidas duas sequências moleculares, sendo uma parcial do 26S rDNA (ON246998) e outra, parcial do 18S rDNA (ON246995).

Aureobasidium pullulans

Local: glândula digestiva.

Total de colônias: 1.

Após o isolamento do fungo com coloração marrom no tubo de ensaio em BDA (Figura 21A), não houve crescimento em nenhuma das quatro placas.

Presença de arthroconídios negros em BDA a 25 °C (Figura 21B). Foram obtidas duas sequências moleculares, sendo uma parcial da 18S (ON246994) e outra, das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 (ON247030).

5.3 Discussão

Os espécimes de *P. perna* da Praia de Jurujuba exibiram grande riqueza de espécies de fungos filamentosos nos órgãos internos. Todos os mexilhões analisados tinham mais de 50 mm de comprimento e, portanto, foram considerados adultos e adequados para comercialização e para consumo humano. A poluição ambiental pode influenciar na quantidade e na diversidade de fungos (Wellbaum et al. 2007). Os mexilhões aqui examinados foram obtidos numa área que apresenta sinais de poluição (Fries et al. 2019), o que reforça a importância de investigar a presença de fungos em *P. perna*.

Os gêneros aqui encontrados são membros do maior filo do Reino Fungi, o Ascomycota. Os ascomicetos são conhecidos por abrangerem fungos de importância ecológica e econômica, alguns são comestíveis e outros atuam como agentes patógenos (Watkinson et al. 2015). A taxonomia atual reconhece 339 espécies de *Aspergillus*, 46 espécies de *Aureobasidium*, 218 espécies de *Cladosporium*, 495 espécies de *Didymella*, 354 espécies de *Penicillium* e 39 espécies de *Phaeoisaria* (Samson et al. 2014; Visagie et al. 2014; Bensch et al. 2018; Index Fungorum 2022).

Os diferentes meios de cultura utilizados influenciaram nas características morfológicas para o mesmo fungo devido aos diferentes nutrientes e temperaturas, como esperado. Apenas *Aspergillus* pertencentes à sessão *Nigri* (*Aspergillus* negros) cresceram em CYA a 37 °C. Os meios CYA e MEA são os meios de cultura mais recomendáveis para a identificação e caracterização, principalmente para *Aspergillus* e *Penicillium* (Samson et al. 2014; Visagie et al. 2014). Todos os fungos filamentosos aqui isolados foram cultivados nas quatro placas, no entanto, só foram obtidas colônias puras de *A. japonicus* em CYA20S. Por isso, foi possível somente obter a imagem dessa placa.

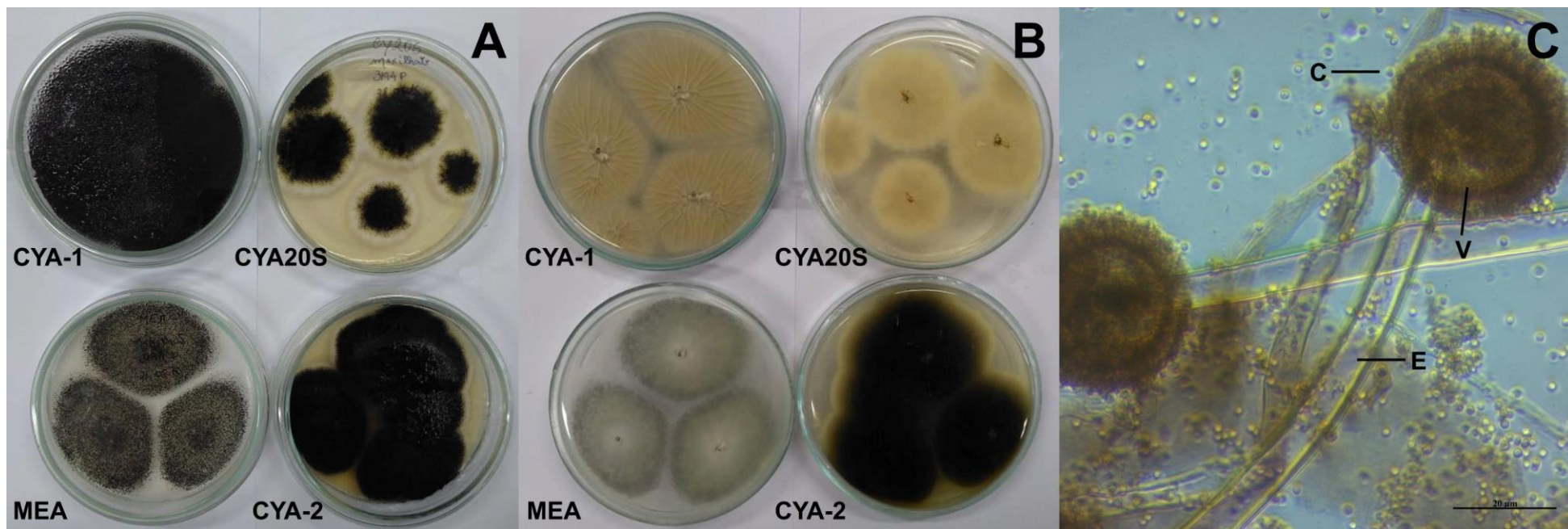


Figura 9. Características morfológicas de *Aspergillus awamori* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios marrons e vesícula, coloração lactofenol em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); estipe (E) e vesícula (V). Barra: 20 µm.

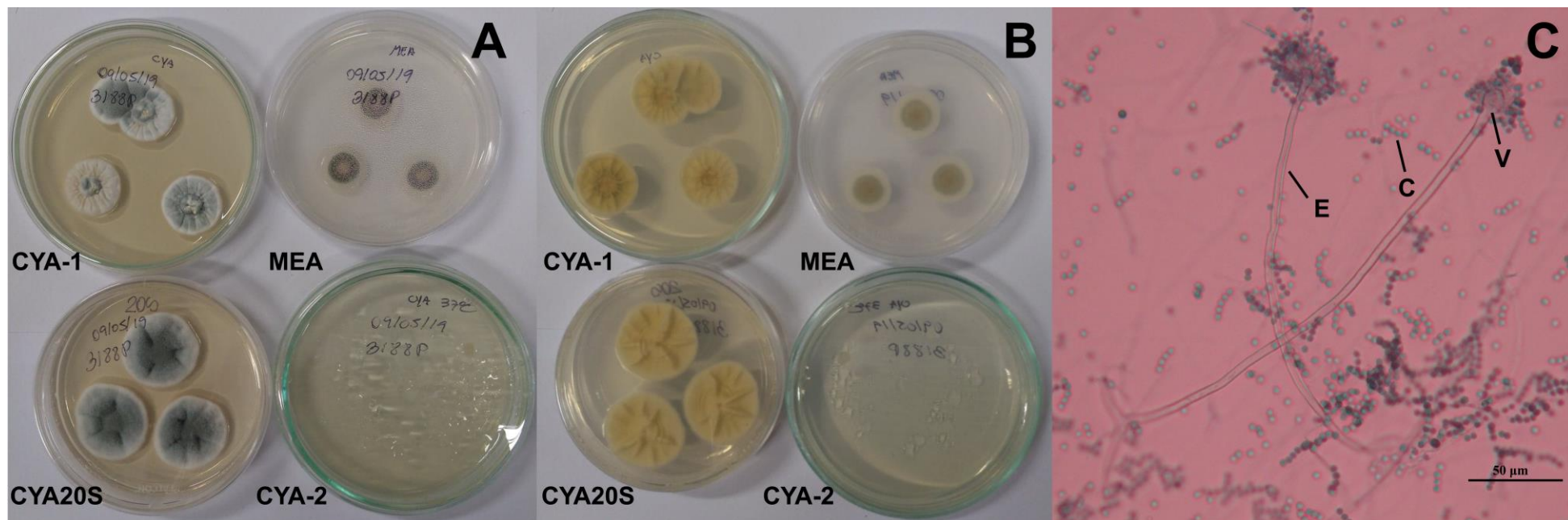


Figura 10. Características morfológicas de *Aspergillus caespitosus* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios esverdeados, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); estipe (E) e vesícula (V). Barra: 50 µm.

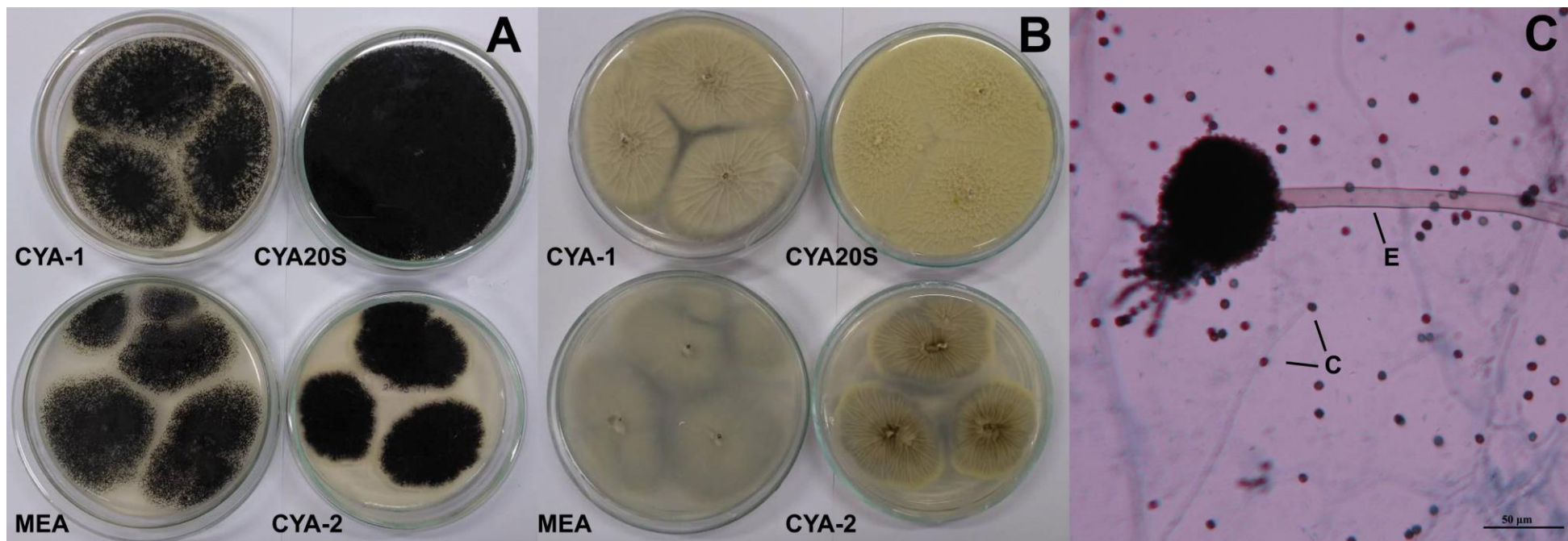


Figura 11. Características morfológicas de *Aspergillus carbonarius* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia do conidióforo com conídios marrons e pretos, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA), conídios (C) e estipe (E). Barra: 50 µm.

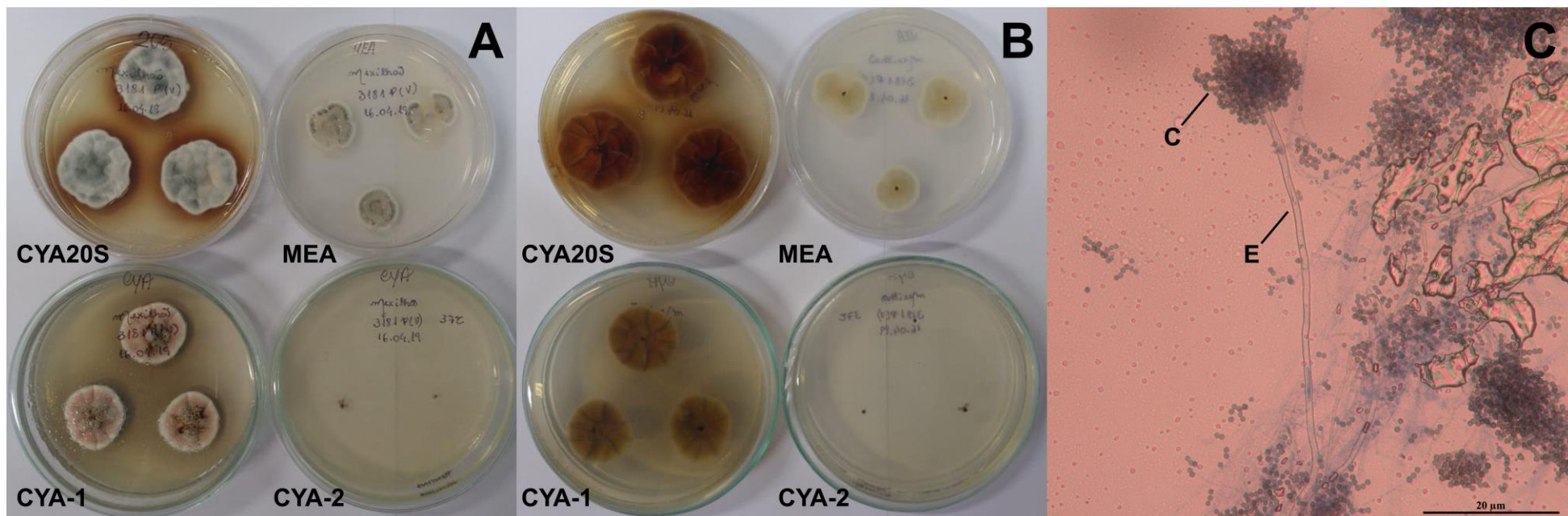


Figura 12. Características morfológicas de *Aspergillus flavipes* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia do conidióforo com conídios esverdeados, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C) e estipe (E). Barra: 20 µm.

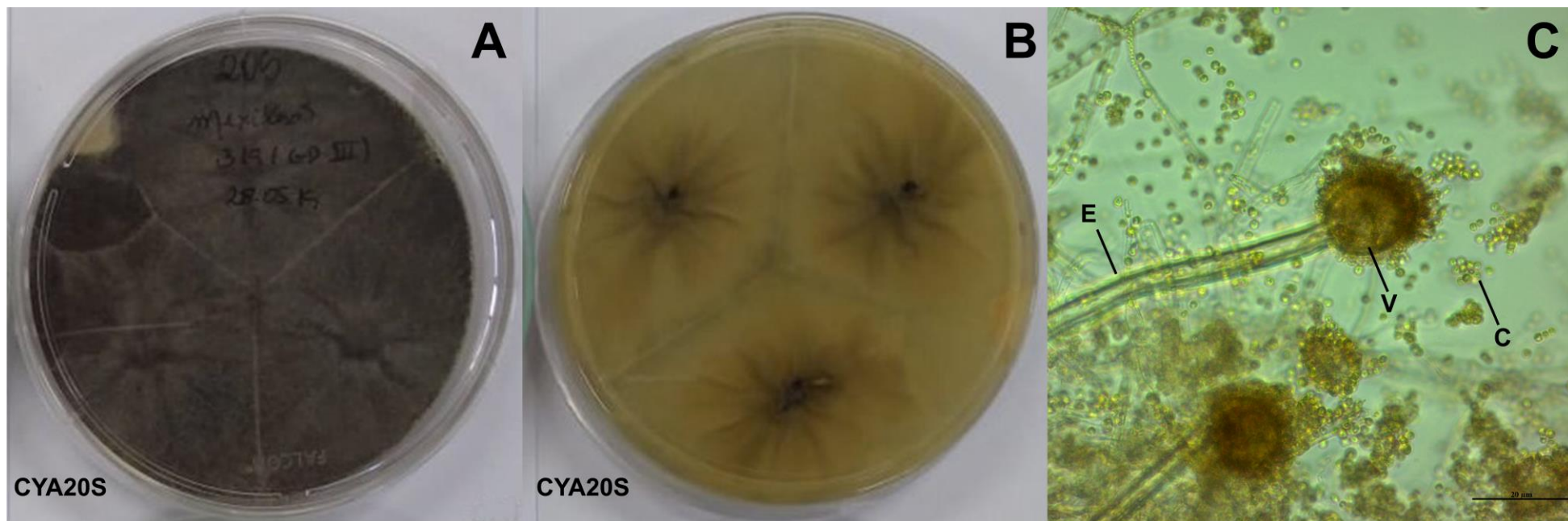


Figura 13. Características morfológicas de *Aspergillus japonicus* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios marrons claros, coloração lactofenol em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); conídios (C); estipe (E) e vesícula (V). Barra: 20 µm.

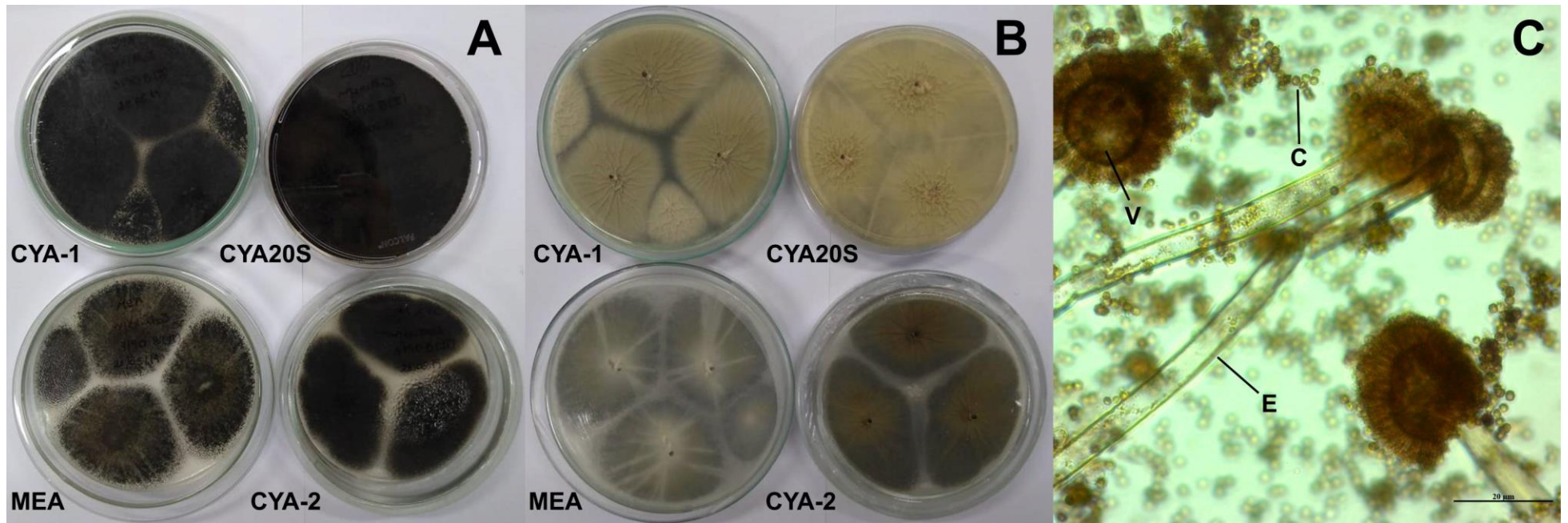


Figura 14. Características morfológicas de *Aspergillus niger* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios marrons escuros a pretos, coloração lactofenol em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); estipe (E) e vesícula (V). Barra: 20 µm.

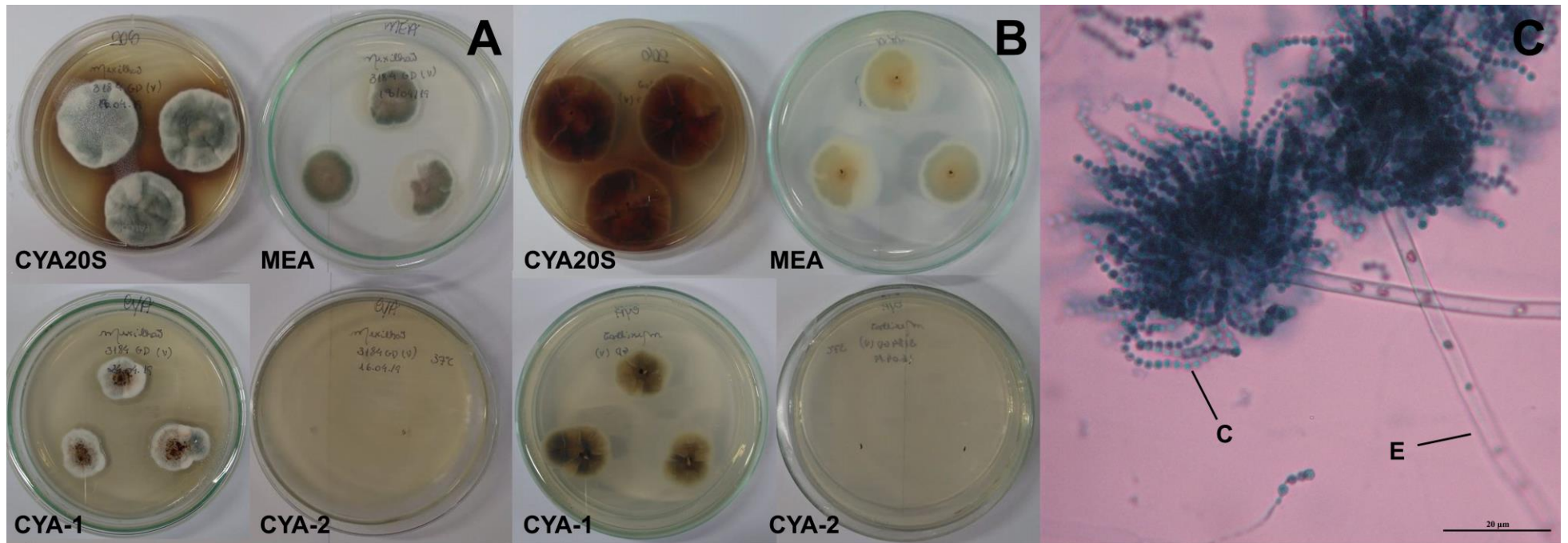


Figura 15. Características morfológicas de *Aspergillus sydowii* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios esverdeados, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C) e estipe (E). Barra: 20 µm.

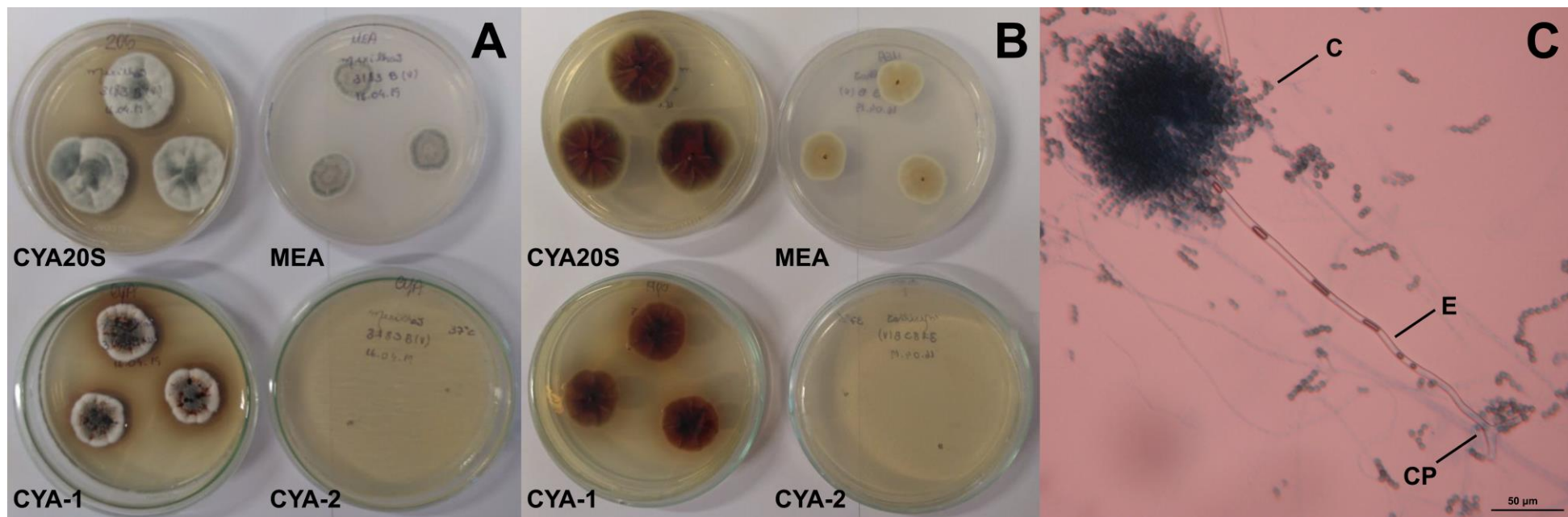


Figura 16. Características morfológicas de *Aspergillus versicolor* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos com conídios esverdeados, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); estipe (E) e célula pé (CP). Barra: 50 μm.

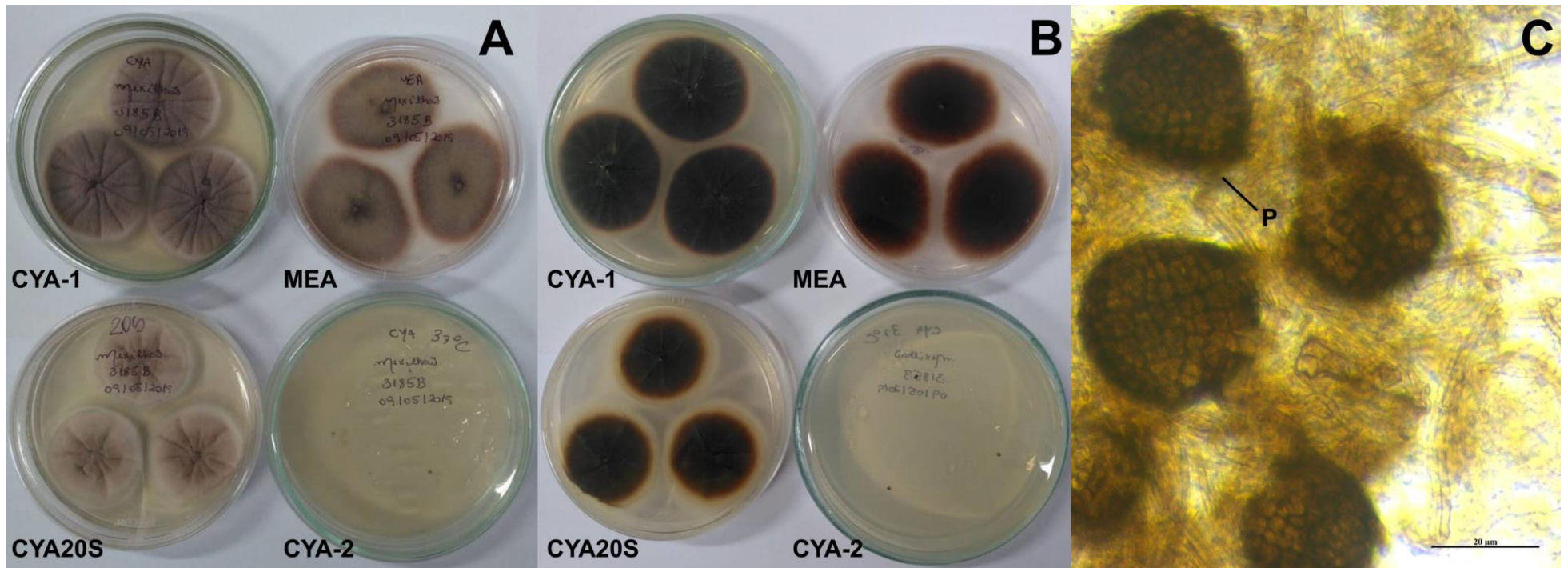


Figura 17. Características morfológicas de *Didymella* sp. após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos pinicídios marrons, coloração lactofenol em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA) e pinicídios (P). Barra: 20 µm.

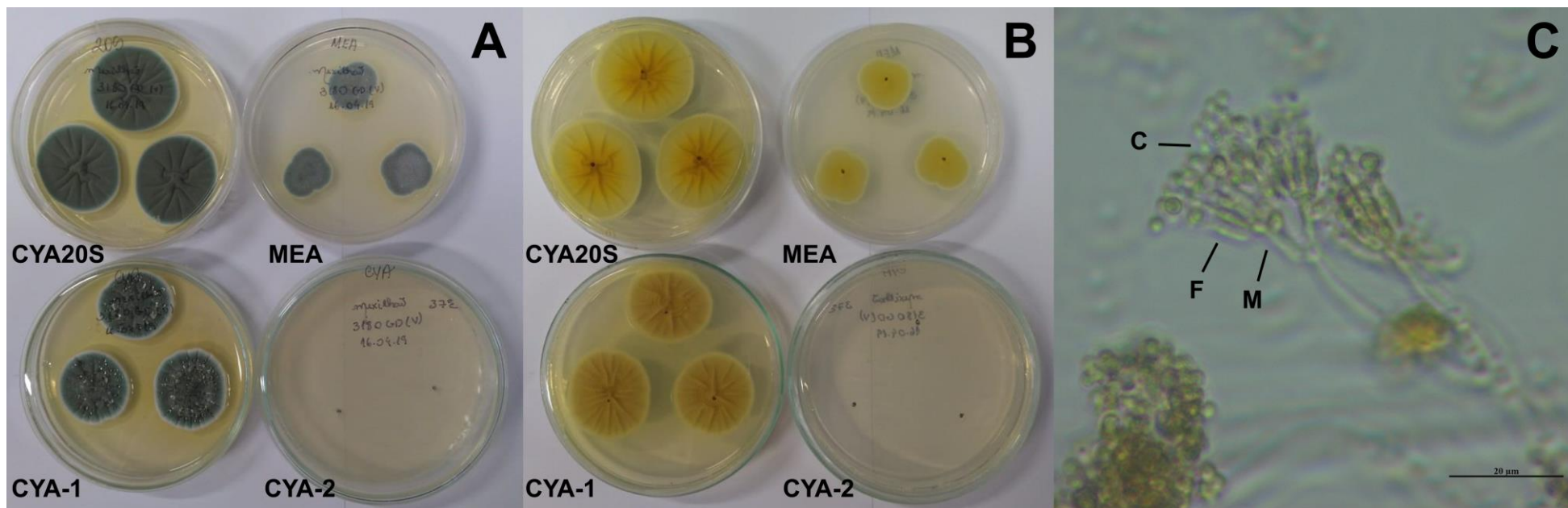


Figura 18. Características morfológicas de *Penicillium raistrickii* após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conidióforos, coloração lactofenol em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); fiálides (F) e métulas (M). Barra: 20 µm.

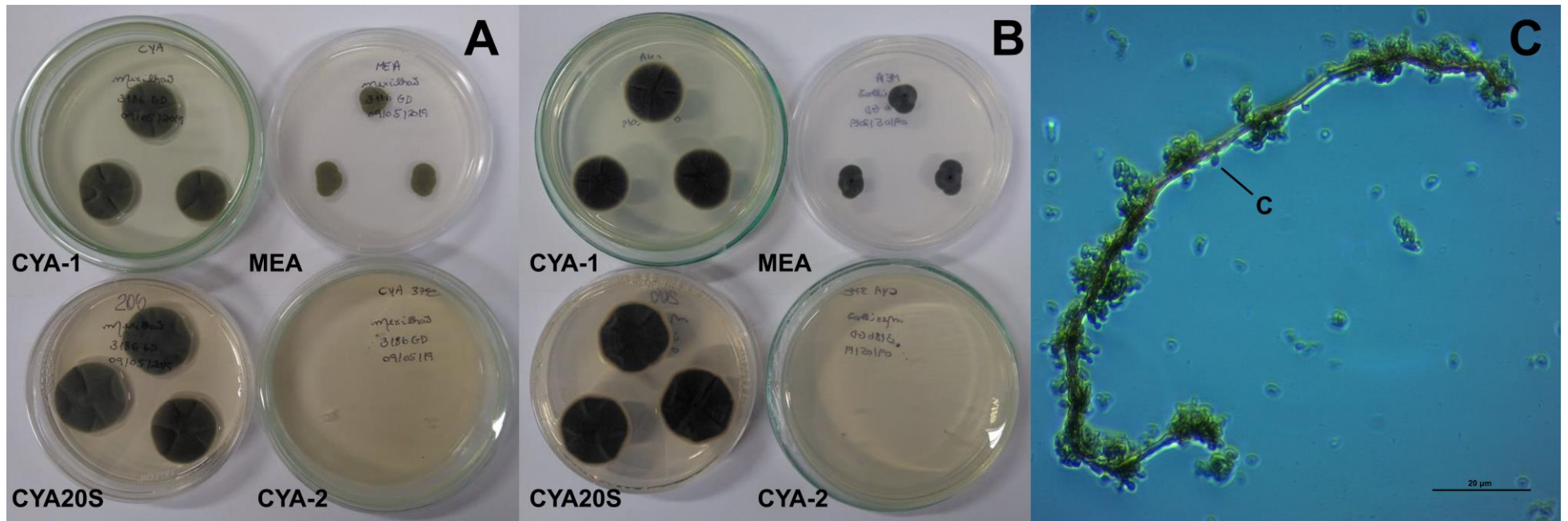


Figura 19. Características morfológicas de *Cladosporium* sp. após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia do conidióforo com conídios, coloração lactofenol com azul de algodão em CYA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA) e conídios (C). Barra: 20 µm.

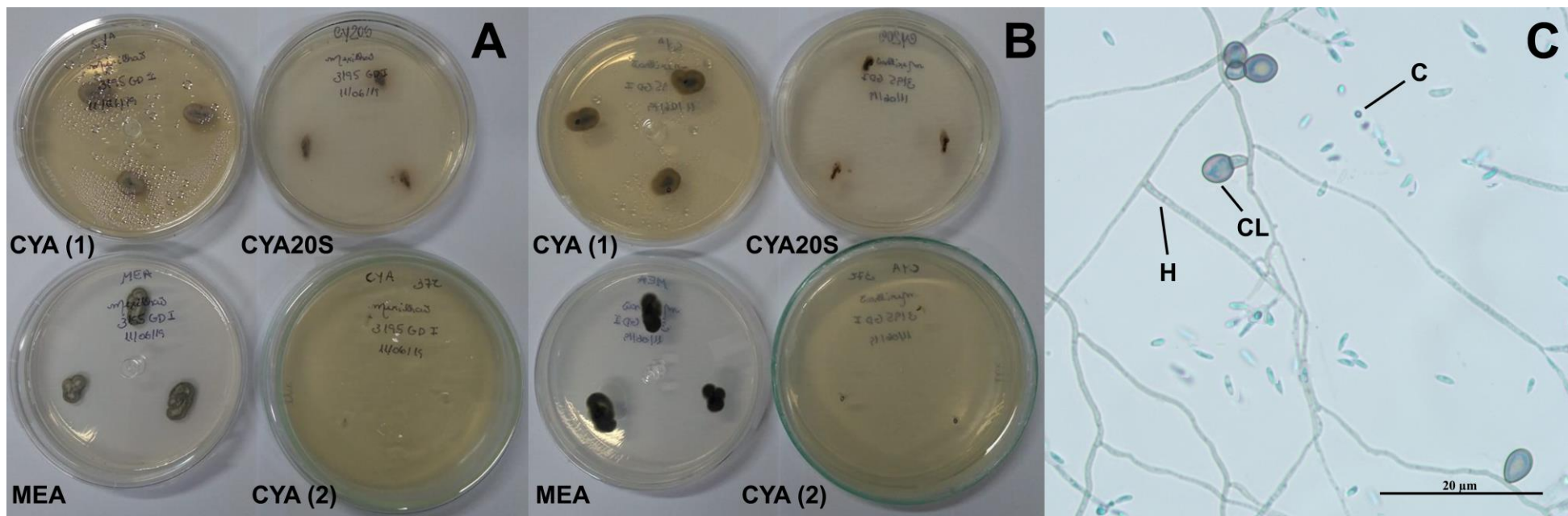


Figura 20. Características morfológicas de *Phaeoisaria* sp. após sete dias de incubação. A- Macroscopia da superfície das colônias. B- Macroscopia do reverso das colônias. C- Microscopia dos conídios e das hifas septadas, coloração lactofenol com azul de algodão em MEA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Extrato de Levedura Czapek a 25 °C (CYA-1); Ágar Extrato de Levedura Czapek a 37 °C (CYA-2); Ágar Extrato de Levedura Czapek com sacarose a 20% (CYA20S); Ágar Extrato de Malte (MEA); conídios (C); clamidósporo (CL) e hifa (H). Barra: 20 µm.

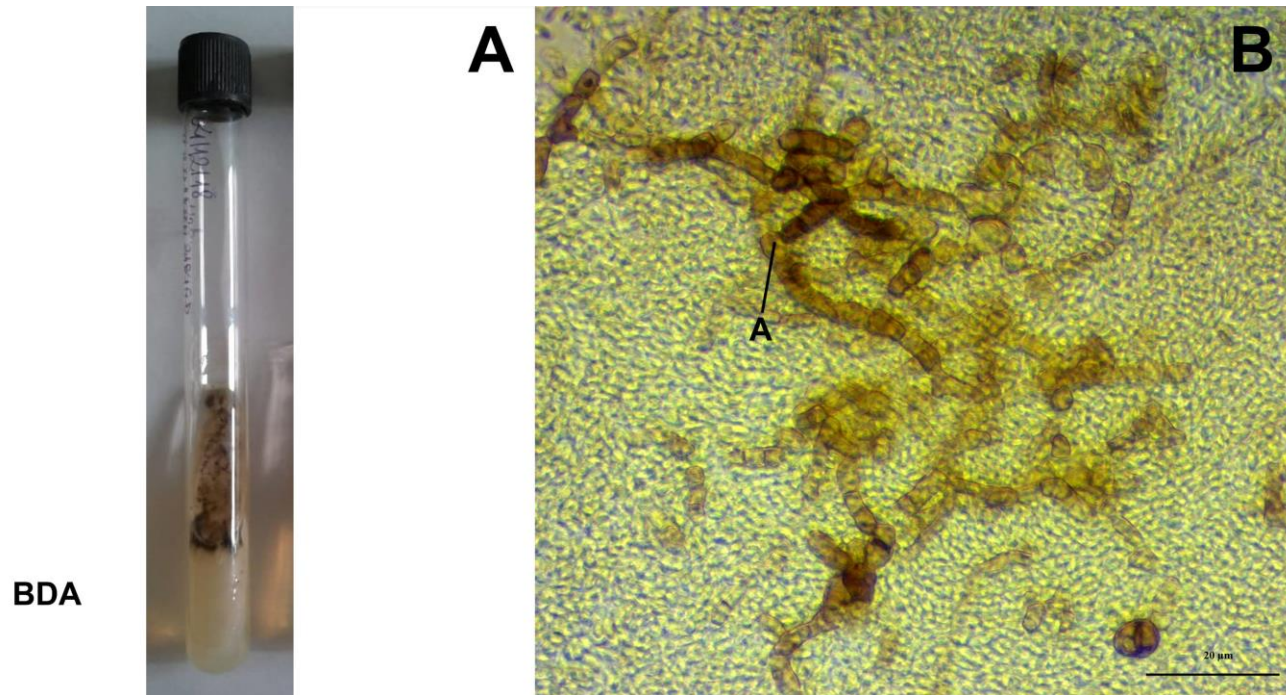


Figura 21. Características morfológicas de *Aureobasidium pullulans* após sete dias de incubação. A- Crescimento fúngico no tubo de ensaio com ágar batata dextrose. B- Microscopia dos arthroconídios negros, coloração lactofenol em BDA a 25 °C. Abreviaturas: Ágar Batata Dextrose (BDA) e arthroconídios (A). Barra: 20 µm.

Didymella e *Phaeoisaria*, assim como *Cladosporium*, são fungos dematiáceos ou de pigmentação escura. A identificação desses dois fungos apenas por características morfológicas não foi o suficiente, uma vez que as características macroscópicas e microscópicas para alguns membros de Didymellaceae e Pleurotheciaceae, respectivamente, são semelhantes. Estudos filogenéticos têm sido desenvolvidos para definir melhor os limites dentro dessas famílias (Dong et al. 2021; Magaña-Dueñas et al. 2021). No presente estudo, as análises moleculares complementares permitiram a caracterização de *Didymella* e *Phaeoisaria*.

Ao comparar a presença dos fungos nos diferentes órgãos, *Aspergillus*, *Didymella* e *Penicillium* foram os gêneros observados em todos os órgãos de *P. perna*, o que parece não indicar qualquer preferência destes fungos por um órgão específico. Além disso, uma maior variedade de gêneros foi encontrada nas glândulas digestivas, e a presença de três a quatro fungos diferentes só foi observada neste órgão, fatos estes que podem estar associados à acumulação de substâncias nutritivas na glândula digestiva (Magalhães 1998). Li et al. (2022) também revelaram uma diversidade de espécies ligeiramente maior na glândula digestiva de *P. canaliculus* em comparação com brânquias, estômago e hemolinfa.

Santos et al. (2020) também isolaram *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., além dos gêneros *Fusarium* Link, 1809 e *Pestalotiopsis* Steyaert, 1949, em espécimes de *P. perna* de Tarituba, Paraty, Rio de Janeiro. No entanto, a frequência dos fungos não foi informada neste estudo. Assim, não foi possível conhecer o gênero predominante naquela região. Em comparação com outros bivalves, estudos identificaram os mesmos gêneros aqui encontrados, com exceção de *Didymella* sp. e *Phaeoisaria* sp. (Zvereva & Vysotskaya 2005; Borzykh & Zvereva 2014; Santos et al. 2017a). Santos et al. (2017a) relataram dematiáceos em *N. nodosus* na costa do Rio de Janeiro, contudo, os fungos foram classificados como não identificados e com apenas duas colônias. Estudos realizados em solo arenoso e água de praias, relataram que *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. estavam entre os gêneros de maior abundância (Sarquis & Oliveira 1996; Gomes et al. 2008), o que confirma a presença estabelecida desses fungos no ambiente marinho. Considerando que os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* foram frequentes em outros estudos, Santos et al. (2017a) inferiram que a interação entre bivalves e fungos pode ser simbiótica, sem efeitos prejudiciais ou que, a ausência de efeitos se deve ao curto período de infecção. Salazar-Vallejo e González (1986) citaram uma relação simbiótica entre os gastrópodes marinhos *Collisella* Dall, 1871 (considerada sinônimo de *Lottia* Gray,

1833 por WoRMS (2021)), e *Didymella conchae* Bonar 1936, que furava frequentemente as suas conchas. No presente estudo, foram observados furos na parte interna de algumas conchas de *P. perna*. No entanto, não é possível afirmar que esse fato tem associação com a presença de *Didymella* sp. nesse bivalve. Isso apenas reforça a importância de mais investigações a esse respeito para um melhor entendimento dessa interação.

As espécies de *Didymella* estão associadas à doença ‘crestamento gomoso’ em cucurbitáceas, como melancia e melão, e às infecções respiratórias em humanos, apesar desse último ser considerado raro (Paret et al. 2018; Salehi et al. 2019). No Brasil, os relatos mostravam este gênero atuando também como fitopatogênico (Santos et al. 2009; Santos et al. 2017b). Há poucos relatos na literatura sobre *Didymella* sp. em moluscos, sendo necessário ser investigado em relação ao consumo de mexilhões infectados, visto que esse gênero foi o segundo de maior ocorrência aqui encontrado em *P. perna*. Até onde se sabe, este é o primeiro registro de *Didymella* sp. em bivalves. *Phaeoisaria* sp. também é registrado pela primeira vez em bivalves, no entanto, não foi abundante, mostrando apenas uma colônia.

Os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* encontrados nos mexilhões analisados pertencem ao grupo de fungos filamentosos oportunistas e produtores de metabólitos secundários, compostos denominados de micotoxinas (Borzykh & Zvereva 2015; Girisham et al. 2016). Entretanto, o nível de toxicidade entre os gêneros pode ser variável. Relatos anteriores mostraram que os maiores níveis de toxicidade foram observados em espécies de *Penicillium* sp. isoladas de amostras de bivalves, seguidos de *Aspergillus* sp. (Sallenave-Namont et al. 2000; Matallah-Boutiba et al. 2012).

Há uma variedade de metabólitos secundários fúngicos, alguns oferecem benefícios para a saúde e são utilizados na biotecnologia industrial como medicamentos imunossupressores, antibióticos, antioxidantes, entre outras aplicações (Frisvad et al. 2018). No entanto, nem todos os metabólitos são benéficos. Os efeitos das micotoxinas dependem da dose e do grau de exposição, além da suscetibilidade do indivíduo, e podem variar de agudo a crônico (Knechtges 2012). Entre os fungos identificados neste estudo, *A. awamori*, *A. japonicus* e *A. niger* são produtores de Ocratoxina A (OTA) (Oliveri et al. 2008; Zouhair et al. 2017). Acredita-se que essa micotoxina esteja associada a efeitos degenerativos nos rins e tumores no trato urinário em humanos (Petkova-Bocharova et al. 1988; Wafa et al.

1998). Além de OTA, *A. niger* pode sintetizar outras micotoxinas: ácido oxálico e fumonisinas (B₂, B₄ e B₆). Os principais efeitos do ácido oxálico são insuficiência pulmonar e renal. No que diz respeito às fumonisinas, podem causar toxicidade renal e hepática (Kimmerling et al. 1992; Edrington et al. 1995; Botha et al. 2009; Månsson et al. 2010; Mogensen et al. 2010). Diversas espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir esterigmatocistina ou compostos semelhantes, dentre elas, *A. versicolor* e *A. sydowii* (Purchase & Van der Watt 1973; Davis 1981). A esterigmatocistina é considerada cancerígena e hepatotóxica. Além de danos ao fígado, pode causar também danos aos pulmões, rins, pâncreas e estômago (Sumi et al. 1987; Tongxin et al. 1991). Isto mostra a necessidade de mais estudos de monitoramento das micotoxinas nos bivalves comestíveis.

É comum o consumo de mexilhões a fresco e até mesmo crus (Ferreira & Magalhães 2004). É importante destacar que a eliminação total das micotoxinas nos alimentos é extremamente difícil, mesmo após o cozimento (Knechtges 2012). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu limites máximos toleráveis de algumas micotoxinas em alimentos comercializados no Brasil (Brasil 2011, 2017). Das micotoxinas citadas acima, OTA e fumonisinas estão presentes nas Resoluções. Entretanto, não foram estabelecidos limites aceitáveis de micotoxinas para o consumo humano de moluscos bivalves. Na realidade, muitos alimentos ainda não possuem legislação específica.

6 CAPÍTULO III. Contaminação elementar em mexilhões *Perna perna*

6.1 Materiais e Métodos

6.1.1 Coleta e processamento das amostras

Um total de 30 mexilhões *P. perna* foram coletados em 2019 na mitilicultura e nos costões rochosos adjacentes da Praia de Jurujuba, Niterói, RJ. As amostras foram colocadas em uma vasilha contendo água do mar e gelo, e transportadas ao laboratório em uma caixa de poliestireno. Os animais frescos foram numerados, pesados (com conchas) e medidos. As valvas foram abertas com o auxílio de uma lâmina e o sexo foi determinado. Os músculos adutores posteriores de cada indivíduo foram removidos (Figura 22), pesados (aproximadamente 150 mg), e congelados (-20 °C) individualmente em tubos estéreis de polipropileno de 15 mL com tampa de rosca até à análise. Todos os instrumentos foram limpos com álcool 70% entre as dissecções individuais.



Figura 22. Mexilhão *Perna perna* com as valvas abertas, mostrando no detalhe o músculo adutor posterior (MAP). Barra: 2 cm.

6.1.2 Análise multielementar

Uma análise multielementar por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) foi realizada no laboratório do Departamento de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio). Cada amostra foi descongelada e misturada com 1 mL de ácido nítrico bidestilado sub-fervido concentrado (Merck, Rio de Janeiro). Esta mistura foi deixada em repouso

durante a noite à temperatura ambiente nos tubos fechados. Após 12 horas, a decomposição ácida foi concluída aquecendo a amostra a 100 °C em um bloco de aquecimento, por 4 horas em recipientes fechados, evitando a volatilização de elementos voláteis, como arsênio, mercúrio e selênio (Eurachem 1998). As amostras foram diluídas com água ultra-pura (resistividade > 18,0 MΩ cm) obtida de um sistema de purificação Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha) para 10 mL.

Metais e metalóides foram determinados, em quintuplicata, usando calibração externa multielementar, por diluições apropriadas de uma solução padrão mista (Merck IV) e usando ^{102}Rh como padrão interno a 20 mg L⁻¹. As determinações foram conduzidas em um Nexlon 300X Perkin Elmer ICP-MS (Norwalk, CT, EUA). A precisão do método foi verificada por meio de brancos do procedimento e pela análise paralela de um material de referência certificado (CRM) (ERM[®]-BB422, músculo de peixe), em triplicata. Todos os valores de recuperação de CRM estavam dentro dos padrões aceitáveis de Eurachem (1998) (Tabela 6), inclusive para elementos voláteis, indicando que o procedimento de preparação da amostra é eficiente e não sujeito a perdas.

Tabela 6. Recuperações de materiais de referência certificadas nas análises de ICP-MS aqui realizadas.

Elemento	Valor certificado	Valor observado	% Recuperação
As	12,7 ± 0,7	15,7 ± 0,7	124
Cd	0,0075 ± 0,0018	0,0049 ± 0,0024	66
Cu	1,67 ± 0,16	1,62 ± 0,09	97
Fe	9,4 ± 1,4	9,8 ± 2,8	104
Hg	0,601 ± 0,030	0,701 ± 0,049	116
Mg	1370	1330 ± 38,74	97
Mn	0,368 ± 0,028	0,201 ± 0,019	55
Na	2800	2665 ± 114	95
Zn	16 ± 1,1	16 ± 0,7	99

Os limites de detecções (LOD) para cada elemento investigado foram calculados como $\text{LOQ} = (10 * \text{SD} * \text{df}) / \text{inclinação da linha}$, onde LOQ é o limite de qualificação, DP é o desvio padrão da razão do sinal analítico pelo sinal interno padrão de 10 soluções em branco e df é o fator de diluição da amostra (Inmetro 2016). Os LODs calculados (mg kg⁻¹) foram os seguintes: prata (Ag): 0,017; alumínio (Al): 1,082; arsênio (As): 0,009; cádmio (Cd): 0,009; cobalto (Co): 0,004; cromo (Cr): 0,339; cobre (Cu): 0,146; ferro (Fe): 2,406; mercúrio (Hg): 0,020; manganês (Mn):

0,066; níquel (Ni): 0,486; chumbo (Pb): 0,003; selênio (Se): 0,123; vanádio (V): 0,008 e zinco (Zn): 0,916.

6.1.3 Cálculo da ingestão semanal tolerável provisória

A ingestão semanal tolerável provisória (PTWI), que compreende o cálculo da quantidade de um alimento específico que pode ser consumido com segurança e sem riscos, foi calculada para cada elemento investigado, usando a taxa média de consumo de frutos do mar para o estado do Rio de Janeiro (Brasil 2009), uma vez que não há taxas específicas disponíveis para o consumo de mexilhões. As médias de cada elemento nos mexilhões da Praia de Jurujuba, bem como o maior valor elementar, para o cálculo do pior cenário, foram multiplicados pelo consumo médio de pescado no Brasil por semana (173,18 g) e divididos pelo peso corporal médio de um adulto brasileiro (70 kg).

6.1.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o pacote de software Graphpad Prism v.8. A normalidade dos dados de metais e metalóides foi verificada primeiramente pelo teste de Shapiro-Wilk. Como os dados não tinham distribuição normal, os dados foram analisados por meio do teste de Mann-Whitney ao nível de 95% de confiança para avaliar diferenças elementares entre os sexos.

6.2 Resultados e Discussão

O comprimento total da concha dos *P. perna* variou de 63 a 121 mm, com uma média de $94,2 \pm 13,5$ mm, e o peso do mexilhão variou de 21,62 a 113,60 g, com uma média de $63,80 \pm 21,02$ g. Todos os *P. perna* amostrados tinham mais de 50 mm de comprimento e, portanto, foram classificados como adultos, de acordo com o IBAMA (2006). Sendo assim, os mexilhões eram adequados para a comercialização e conseqüentemente, para o consumo humano.

Foram identificados 15 fêmeas e 14 machos. Não foi possível determinar o sexo de um indivíduo devido ao manto transparente. Como não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações elementares dos machos e das fêmeas (p -valor = 0,8719), os dados para ambos os sexos foram combinados e são exibidos na Tabela 7. Essa falta de diferença entre os sexos para todos os

elementos determinados contrasta com relatórios anteriores de outros autores para a mesma espécie. Por exemplo, Carvalho et al. (2001), Ferreira et al. (2004) e Campolim et al. (2017) relataram diferenças significativas para Cd, Cu e Ni, com valores elevados observados em espécimes fêmeas de *P. perna*. Em outra avaliação, Kehrig et al. (2006) reportaram diferenças significativas para as concentrações de Hg, sendo maiores em mexilhões fêmeas. Orren et al. (1980) sugeriram que o acúmulo de metal em bivalves está associado à época reprodutiva, após observarem que os mexilhões fêmeas *Choromytilus meridionalis* (F. Krauss, 1848) exibiram maiores concentrações de metais apenas no período de pré-desova, não exibindo diferenças entre os sexos após o período de reprodução. No Brasil, os picos reprodutivos de *P. perna* ocorrem de abril a junho, bem como nos meses de setembro e janeiro (Marques 1998). Assim, como as coletas do presente estudo foram realizadas de fevereiro a março, os efeitos reprodutivos não são esperados nesta época do ano.

Tabela 7. Concentrações elementares (mg kg^{-1} de peso úmido) em amostras de mexilhão *Perna perna* da Praia de Jurujuba, Niterói, Rio de Janeiro (n = 30).

Elemento	Mínima	Máxima	Média \pm DP
Ag	0,003	0,051	0,013 \pm 0,010
Al	0,000	5,68	0,70 \pm 1,19
As	0,27	1,38	0,69 \pm 0,27
Cd	0,000	0,023	0,005 \pm 0,006
Co	0,009	0,082	0,025 \pm 0,016
Cr	0,38	1,06	0,68 \pm 0,16
Cu	0,227	1,109	0,485 \pm 0,191
Fe	0,49	20,51	6,12 \pm 4,22
Hg	0,008	0,040	0,024 \pm 0,008
Mn	0,41	12,68	2,35 \pm 2,48
Ni	0,011	0,613	0,172 \pm 0,178
Pb	0,012	0,101	0,032 \pm 0,019
Se	0,148	0,468	0,284 \pm 0,087
V	0,069	0,266	0,164 \pm 0,047
Zn	6,66	38,16	17,00 \pm 8,19

DP: desvio padrão.

As concentrações médias de Fe e Zn foram as mais altas nos bivalves investigados (Tabela 7). Valores abaixo do LOQ foram encontrados na maioria das amostras para Ag (25/30, 83,3%), Al (26/30, 86,6%), Cd (23/30, 76,6%) e Ni (27/30, 90%). Algumas concentrações de Fe e Hg também ficaram abaixo do LOQ, de 4/30 (13,3%) e 11/30 (36,6%), respectivamente. De acordo com Baptista Neto et al.

(2005), o enriquecimento de certos elementos do meio ambiente, como o Zn, é geralmente indicativo de desenvolvimento urbano. Esses autores detectaram altos valores de Zn em sedimentos próximos à área investigada no presente estudo, associando isso a altos níveis de matéria orgânica presente em efluentes domésticos, o que pode ser a causa dos altos níveis aqui observados. O Fe é um dos elementos mais abundantes na natureza, presente nas rochas. No entanto, também é detectado em resíduos sólidos, esgotos, resíduos industriais e fertilizantes (Alloway & Ayres 1997; Azevedo et al. 2019). Um estudo relativo aos sedimentos de fundo demonstrou enriquecimento de Fe, dentre outros elementos, em direção à parte interna da Enseada de Jurujuba (Baptista Neto & Silva 1996), que pode ser a causa das concentrações de Fe aqui encontrados, visto que a Praia de Jurujuba está localizada mais próxima da extremidade dessa enseada. Além disso, Ferreira et al. (2004) sugeriram que as altas concentrações de Fe em *P. perna* são devidas aos substratos ricos em óxido de ferro no litoral norte do estado do Rio de Janeiro.

Fontes significativas de efluentes industriais estão presentes na Baía de Guanabara, como refinarias, estaleiros, depósitos de lixo e pontos de abastecimento de combustível (Resgalla Jr et al. 2008). As principais fontes de contaminação elementar para a Enseada de Jurujuba compreendem efluentes domésticos e industriais não tratados e escoamento urbano, além das atividades náuticas e deposições atmosféricas que também contribuem significativamente (Baptista Neto et al. 2005).

Não foram realizados muitos estudos sobre contaminação elementar em mexilhões *P. perna*, tanto no Brasil como em todo o mundo. Uma comparação das concentrações elementares em *P. perna* com outros estudos é apresentada na Tabela 8. As concentrações médias da maioria dos elementos deste estudo foram inferiores às dos outros estudos também realizados na Baía de Guanabara, exceto para as concentrações de Cr relatadas por Lino et al. (2016), que foram semelhantes às concentrações aqui observadas. Este elemento é considerado um dos principais contaminantes industriais na Baía de Guanabara, embora as concentrações elementares nesta região variem devido a diferentes impactos ambientais e à qualidade da água (Kehrig et al. 2007). Em relação a outros países, as concentrações médias de Cr aqui detectadas foram superiores às relatadas para *P. perna* das costas da Argélia e do Senegal, enquanto as concentrações médias para os demais elementos aqui analisados foram menores do que nesses países (Belabed et al. 2013; Diop et al. 2016).

Tabela 8. Comparação das concentrações elementares em mexilhões *Perna perna* com estudos realizados em diferentes áreas da Baía de Guanabara e outros países. Os dados são expressos como média \pm DP (quando disponível) e intervalo (mg kg⁻¹ peso úmido*).

	Área	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Referência
Baía de Guanabara – Brasil	Praia de Jurujuba	0,692 \pm 0,270 0,276 - 1,380	0,005 \pm 0,006 0,000 - 0,023	0,687 \pm 0,162 0,383 - 1,059	0,485 \pm 0,191 0,227 - 1,109	6,127 \pm 4,226 0,495 - 20,516	0,024 \pm 0,008 0,008 - 0,040	Presente estudo
	Praia de Jurujuba	-	- \pm (-) < 0,009	0,84 \pm (-) 0,30 - 1,50	209,40 \pm (-) 3,90 - 960,00	59,10 \pm (-) 35,40 - 118,50	-	Lino et al. (2016)
	Fortaleza de Santa Cruz	-	0,05 \pm (-) 0,04 - 0,07	0,05 \pm (-) 0,03 - 0,10	1,62 \pm (-) 1,10 - 2,20	-	-	Francioni et al. (2004)
	Ilha da Boa Viagem	-	0,03 \pm (-) 0,02 - 0,04	0,05 \pm (-) 0,03 - 0,07	1,13 \pm (-) 0,08 - 1,40	-	-	Francioni et al. (2004)
	Ponte Rio-Niterói	-	0,04 \pm (-) 0,02 - 0,08	0,08 \pm (-) 0,04 - 0,11	1,96 \pm (-) 1,60 - 2,30	-	-	Francioni et al. (2004)
	Marina da Glória	-	0,03 \pm (-) 0,02 - 0,04	0,10 \pm (-) 0,03 - 0,20	1,80 \pm (-) 1,40 - 2,50	-	-	Francioni et al. (2004)
	Praia Vermelha	-	0,07 \pm (-) 0,05 - 0,10	0,16 \pm (-) 0,08 - 0,26	2,05 \pm (-) 1,40 - 2,40	-	-	Francioni et al. (2004)
	Maria da Glória, Praia de Boa Viagem e Ponte Rio-Niterói	-	-	-	-	-	0,038 \pm 0,023 0,017 - 0,068	Kehrig et al. (2006; 2007)
	Praia do Diabo	4,24 \pm 0,22	0,090 \pm 0,006	-	1,04 \pm 0,09	-	-	Lavradas et al. (2016)**
	Praia da Urca	2,75 \pm 0,16	0,036 \pm 0,003	-	1,98 \pm 0,19	-	-	Lavradas et al. (2016)**
Praia Vermelha	4,50 \pm 0,31 2,25 - 5,91	0,115 \pm 0,006 0,021 - 0,150	-	1,58 \pm 0,19 0,48 - 2,88	-	-	Lavradas et al. (2016)**	
Outros países	Argélia	-	0,15 \pm 0,03 (-)	0,56 \pm 0,03 (-)	8,02 \pm 0,74 (-)	279,61 \pm 3,89 (-)	0,048 \pm 0,009 (-)	Belabed et al. (2013)
	Senegal	2,21 \pm 0,71 (-)	0,91 \pm 1,15 (-)	0,30 \pm 0,14 (-)	2,82 \pm 0,80 (-)	54,00 \pm 20,01 (-)	-	Diop et al. (2016)
	Mauritânia	-	0,432 \pm 0,177 (-)	-	1,785 \pm 0,348 (-)	-	0,009 \pm 0,003 (-)	Legraa et al. (2019)
	Venezuela	-	4,60 \pm 2,61 (-)	7,49 \pm 3,50 (-)	7,17 \pm 6,89 (-)	158,69 \pm 78,26 (-)	-	Castillo et al. (2005)

* Os resultados de peso seco foram convertidos em peso úmido, estimando 70% de teor de água (Carvalho et al. 2001).

** Os autores não apresentaram os resultados das concentrações mínimas e máximas das três áreas separadamente.

(-): dados não relatados.

DP: desvio padrão.

Tabela 8. Comparação das concentrações elementares em mexilhões *Perna perna* com estudos realizados em diferentes áreas da Baía de Guanabara e outros países. Os dados são expressos como média \pm DP (quando disponível) e intervalo (mg kg⁻¹ peso úmido*) [Continuação].

	Área	Mn	Ni	Pb	Se	V	Zn	Referência
Baía de Guanabara – Brasil	Praia de Jurujuba	2,356 \pm 2,481 0,411 - 12,684	0,172 \pm 0,178 0,011 - 0,613	0,032 \pm 0,019 0,012 – 0,101	0,284 \pm 0,087 0,148 - 0,468	0,164 \pm 0,047 0,069 - 0,266	17,003 \pm 8,194 6,660 - 38,163	Presente estudo
	Praia de Jurujuba	6,60 \pm (-) 3,00 - 11,40	0,69 \pm (-) 0,42 - 0,93	- \pm (-) < 0,18	-	-	18,60 \pm (-) 15,30 - 21,30	Lino et al. (2016)
	Fortaleza de Santa Cruz	-	-	-	-	-	48,27 \pm (-) 30,97 - 59,23	Francioni et al. (2004)
	Ilha da Boa Viagem	-	-	-	-	-	32,43 \pm (-) 17,81 - 49,33	Francioni et al. (2004)
	Ponte Rio-Niterói	-	-	-	-	-	41,95 \pm (-) 25,79 - 61,42	Francioni et al. (2004)
	Marina da Glória	-	-	-	-	-	31,95 \pm (-) 26,68 - 37,05	Francioni et al. (2004)
	Praia Vermelha	-	-	-	-	-	30,49 \pm (-) 20,81 - 40,52	Francioni et al. (2004)
	Praia do Diabo	-	2,57 \pm 0,34	0,10 \pm 0,02	0,86 \pm 0,06	-	48,21 \pm 2,17	Lavradas et al. (2016)**
	Praia da Urca	-	2,30 \pm 0,19	0,28 \pm 0,06	0,79 \pm 0,03	-	68,42 \pm 5,09	Lavradas et al. (2016)**
	Praia Vermelha	-	3,94 \pm 0,81 0,84 - 7,56	1,19 \pm 0,24 0,036 - 2,10	1,15 \pm 0,12 0,48 - 1,65	-	70,64 \pm 10,51 31,59 - 109,26	Lavradas et al. (2016)**
Outros países	Argélia	6,68 \pm 0,40 (-)	2,70 \pm 0,68 (-)	0,50 \pm 0,05 (-)	-	-	107,69 \pm 1,62 (-)	Belabed et al. (2013)
	Senegal	0,78 \pm 0,40 (-)	2,08 \pm 1,55 (-)	0,41 \pm 0,36 (-)	0,28 \pm 0,08 (-)	0,59 \pm 0,62 (-)	46,80 \pm 12,30 (-)	Diop et al. (2016)
	Mauritânia	-	-	0,210 \pm 0,054 (-)	-	-	35,712 \pm 4,665 (-)	Legraa et al. (2019)
	Venezuela	-	5,76 \pm 2,68 (-)	9,76 \pm 5,39 (-)	-	-	167,75 \pm 149,58 (-)	Castillo et al. (2005)

* Os resultados de peso seco foram convertidos em peso úmido, estimando 70% de teor de água (Carvalho et al. 2001).

** Os autores não apresentaram os resultados das concentrações mínimas e máximas das três áreas separadamente.

(-): dados não relatados.

DP: desvio padrão.

Lino et al. (2016) relataram altas concentrações de Cu e Fe em mexilhões na Praia de Jurujuba, aproximadamente 430 e 10 vezes maiores do que as observadas aqui, respectivamente. Em 2013, o programa “Enseada Limpa” foi implementado na área amostrada com o objetivo de reduzir a poluição da Baía de Guanabara. As ações estabelecidas incluem iniciativas de educação ambiental para melhorar a gestão de resíduos sólidos e a expansão da rede coletora de esgotos, e são realizadas análises semanais ou mensais da qualidade da água para avaliar a eficiência destas ações. Com base nesses monitoramentos semanais e mensais, a Companhia Ambiental do estado de São Paulo desenvolveu um Índice de Balneabilidade que representa uma síntese da qualidade das águas monitoradas ao longo do ano (PNQA 2021), categorizado da seguinte forma: Excelente (classificado como excelente em 100% do ano), Bom (classificado como adequado para atividades balneares durante 100% do ano, exceto os classificados como excelentes em 100% do ano), Regular (classificado como inadequado abaixo de 50% do ano) e Ruim (classificado como inadequado igual ou superior a 50% do ano). Os índices de balneabilidade da Praia de Jurujuba foram de 27,69% em 2013, aumentando para 55,98% em 2018 (Niterói 2017, 2019). Embora ainda inadequada para o banho, essa diferença é significativa, indicando aumento da qualidade da água na área, o que pode ser responsável pela diminuição das concentrações de metais aqui observadas nos mexilhões *P. perna* quando comparados ao estudo realizado na mesma área por Lino et al. (2016).

Os valores de Se relatados por Diop et al. (2016) foram semelhantes aos identificados aqui, enquanto as concentrações médias de Hg e Mn foram 2 e 3 vezes maiores do que as encontradas por Legraa et al. (2019) e Diop et al. (2016), respectivamente. Concentrações elementares mais altas em comparação com o presente estudo foram identificadas em *P. perna* da costa venezuelana. Os autores, entretanto, não mencionam se os valores representam o peso seco ou úmido (Castillo et al. 2005), impedindo novas discussões. Como mencionado anteriormente, estudos sobre *P. perna* são escassos, e outras comparações na América do Sul só podem ser feitas com outras espécies, como *Ameghinomya antiqua* (King & Brodery, 1932), *Aulacomya atra* (Molina, 1782) e *Mytilus chilensis* Hupe, 1854, da Argentina e do Chile, que apresentaram concentrações médias abaixo das deste estudo apenas para Cr, entre 0,129 e 0,135 mg kg⁻¹ peso úmido (Tapia et al. 2010; Conti et al. 2011).

As comparações elementares com os níveis máximos permitidos estabelecidos pelas agências reguladoras brasileiras e internacionais são apresentadas na Tabela 9. A maioria das médias detectadas neste estudo encontra-se abaixo dos níveis permitidos pelos órgãos reguladores nacionais e internacionais, com exceção do Cr e do As. Em relação ao primeiro elemento, todas as amostras ultrapassaram o limite de $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ determinado pela ANVISA (1965). No que se refere ao As, a concentração média aqui observada foi apenas superior à estabelecida para o Ministério da Saúde da República Popular da China (MHPRC 2012), com 24 amostras acima de $0,50 \text{ mg kg}^{-1}$. Por outro lado, apesar da concentração média de As estar abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (ANVISA 1965, 2013) e pelos Padrões Alimentares Austrália Nova Zelândia (FSANZ 2017), quatro amostras continham valores de As superiores a esses limites. Vale ressaltar que o documento mais recente da ANVISA é acordado entre países do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL). Com relação ao Se, 12 amostras ultrapassaram o limite da ANVISA (1965), enquanto para o Zn, três amostras ficaram acima do valor indicado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA 2007).

Nenhuma legislação específica para limites de Cr, Cu, Ni, Se e Zn em animais aquáticos está disponível no Brasil, portanto, foi utilizada a legislação que estabelece valores genéricos para diversos alimentos. Na verdade, Campolim et al. (2018) reforçaram a necessidade de incluir e atualizar os limites de concentração desses elementos especificamente para animais aquáticos. No que diz respeito às concentrações máximas estabelecidas para As, Cd, Hg e Pb, são específicas para moluscos bivalves. Nota-se a falta de limites legais para muitos elementos nas regulamentações brasileiras e internacionais. Isso reforça a necessidade de estabelecer esses limites a fim de possibilitar um controle mais eficiente de contaminantes em animais aquáticos, enquanto variações entre os órgãos quanto aos limites aceitos de alguns elementos também são observadas, o que levanta preocupações para a saúde humana (Hauser-Davis et al. 2016; Campolim et al. 2018).

Tabela 9. Concentrações médias de elementos no músculo adutor de amostras de mexilhão *Perna perna* da Praia de Jurujuba, Niterói, Rio de Janeiro em comparação com a legislação brasileira e internacional (mg kg⁻¹ peso úmido).

	Média	ANVISA (1965)	ANVISA (2013)	EC (2006)	FAO/WHO (2000)	FSANZ (2017)	MAFF (1998)	MHPRC (2012)	USEPA (2007)
Ag	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
Al	0,698	-	-	-	-	-	-	-	-
As	0,69	1,00	1,00	-	-	1,00	-	0,50	-
Cd	0,005	1,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00	2,00
Co	0,025	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr	0,68	0,10	-	-	-	-	-	2,00	-
Cu	0,48	30,00	-	-	-	-	20,00*	-	20,00
Fe	6,12	-	-	-	-	-	-	-	-
Hg	0,024	0,50	0,50	0,50	1,00	0,50	0,30	0,50	-
Mn	2,35	-	-	-	-	-	-	-	-
Ni	0,172	5,00	-	-	-	-	-	-	-
Pb	0,032	2,00	1,50	1,50	-	2,00	5,00	1,50	0,80
Se	0,284	0,30	-	-	-	-	-	-	-
V	0,164	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn	17,00	50,00	-	-	-	-	50,00*	-	30,00

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

EC: Comunidade Europeia.

FAO/WHO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura / Organização Mundial da Saúde.

FSANZ: Padrões Alimentares Austrália Nova Zelândia.

MAFF: Ministério da Agricultura, Florestas e Pescas (Japão).

MHPRC: Ministério da Saúde da República Popular da China.

USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.

* Níveis mais elevados em moluscos são permitidos se Cu e Zn forem de ocorrência natural, atingindo até 500 mg kg⁻¹ e 100 mg kg⁻¹ de peso úmido, respectivamente.

O Cr é um elemento essencial para o metabolismo humano quando presente em pequenas quantidades (Coleman et al. 2017), embora alguns estudos indiquem que o Cr pode ser carcinogênico em humanos através da ingestão (Linos et al. 2011; Wang et al. 2011). Todas as amostras de mexilhões aqui avaliadas ultrapassaram o limite estabelecido pela legislação brasileira. Porém, o consumo dos mexilhões avaliados seria adequado segundo a agência chinesa. Lino et al. (2016), ao avaliar Cr em *P. perna* amostrados em quatro diferentes localidades do litoral do Rio de Janeiro, observaram que as concentrações médias ultrapassaram o limite tolerável para consumo humano pela ANVISA para este elemento, mesmo em áreas menos impactadas. Resultados semelhantes foram relatados para a Baía de Santos e a Baía de Ubatuba, ambas no estado de São Paulo (Avelar et al. 2000; Campolim et al. 2018).

No que diz respeito ao Se, também um elemento essencial, a concentração média deste elemento ficou muito próxima do limite da ANVISA (1965), com quase metade das amostras ultrapassando este valor, indicando potenciais preocupações de risco à saúde humana. MacFarquhar et al. (2010) relataram que em 2008 houve um surto nos EUA de toxicidade por Se associada a um suplemento dietético líquido. A alta concentração desse elemento resultou em diarreia, náusea, cansaço, queda dos cabelos, dores de cabeça e nas articulações, descoloração ou fragilidade das unhas, erupção cutânea e mau hálito. Alguns sintomas persistiram por 90 dias ou mais. Assim, as preocupações quanto ao conteúdo de Se nos mexilhões *P. perna* aqui analisados são importantes.

O As é considerado equivocadamente como metal, sendo na realidade um elemento metalóide não essencial, apresentando características entre metais e não metais, além de ser potencialmente tóxico (Rosa et al. 2012; Cullen & Reimer 2017), dependendo de sua especiação ambiental. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC 2012) na França, classifica o As como carcinogênico do Grupo 1 para humanos, afetando pulmão, bexiga e pele. Apesar de poucas amostras terem apresentado concentrações superiores às estabelecidas pela agência brasileira para este elemento, esse resultado não pode ser negligenciado. Considerando o nível máximo tolerável da agência chinesa, 80% das amostras ultrapassariam o limite.

Altas concentrações de As e Se também foram identificadas em amostras de *P. perna* de três diferentes áreas da Baía de Guanabara, além da Baía de Ilha Grande e regiões costeiras do estado de São Paulo (Catharino et al. 2012; Lavradas et al. 2016). Barbosa et al. (2019) também detectaram concentrações de As e Se

acima dos limites da ANVISA em diferentes bivalves, como *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), *Iphigenia brasiliiana* (Lamarck, 1818), *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) e *Trachycardium muricatum* (Linnaeus, 1758) da Baía de Todos os Santos, na Bahia. No Brasil, porém, as avaliações de As e Se em bivalves são menos frequentes e nota-se a falta de dados sobre esses elementos, especialmente em *P. perna*.

As concentrações de Zn neste estudo estiveram dentro dos níveis permitidos pela agência brasileira, conforme observado em outros estudos realizados na Baía de Guanabara para a mesma espécie (Francioni et al. 2004; Lino et al. 2016). Para a agência americana, que estabelece um limite mais restrito para este elemento, o consumo de mexilhões não seria considerado seguro, pois algumas amostras estavam acima do limite estabelecido, e o consumo excessivo de Zn a longo prazo pode levar à anemia, leucopenia e neutropenia em humanos (Porea et al. 2000; Igic et al. 2002).

Os elementos Cd, Cu, Hg, Ni e Pb não parecem ser poluentes preocupantes para a área investigada, uma vez que as concentrações detectadas nas amostras de *P. perna* ficaram bem abaixo dos valores máximos toleráveis. Novos estudos com amostras de tamanhos maiores devem ser realizados para melhor avaliar os riscos associados ao consumo de mexilhões na área de estudo.

Os mexilhões são geralmente ingeridos inteiros. Neste estudo, apenas o músculo adutor posterior do animal foi analisado, e, mesmo assim, foram encontradas concentrações superiores aos níveis permitidos pela ANVISA. Embora um efeito de diluição seja observado em alguns mariscos quando todo o tecido é analisado, concentrações mais altas podem potencialmente ser detectadas ao analisar os animais inteiros na área de estudo. Portanto, o consumo de *P. perna* na área investigada pode resultar em preocupações de saúde pública para alguns dos elementos avaliados. Levando isso em consideração, a PTWI também foi calculada para cada elemento e comparada aos valores de referência propostos pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura/Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO) (Tabela 10).

No presente estudo, os valores estimados de ingestão alimentar semanal do músculo adutor posterior de *P. perna* não estavam acima de nenhum dos limites impostos pela FAO/WHO para qualquer um dos elementos avaliados. É importante notar, entretanto, que apenas o músculo adutor foi avaliado aqui. Além disso, certas populações, como os pescadores, consomem quantidades significativamente

elevadas de seus itens de captura, tornando-se assim altamente vulneráveis à degradação e contaminação ambiental (WHO 2005). Na verdade, essas populações são consideradas vulneráveis pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil (Brasil 2006, 2007). Portanto, recomenda-se o biomonitoramento contínuo dos mexilhões *P. perna* na área de estudo, principalmente quando se tem em conta as crescentes mudanças climáticas, mais devastadoras nas áreas costeiras (EC 2021) e compreendendo fatores aceleradores da lixiviação de metais dos sistemas de solo para as águas superficiais (Wijngaard et al. 2017), e afetando estuários, em particular, modificando a biodisponibilidade de metais (Machado et al. 2016).

Tabela 10. Ingestão Semanal Tolerável Provisória (PTWI) estimada de amostras de mexilhão *Perna perna* da Praia de Jurujuba, Niterói, Rio de Janeiro em comparação com PTWI recomendado da FAO/WHO ($\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal).

Elemento	Média PTWI	Pior cenário PTWI	FAO/WHO PTWI
Ag	0,07	0,13	-
Al	7,77	14,06	2000 ^c
As	1,71	3,47	Retirado*
Cd	0,04	0,06	7 ^a
Co	0,06	0,20	700 ^d
Cr	3,45	5,37	-
Cu	1,31	4,52	3500 ^a
Fe	16,64	50,76	5600 ^a
Hg	0,07	0,10	1,6 (MeHg) ^a
Mn	5,83	31,38	980 ^{a b}
Ni	1,43	1,52	35 ^{a b}
Pb	0,08	0,25	Retirado*
Se	0,73	1,56	-
V	0,40	0,66	-
Zn	41,47	94,41	7000 ^a

^a FAO/WHO (2004).

^b Calculado por uma semana.

^c FAO/WHO (2011a).

^d EVM (2002).

* PTWIs anteriormente estabelecidos para As e Pb de 15 e 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal, respectivamente, foram retirados pela WHO por já não serem considerados adequados, e ainda não foram estabelecidos novos PTWIs FAO/WHO (2011b; 2011c).

7 CAPÍTULO IV. Espectroscopia de infravermelho próximo como ferramenta de controle na comercialização de *Perna perna*

7.1 Materiais e Métodos

7.1.1 Coleta e processamento das amostras

No período entre 2019 e 2021, foram coletados 176 mexilhões, dos quais 92 eram da Praia de Jurujuba, em Niterói e 84 da Praia Vermelha, no Rio de Janeiro. Os mexilhões eram provenientes dos costões rochosos, embora também tenham sido obtidos espécimes da mitilicultura de Jurujuba. As amostras foram colocadas em uma vasilha contendo água do mar e gelo, e transportadas em uma caixa de poliestireno ao laboratório. Foram registrados o peso dos mexilhões (com conchas) e o comprimento das conchas. Uma vez que não foi encontrada na literatura nenhuma classificação para indivíduos entre > 30 mm a < 50 mm de comprimento, esta faixa de tamanho foi aqui considerada jovem. As valvas foram abertas com a ajuda de uma lâmina para a retirada do conjunto muscular, que mais tarde foi pesado. O conjunto muscular inclui os músculos retrator anterior, mediano e posterior do bisso, o músculo adutor das valvas e o músculo retrator do pé (Ferreira & Magalhães 2004). O sexo foi determinado e os fragmentos de tecidos de mexilhão foram recolhidos e congelados para análises moleculares. Todas as ferramentas de dissecação foram limpas com etanol a 70% entre as disseções individuais.

7.1.2 Análises moleculares

A extração de DNA dos mexilhões congelados de ambas as áreas foi realizada para confirmação das espécies utilizando o Mini Kit QIAamp DNA (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. As regiões ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA foram amplificadas usando os *primers* BD1 (5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') e BD2 (5'-TATGCTTAARTTCAGCGGGT-3') (Luton et al. 1992), e para a amplificação do gene mitocondrial COI foram utilizados os *primers* LCO1490 (5'-GGGTCAACAAAAATCATAAAGATTGGG-3') e HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA-3') (Folmer et al. 1994). As PCRs foram realizadas com um total de 15 µl, contendo 7,5 µl de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), 1,5 µl de cada *primer* com concentração final de 10 pmol, 2,0 µl de água ultrapura e 2,5 µl de DNA da amostra, e os parâmetros de ciclagem

utilizados foram aqueles conforme descritos pelos autores citados anteriormente. Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% em EDTA, corados com SybrGreen DNA Gel Stain (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) e visualizados no transiluminador sob UV. Os amplicons da PCR foram purificados utilizando o ExoSap-IT (USB® Products Affymetrix Inc., Cleveland, Ohio, EUA). As reações de sequenciamento do ciclo do DNA foram realizadas usando o BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o sequenciamento foi realizado por meio da PDTIS/Fiocruz. As novas sequências geradas de ambas as cadeias foram verificadas e editadas utilizando o software MEGA versão X (Kumar et al. 2018), e depois foram comparadas com outras sequências disponíveis na base de dados GenBank empregando o programa BLAST do NCBI (Altschul et al. 1990).

7.1.3 Medição dos espectros

Os músculos e as conchas foram analisados frescos, utilizando o espectrofotômetro de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) ABB Boomen MB3600, apresentando tamanho total da janela de 2 cm. As conchas foram lavadas para remover qualquer possível resíduo e colocadas sobre papel absorvente até secarem completamente, em temperatura ambiente. O excesso da umidade dos músculos foi removido usando também um papel absorvente. A metodologia adotada foi realizada de acordo com Valladares et al. (2021), com algumas modificações. As amostras foram analisadas individualmente e de forma aleatória. Os músculos foram analisados em frasco de vidro transparente de 20 mL da Thermo Fisher Scientific (Figura 23A). Os espectros das conchas foram obtidos a partir da região cicatrizada do músculo adutor posterior das valvas direitas (Figura 23B). Esta região corresponde à parte mais larga da concha de *P. perna*, ocupando toda a janela do equipamento. A parte interior da concha foi escolhida para evitar qualquer interferência de outros organismos, tais como algas e cracas, que normalmente se aderem à concha externamente. Para cada amostra, foram obtidos 50 espectros da mesma área, medidos como absorbância, dos quais foi calculado um espectro médio representativo com uma resolução de 16 cm^{-1} . Os espectros formados foram decorrentes da interação da onda eletromagnética com a amostra, dentro de um intervalo de comprimento de onda de 750 a 2.500 nm. Um frasco de vidro, com as mesmas especificações, contendo spectralon em pó foi utilizado como referência espectroscópica para todas as análises.

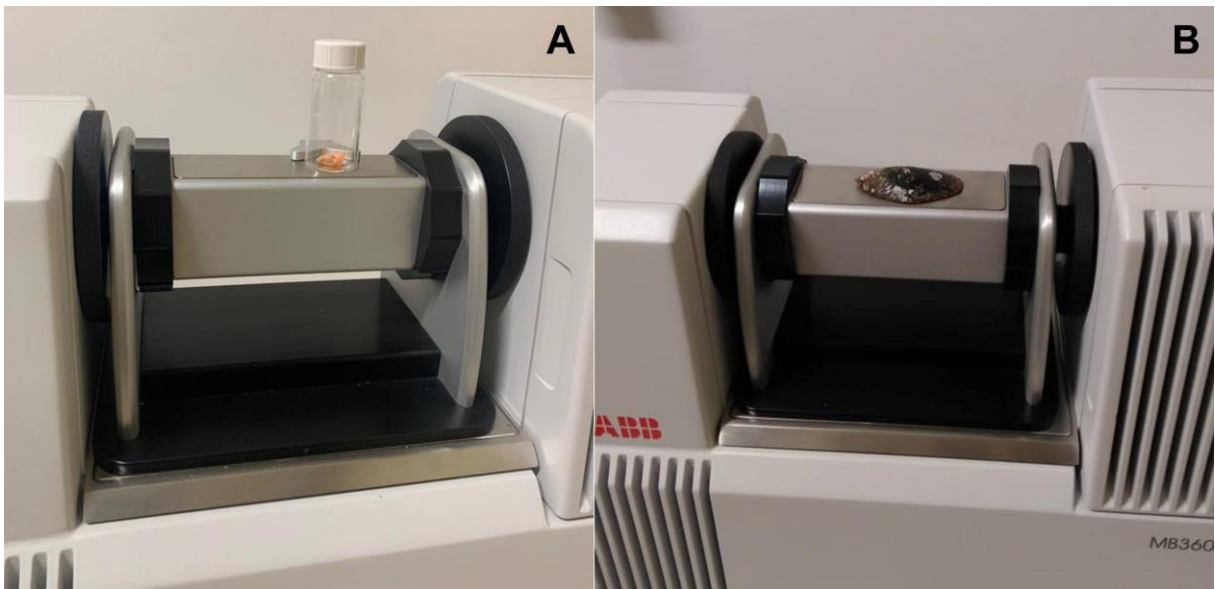


Figura 23. Aquisição dos espectros por espectrofotômetro de infravermelho próximo a partir do mexilhão *Perna perna*. A- Espectros obtidos do conjunto muscular. B- Espectros obtidos da valva direita.

7.1.4 Análises quimiométricas

As análises quimiométricas foram realizadas através do software Unscrambler X versão 10.4, onde os espectros brutos foram pré-processados utilizando o procedimento de alisamento Savitzky-Golay (janela de 31 pontos e polinômio de 2ª ordem) e a derivada Savitzky-Golay de 1ª ordem (janela de 15 pontos e polinômio de 2ª ordem), para minimizar possíveis variações referentes a ruídos que poderiam afetar os resultados finais. Os dados foram inicialmente analisados usando a Análise de Componentes Principais (PCA), para verificar a presença de agrupamentos entre as amostras. Em seguida, foi utilizada uma análise classificatória para reconhecimento de padrões. Para tanto, foi escolhida a Análise Discriminante Linear (LDA), que permitiu verificar o quanto de acertos o modelo espectrofotométrico construído foi capaz de reconhecer (Ferreira 2015).

7.1.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism versão 9. A normalidade dos dados de pesos dos músculos foi verificada primeiramente pelo teste Shapiro-Wilk. Como os dados não tinham distribuição normal, os dados foram analisados por meio do teste de Mann-Whitney ao nível de 95% de confiança, para avaliar diferenças dos pesos entre os mexilhões de cada praia e entre os mexilhões jovens e adultos.

7.2 Resultados

A maioria dos mexilhões analisados tinha conchas completamente marrom, embora algumas conchas tivessem uma ligeira tonalidade esverdeada sob o marrom. As sequências de DNA obtidas em ambas as áreas investigadas eram compatíveis com as de *P. perna* e novas sequências das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 e COI foram depositadas no GenBank sob os números de acesso OM333735 e OM333930 da Praia de Jurujuba, e OM333736 e OM333931 da Praia Vermelha.

Na Tabela 11 encontram-se os dados biométricos (comprimento total da concha, peso do animal, do conjunto muscular, e sexo) dos mexilhões por área de amostragem. Em ambas as áreas havia indivíduos machos, fêmeas e de sexo indeterminado, exceto no grupo dos < 50 mm na Praia Vermelha, que não havia nenhum de sexo indeterminado. Não foram observadas diferenças significativas entre os pesos dos músculos dos mexilhões da Praia de Jurujuba e da Praia Vermelha (p-valor = 0,1199). Contudo, diferenças significativas foram vistas entre os pesos dos músculos dos mexilhões jovens e adultos, tanto globalmente como em cada praia (quando analisadas separadamente) (p-valor < 0,0001).

Tabela 11. Dados biométricos dos mexilhões *Perna perna* analisados por área de amostragem. Os dados são expressos como os valores mínimos - máximos (médias).

Área de estudo	Comprimento da concha (mm)	Peso do mexilhão (g)	Peso do conjunto muscular (g)	Sexo < 50 mm	Sexo > 50 mm
Praia de Jurujuba	31 - 121 (64,2)	2,7 - 113,6 (29,8)	0,1 - 4,1 (1,0)	F: 20 M: 21 IND: 2	F: 26 M: 21 IND: 2
			Total	43	49
Praia Vermelha	30 - 81 (52,6)	4,3 - 37,2 (12,9)	0,1 - 1,4 (0,5)	F: 20 M: 19 IND: 0	F: 18 M: 14 IND: 13
			Total	39	45

F: fêmea; M: macho; IND: indeterminado.

Na PCA dos dados do NIRS sobre o conjunto muscular dos espécimes coletados nas duas praias do estudo em função do tamanho dos mexilhões, houve uma separação clara dos espécimes < 50 mm e > 50 mm no eixo PC-1 (88%) (Figura 24A). A porcentagem de acertos obtidos pela LDA foi de 66,03%, com a maioria dos erros registrados nos mexilhões < 50 mm. A mesma análise foi realizada

entre todas as amostras de conchas das duas áreas, demonstrando uma possível separação das pontuações em função do PC-2 (18%) (Figura 24B). Com base na classificação LDA das conchas, a porcentagem de acertos foi de 78%.

A PCA dos perfis musculares da Praia Vermelha revelou um princípio de separação entre os mexilhões < 50 mm e > 50 mm, embora muitas pontuações se sobrepusessem, enquanto que os perfis da Praia de Jurujuba foram mais claramente separados. Os PC-1 captaram 85% da variação dos dados espectrais da Praia Vermelha e 90% da Praia de Jurujuba (Figura 25A–B). O LDA alcançou a precisão de 68% para a classificação dos mexilhões na primeira área, e na segunda, foi de 78,6%. A maioria dos erros musculares foi identificada novamente em indivíduos menores que 50 mm.

Os resultados das conchas produziram desempenhos semelhantes aos resultados dos músculos, ao analisar os mexilhões separadamente por localidade. Considerando que apenas parte da concha foi analisada no NIR, o resultado da classificação LDA, separando por tamanho, obteve 62,5% de acertos entre os espécimes coletados na Praia Vermelha e 92,3% entre os espécimes coletados na Praia de Jurujuba.

Ao analisar o conjunto muscular apenas dos mexilhões adultos (> 50 mm), os espécimes das duas praias do estudo foram bem distinguidos (85%) com o eixo PC-1 (Figura 26). A precisão da classificação utilizando LDA foi de 85,7%.

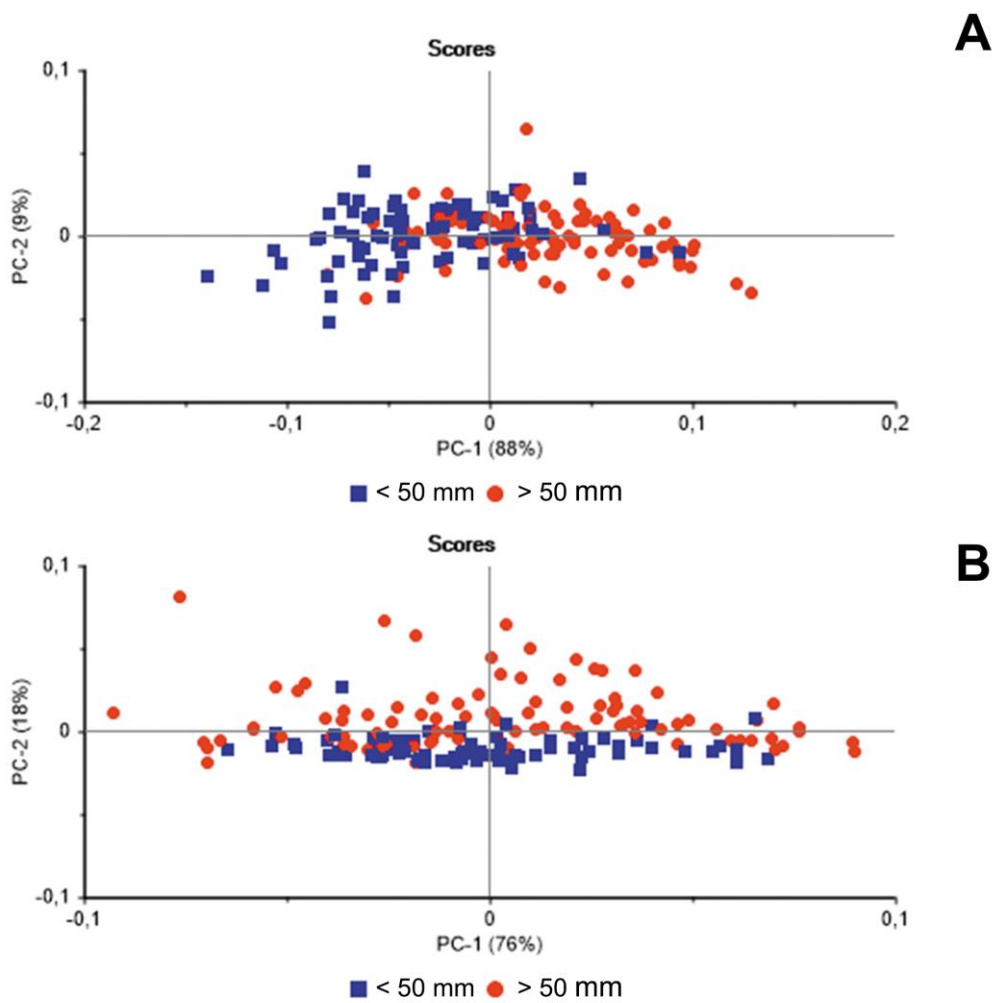


Figura 24. Análise de Componentes Principais dos mexilhões *Perna perna* coletados na Praia de Jurujuba e na Praia Vermelha das cidades de Niterói e Rio de Janeiro, respectivamente (estado do Rio de Janeiro). A- Espectros por NIR obtidos a partir dos músculos. B- Espectros por NIR obtidos a partir das conchas.

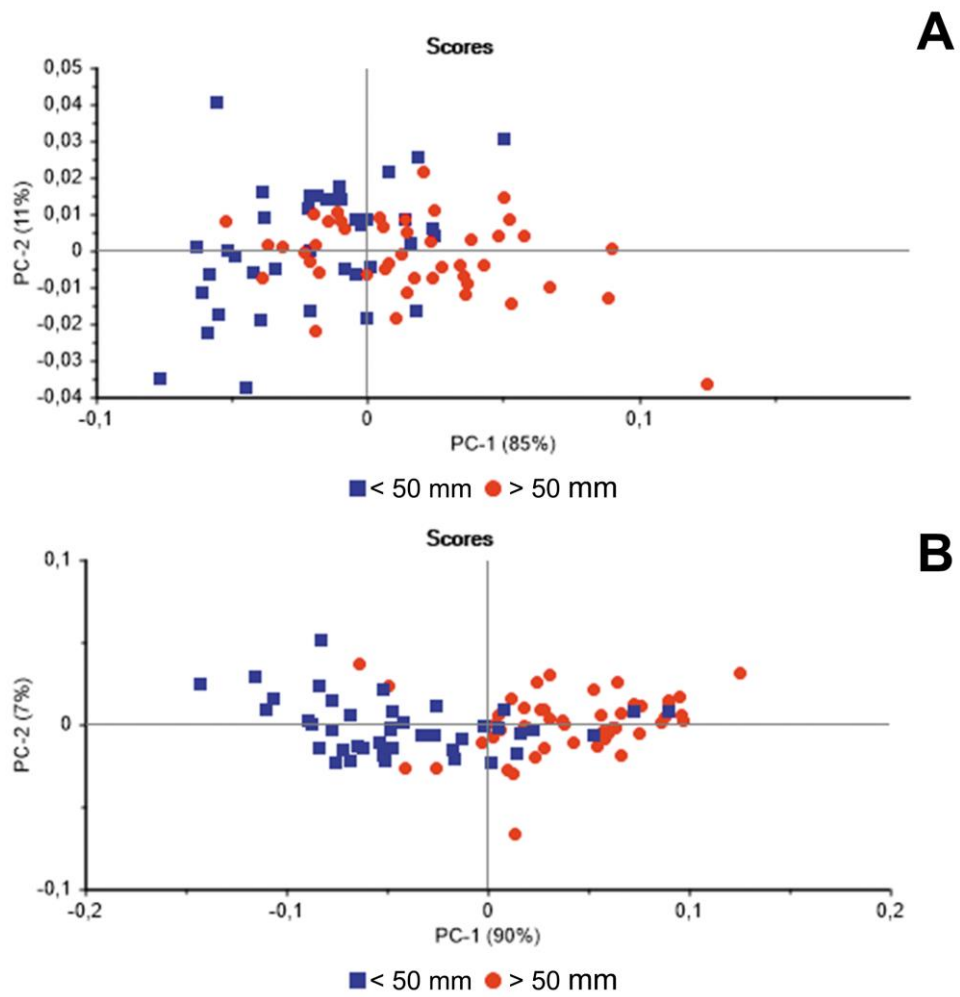


Figura 25. Análise de Componentes Principais dos músculos de *Perna perna*. A- Espectros de NIR obtidos de mexilhões da Praia Vermelha, Rio de Janeiro, RJ. B- Espectros de NIR obtidos de mexilhões da Praia de Jurujuba, Niterói, RJ.

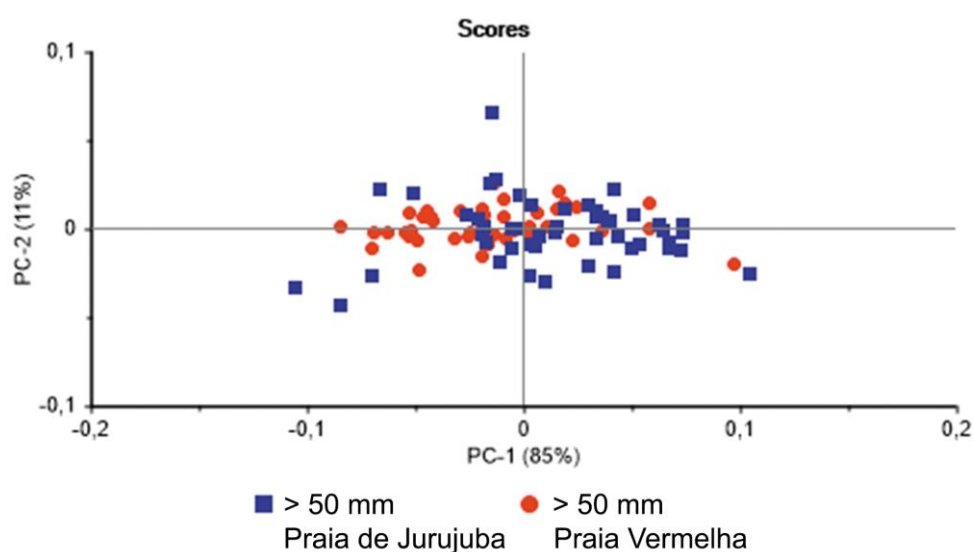


Figura 26. Análise de Componentes Principais dos espécimes de *Perna perna* maiores que 50 mm de comprimento total de concha coletados na Praia de Jurujuba e na Praia Vermelha das cidades de Niterói e Rio de Janeiro, respectivamente. Espectros de NIR obtidos a partir dos músculos dos mexilhões.

7.3 Discussão

A falta de monitoramento regulamentar no tamanho do *P. perna* extraído dos estoques naturais foi registrada em diferentes estados brasileiros (Sodré et al. 2008; Casarini & Henriques 2011; Rech & Scherer 2020). A fim de evitar potenciais impactos ambientais, que podem comprometer a sobrevivência a longo prazo dos estoques naturais, é necessário implementar procedimentos de monitoramento mais rigorosos e aplicar melhor a regulamentação existente.

Apesar da pequena variação na cor das conchas, as análises moleculares confirmaram que os mexilhões de ambas as áreas aqui investigadas pertenciam à mesma espécie, *P. perna*.

As variações sazonais, a fase reprodutiva e o sexo do indivíduo podem afetar a composição bioquímica de um mexilhão (Resgalla Jr et al. 2008). No Brasil, a reprodução de *P. perna* atinge picos em janeiro, abril, maio, junho e setembro (Marques 1998). As amostras analisadas no presente estudo foram coletadas tanto durante um destes picos (janeiro) como durante períodos de reprodução menos intensa (fevereiro, março, julho e novembro). Em novembro, os mexilhões foram coletados da mitilicultura. *Perna perna* cresce mais lentamente em ambientes

naturais do que os indivíduos cultivados, demorando aproximadamente 14 meses para atingir um comprimento de 50 mm (Henriques et al. 2001). Vários fatores podem influenciar o tempo de crescimento, incluindo a quantidade e qualidade dos alimentos disponíveis, e a temperatura da água e a sua salinidade. Apesar da potencial influência das múltiplas variáveis acima mencionadas, os resultados das PCAs totais dos músculos e das conchas demonstram a viabilidade de diferenciar *P. perna* jovem e adulto utilizando o NIRS. É interessante notar aqui que, enquanto a concha registra as condições ambientais e metabólicas vividas pelo organismo ao longo da sua vida, a composição do tecido mole reflete o período de vida mais recente (Resgalla Jr et al. 2008; Beierlein et al. 2015). Este fato pode explicar a diferença entre os resultados da concha e do conjunto muscular, dado que a concha está em contato mais direto com o ambiente.

A ausência de diferença significativa entre os pesos dos músculos dos mexilhões entre as praias indica que as diferenças encontradas pelo NIRS eram provavelmente metabólicas. Por outro lado, as diferenças altamente significativas observadas entre os músculos dos mexilhões jovens e adultos sugerem uma diferença no metabolismo entre os indivíduos < 50 mm e > 50 mm. Xião et al. (2014) observaram efeitos diferentes no metabolismo de bivalves correlacionados com o tamanho corporal e apontaram que indivíduos menores eram mais metabolicamente ativos do que os maiores.

O tamanho dos moluscos em relação à sua maturidade sexual pode ser influenciado pela pressão da constante extração de indivíduos imaturos nos estoques naturais (Lasiak 1991). Souza et al. (2019) identificaram diferenças no tamanho na primeira maturação em *P. perna* e associaram esta variação com os diferentes níveis de pressão antropogênica encontrados em cada localidade. Embora a maturidade sexual dos mexilhões não tenha sido avaliada aqui, é uma questão importante, uma vez que a falta de controle do tamanho dos mexilhões extraídos dos estoques naturais pode influenciar o fenótipo químico dos indivíduos menores que 50 mm, devido à antecipação da maturidade. Como esta hipótese ainda não pode ser confirmada no presente estudo, será necessária mais investigação, com base na aplicação de técnicas complementares à NIRS.

Os bivalves têm hábitos alimentares filtrantes, sendo capazes de acumular contaminantes presentes no ambiente em que vivem, e a exposição destes organismos a fatores de estresses específicos pode gerar alterações bioquímicas, histológicas, fisiológicas e genéticas (Resgalla Jr et al. 2008). Os resultados das

análises de todos os mexilhões maiores que 50 mm sugerem que as características ambientais influenciam no metabolismo dos mexilhões, uma vez que todos os indivíduos eram adultos. Esses dados podem ser utilizados como marcadores para identificação da origem dos mexilhões.

Numa análise NIRS, Valladares et al. (2021) descobriram que os ambientes de campo e de laboratório tinham efeitos diferentes no metabolismo dos caramujos de água doce, *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) e *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835), e inferem que o NIRS pode ser uma ferramenta muito prática e útil na discriminação dessas espécies transmissoras de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Usando a mesma técnica, Bartlett et al. (2018) demonstraram os efeitos do estresse nos bivalves marinhos através de alterações energéticas naturais e contaminação por metais com amostras moídas. Embora a Praia Vermelha e a Praia de Jurujuba estejam localizadas na mesma baía, ambas são afetadas por impactos ambientais distintos. A Praia Vermelha está exposta diretamente às ondas oceânicas, com fácil acesso aos costões rochosos e está aberta ao público, enquanto que a Praia de Jurujuba é mais calma, e sem banhistas. Como foi visto no Capítulo III desta tese, os mexilhões da Praia de Jurujuba apresentaram elevados níveis de certos elementos químicos. O potencial para a identificação de mexilhões adultos coletados de diferentes áreas pelo NIRS é uma descoberta valiosa, pois pode contribuir para a avaliação da qualidade do ambiente e, conseqüentemente, dos próprios animais. Em particular, os dados aqui apresentados podem ser utilizados para calibrar os modelos NIRS para a análise de amostras de *P. perna* de outras zonas da costa do Rio de Janeiro.

Embora as análises das conchas tenham demonstrado que são também um bom modelo para a classificação por tamanho no NIR, a vantagem de aplicar esta técnica ao conjunto muscular, em vez da concha, é o fato dos mexilhões serem frequentemente vendidos para consumo sem a concha.

8 CONCLUSÕES

A taxonomia integrativa de helmintos possibilitou a identificação morfológica e genética de esporocistos e cercárias de *Proisorhynchoides* sp. que é aqui referido pela primeira vez em mexilhões da costa do Rio de Janeiro. Análises histopatológicas do manto não indicaram lesões associadas ao parasitismo pelo trematódeo *Proisorhynchoides* sp. no mexilhão hospedeiro intermediário. Novas sequências genéticas do hospedeiro e trematódeos foram depositadas no GenBank e servirão como base para comparações em futuras pesquisas sobre parasitos larvais, bem como para adultos e seus hospedeiros definitivos.

Apesar de não haver sinais aparentes de contaminação nos mexilhões, a presença de fungos filamentosos foi detectada em 96,7% das amostras. Os fungos foram identificados por características morfológicas com exceção dos gêneros *Aureobasidium*, *Didymella* e *Phaeoisaria* que foram identificados através de novas sequências genéticas. *Didymella* e *Phaeoisaria* são referidos pela primeira vez em bivalves, e novos dados morfológicos e genéticos poderão apoiar a identificação de espécies em estudos futuros. Os gêneros mais predominantes foram *Aspergillus* seguido por *Didymella* e *Penicillium*.

Entre os fungos identificados, *A. awamori*, *A. japonicus*, *A. versicolor*, *A. sydowii* e *A. niger* são conhecidos como fungos oportunistas que produzem micotoxinas associadas a efeitos degenerativos nos sistemas urinário, digestório e respiratório em humanos. Apesar da ANVISA estabelecer limites máximos toleráveis de algumas micotoxinas em alimentos, não foram estabelecidos limites aceitáveis para o consumo humano de moluscos bivalves.

O consumo de mexilhões *P. perna* da área investigada pode acarretar riscos potenciais à saúde do consumidor em decorrência da presença de As, Cr, Se e Zn, em níveis que excederam os limites estabelecidos por agências reguladoras brasileiras e internacionais.

Os resultados das análises helmintológicas, fúngicas e de contaminação elementar demonstraram a necessidade de monitoramento na área de estudo visando ao uso seguro desses bivalves para o consumo humano.

A diferenciação de *P. perna* jovens de adultos provenientes de diferentes áreas foi observada no NIRS através de fenótipos químicos diferenciados usando tanto uma parte específica da concha como o conjunto muscular. O NIRS utilizado

provou ser uma ferramenta potencialmente rápida e valiosa para a inspeção do tamanho dos mexilhões comercializados a partir de estoques naturais.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta V, Prieto A, Lodeiros C. Índice de condición de los mejillones *Perna perna* y *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) bajo un sistema suspendido de cultivo en la Ensenada de Turpialito, Golfo de Cariaco, Venezuela. *Zootecnia Trop.* 2006; 24(2): 177-192.

Addum FM, Oliveira CS. Prevalência parasitária de *Bucephalus* (Von Baer, 1827) em *Perna perna* (Linnaeus, 1958) em dois costões rochosos no litoral do Espírito Santo. *Revista Científica Faesa.* 2010; 6(1): 69-76.

Alloway BJ, Ayres DC. *Chemical Principles of Environmental Pollution.* London: Blackie Academic & Professional; 1997. 416 pp.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215(3): 403-410.

ANVISA. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961 referente a normas regulamentadoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. *Diário Oficial da União.* 1965.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. *Diário Oficial da União.* 2013.

Avelar WEP, Mantelatto FLM, Tomazelli AC, Silva DML, Shuhama T, Lopes JLC. The marine mussel *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) as an indicator of contamination by heavy metals in the Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Water Air Soil Pollut.* 2000; 118: 65-72.

Azevedo JAM, Barros AB, Mirando PRB, Costa JG, Nascimento VX. Biomonitoring of Heavy Metals (Fe, Zn, Cu, Mn, Cd and Cr) in Oysters: *Crassostrea rhizophorae* of Mangrove Areas of Alagoas (Brazil). *Braz Arch Biol Technol.* 2019; 63: 1-11.

Baptista Neto JA, Silva MAM. Caracterização dos Sedimentos de Fundo e Dinâmica Sedimentar da Enseada de Jurujuba (Baía de Guanabara), Niterói, RJ. *Pesquisas.* 1996; 23(1/3): 7-16.

Baptista Neto JA, Smith BJ, McAllister JJ, Silva MAM. Fontes e transporte de metais pesados para a Enseada de Jurujuba (Baía de Guanabara) SE – Brasil. *Rev Tamoios.* 2005; 2: 11-21.

Barbosa IS, Brito GB, Santos GL, Santos LN, Teixeira LSG, Araujo RGO, Korn MGA. Multivariate data analysis of trace elements in bivalve molluscs: Characterization and food safety evaluation. *Food Chem.* 2019; 273: 64-70.

Bartlett JK, Maher WA, Purss MJB. Cellular energy allocation analysis of multiple marine bivalves using near infrared spectroscopy. *Ecol Indic.* 2018; 90: 247-256.

Beierlein L, Nehrke G, Trofimova T, Brey T. Bivalve Shells—Unique High-Resolution Archives of the Environmental Past. In: Lohmann G, Meggers H, Unnithan V, Wolf-Gladrow D, Notholt J, Bracher A. *Towards an Interdisciplinary Approach in Earth System Science.* Springer; 2015. 173-182.

Belabed BE, Laffray X, Dhib A, Fertouna-Belakhal M, Turki S, Aleya L. Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria). *Mar Pollut Bull.* 2013; 74(1): 477-489.

Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW. The genus *Cladosporium*. *Stud Mycol.* 2012; 72: 1-401.

Bensch K, Groenewald JZ, Meijer M, Dijksterhuis J, Jurjević Ž, Andersen B, Houbraken J, Crous PW, Samson RA. *Cladosporium* species in indoor environments. *Stud Mycol.* 2018; 89: 177-301.

Borzykh OG, Zvereva LV. Filamentous fungi in the epibiosis of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Bivalvia) in Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russ J Mar Biol.* 2012a; 38(6): 454-455.

Borzykh OG, Zvereva LV. Mycobiota of the giant oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1787) (Bivalvia) from the Peter the Great Bay of the Sea of Japan. *Microbiology.* 2012b; 81(1): 109-111.

Borzykh OG, Zvereva LV. Comparison of fungal complexes of Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1856) from different areas in the Peter the Great Bay of the sea of Japan. *Microbiology.* 2014; 83(5): 684-689.

Borzykh OG, Zvereva LV. Mycobiota of the bivalve mollusk *Anadara broughtoni* (Schrenck, 1867) from various parts of Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russ J Mar Biol.* 2015; 41(4): 321-323.

Borzykh OG, Zvereva LV. Fungal assemblages associated with commercial bivalve species in coastal waters of the Sea of Japan, Russia. *Botanica Marina.* 2018; 61(4): 355-363.

Botha CJ, Truter M, Bredell T, Lange L, Mülders MSG. Putative *Aspergillus niger*-induced oxalate nephrosis in sheep. *J S Afr Vet Assoc.* 2009; 80(1): 50-53.

Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, Heled J, Jones G, Kühnert D, De Maio N, Matschiner M, Mendes FK, Müller NF, Ogilvie HA, du Plessis L, Poppinga A, Rambaut A, Rasmussen D, Siveroni I, Suchard MA, Wu CH, Xie D, Zhang C, Stadler T, Drummond AJ. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLOS Comput Biol.* 2019; 15(4): e1006650.

Brasil. Apparent Per Capital Consumption of Fish in Brazil 1996–2009. Ministry of Fisheries and Agriculture. 2009.

Brasil. Decreto de 13 de julho de 2006. Altera a denominação, competência e composição da Comissão Nacional de Desenvolvimento Sustentável das Comunidades Tradicionais e dá outras providências. 2006 [acesso em: 27 ago 2020]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2004-2006/2006/Dnn/Dnn10884.htm.

Brasil. Decreto nº 6.040, de 7 de fevereiro de 2007. Institui a política nacional de desenvolvimento sustentável dos povos e comunidades tradicionais. 2007 [acesso em: 27 ago 2020]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2007/decreto/d6040.htm.

Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, nº 37, p. 72, 22 fev. 2011.

Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 138, de 8 de fevereiro de 2017. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, nº 29, p. 45, 9 fev. 2017.

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol.* 1997; 83(4): 575-583.

Calvo-Ugarteburu G, McQuaid CD. Parasitism and introduced species: epidemiology of trematodes in the intertidal mussels *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis*. *J Exp Mar Biol Ecol.* 1998; 220: 47-65.

Campolim MB, Henriques MB, Barbieri E. Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn in mussels collected in Santos Bay, São Paulo, Brazil: limits required by local legislation. *Bol Inst Pesca.* 2018; 44(4): 1-8.

Campolim MB, Henriques MB, Petesse ML, Rezende KFO, Barbieri E. Metal trace elements in mussels in Urubuqueçaba Island, Santos Bay, Brazil. *Pesqui Agropecu Bras.* 2017; 52(12): 1131-1139.

Carneiro-Schaefer AL, Sühnel S, Melo CMR, Magalhães ARM. Estudo patológico em mexilhões cultivados em Santa Catarina, Brasil. *Bol Inst Pesca.* 2017; 43(1): 124-134.

Carranza A, Borthagaray AI. The brown mussel *Perna perna* in the native mussel beds of Cerro Verde (Uruguay). *Mar Biodivers Rec.* 2009; 2: 1-7.

Carson FL, Cappellano CH. *Histotechnology: A Self Instructional Text.* Chicago: ASCP Press; 2015.

Carvalho CEV, Cavalcante MPO, Gomes MP, Faria VV, Rezende CE. Distribuição de metais pesados em mexilhões (*Perna perna*, L.) da Ilha de Santana, Macaé, SE, Brasil. *Ecotoxicology and Environmental Restoration.* 2001; 4(1): 1-5.

Casarini LM, Henriques MB. Estimativa de estoque do mexilhão *Perna perna* e da espécie invasora *Isognomon bicolor* em bancos naturais da Baía de Santos, São Paulo, Brasil. *Bol Inst Pesca.* 2011; 37(1): 1-11.

Castillo I, Acosta V, Martínez G, Núñez M. Niveles de metales pesados em gónadas y músculo aductor del mejillón marrón, *Perna perna*, cultivado en la ensenada de Turpialito, Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. *Zootec Trop.* 2005; 23(2): 141-154.

Catharino MGM, Vasconcellos MBA, Kirschbaum AA, Gasparro MR, Minei CC, Sousa ECPM, Seo D, Moreira EG. Biomonitoring of coastal regions of São Paulo State, Brazil, using mussels *Perna perna*. *J Radioanal Nucl Chem.* 2012; 291: 113-117.

Cochôa AR, Magalhães ARM. Perdas de sementes de mexilhões *Perna perna* (L., 1758), cultivados na Baía Norte - Ilha de Santa Catarina/SC. *Bol Inst Pesca.* 2008; 34(1): 1-10.

Coleman N, Castrejon A, Blaine C, Chemmachel T. *The Toxicology of Essential and Nonessential Metals.* Lulu Publishing Services; 2017. 198 pp.

Conti ME, Stripeikis J, Finoia MG, Tudino MB. Traço de metais de linha de base em moluscos bivalves do Canal de Beagle, Patagônia (Argentina). *Ecotoxicology.* 2011; 20: 1341-1353.

Cribb TH, Bray RA, Littlewood DTJ. The nature and evolution of the association among digeneans, molluscs and fishes. *Int J Parasitol.* 2001; 31: 997-1011.

Cullen WR, Reimer KJ. Arsenic is Everywhere: Cause for Concern? Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2017. 293 pp.

Davis ND. Sterigmatocystin and other mycotoxins produced by *Aspergillus* species. J Food Prot. 1981; 44(9): 711-714.

Diop M, Howsam M, Diop C, Goossens JF, Diouf A, Amara R. Assessment of trace element contamination and bioaccumulation in algae (*Ulva lactuca*), mussels (*Perna perna*), shrimp (*Penaeus kerathurus*), and fish (*Mugil cephalus*, *Saratherondon melanotheron*) along the Senegalese coast. Mar Pollut Bull. 2016; 103(1): 339-343.

Dong W, Jeewon R, Hyde KD, Yang E, Zhang H, Yu X, Wang G, Suwannarach N, Doilom M, Dong Z. Five Novel Taxa from Freshwater Habitats and New Taxonomic Insights of Pleurotheciales and Savoryellomycetidae. J Fungi. 2021; 7: 711.

Dube HC. An Introduction to Fungi. 4^a ed. India: Scientific Publishers; 2013. 603 pp.

Ebrahimi M, Taherianfard M. The effects of heavy metals exposure on reproductive systems of cyprinid fish from Kor River. Iran J Fish Sci. 2011; 10(1): 13-24.

EC. Commission Regulation (EC) no. 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union; 2006.

EC. The challenge of climate change to the European coastal areas. 2021 [acesso em: 30 jan 2021]. Disponível em: https://ec.europa.eu/environment/iczm/state_coast.htm.

Edrington TS, Kamps-Holtzapfel CA, Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH, Rottinghaus GE. Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material. J Anim Sci. 1995; 73: 508-515.

Ellis MB. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew: Commonwealth Mycological Institute; 1971. 608 pp.

Ellis MB. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew: CABI; 1976. 507 pp.

Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Eurachem Guide, First English Edition 1.0. 1998.

EVM. Review of cobalt. Expert Group on Vitamins and Minerals Secretariat revised August, EVM/00/07; 2002.

Eydal M, Freeman MA, Kristmundsson Á, Bambir SH, Jónsson PM, Helgason S. *Proisorhynchoides borealis* Bartoli, Gibson & Bray, 2006 (Digenea: Bucephalidae) cercariae from *Abra prismatica* (Mollusca: Bivalvia) in Icelandic waters. J Helminthol, 2013; 87: 34-41

FAO. Limited trade in bivalves. 2017 [acesso em: 14 mar 2021]. Disponível em: <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/522564/>.

FAO/WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants: fifty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series no. 896; 2000.

FAO/WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series no. 966; 2011a.

FAO/WHO. Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series no. 959; 2011b.

FAO/WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series no. 960; 2011c.

FAO/WHO. Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO expert Committee on Food Additives (JECFA 1956-2003): first through sixty first meetings. ILSI Press International Life Sciences Institute; 2004.

Fernandes BMM, Justo MCN, Anjos CS, Malta JCO, Dumbo JC. Digenea parasites of *Acestrorhynchus falcirostris* (Osteichthyes, Acestrorhynchidae) in the state of Amazonas, Brazil. Braz J Vet Parasitol. 2017; 26(4): 439-445.

Ferreira MMC. Preparação dos dados para análise. In: Ferreira MMC. Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações. Campinas: Editora Unicamp; 2015. 29-107.

Ferreira AG, Machado ALS, Zalmon IR. Temporal and Spatial Variation on Heavy Metal Concentrations in the bivalve *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) on the Northern Coast of Rio de Janeiro State, Brazil. Braz Arch Biol Technol. 2004; 47(2): 319-327.

Ferreira JF, Magalhães ARM. Cultivo de mexilhões. In: Poli CR, Poli ATB, Andreatta ER, Beltrame E. Aquicultura: experiências brasileiras. Florianópolis: Multitarefa; 2004. 221-250.

Fluckiger M, Brown MR, Ward LR, Moltschaniwskyj NA. Predicting glycogen concentration in the foot muscle of abalone using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Food Chem.* 2011; 126: 1817-1820.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994; 3(5): 294-299.

Francioni E, Wagener ALR, Calixto RC, Bastos GC. Evaluation of *Perna perna* (Linné, 1758) as a Tool to Monitoring Trace Metals Contamination in Estuarine and Coastal Waters of Rio de Janeiro, Brazil. *J Braz Chem Soc.* 2004; 15(1): 103-110.

Freire C, Ramos R, Lopez-Espinosa M, Díez S, Vioque J, Ballester F, Fernández M. Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environmental Research.* 2010; 110: 96-104.

Fries AS, Coimbra JP, Nemazie DA, Summers RM, Azevedo JPS, Filoso S, Newton M, Gelli G, Oliveira RCN, Pessoa MAR, Dennison WC. Guanabara Bay ecosystem health report card: Science, management, and governance implications. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 2019; 25: 100474.

Frisvad JC, Møller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biot.* 2018; 102: 9481-9515.

FSANZ. Australia New Zealand Food Standards Code – Schedule 19 – Maximum levels of contaminants and natural toxicants. 2017 [acesso em: 8 ago 2020]. Disponível em: <https://www.legislation.gov.au/Details/F2017C00333>.

Fujiki M, Tajima S. The pollution of Minamata Bay by mercury. *Water Sci Technol.* 1992; 25(11): 133-140.

Galvão MSN, Henriques MB, Pereira OM, Marques HLA. Ciclo reprodutivo e infestação parasitária de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *B Inst Pesca.* 2006; 32(1): 59-71.

Garcia P, Magalhães ARM. Protocolo de identificação e quantificação de Bucefalose (enfermidade laranja) em mexilhões *Perna perna*. *B Inst Pesca.* 2008; 34(1): 11-19.

Gibson DI. Class Trematoda Rudolphi, 1808. In: Gibson DI, Jones A, Bray RA. *Keys to the Trematoda.* London: CABI Publishing; 2002. 1-3.

Girisham S, Rao VK, Reddy SM. Taxonomy of mycotoxigenic fungi. 1^a ed. India: Scientific Publishers; 2016. 317 pp.

Gomes DNF, Cavalcanti MAQ, Fernandes MJS, Lima DMM, Passavante JZO. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. *Braz J Biol.* 2008; 68(3): 577-582.

Gontia-Mishra I, Tripathi N, Tiwari S. A simple and rapid DNA extraction protocol for filamentous fungi efficient for molecular studies. *Indian J Biotechnol.* 2014; 13: 536-539.

Grovel O, Pouchus YF, Verbist J. Accumulation of gliotoxin, a cytotoxic mycotoxin from *Aspergillus fumigatus*, in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Toxicon.* 2003; 42: 297-300.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999; 41: 95-98.

Hammond MD, Cribb TH, Nolan MJ, Bott NJ. Two new species of *Prosoerhynchoidea* (Digenea: Bucephalidae) from *Tylosurus crocodilus* (Belonidae) from the great barrier reef and French Polynesia. *Parasitol. Int.* 2020; 75: 102005.

Hauser-Davis RA, Bordon ICAC, Oliveira TF, Ziolli RL. Metal bioaccumulation in edible target tissues of mullet (*Mugil liza*) from a tropical bay in Southeastern Brazil. *J Trace Elem Med Biol.* 2016; 36: 38-43.

Henriques MB, Marques HLA, Barrella W, Pereira OM. Estimativa do Tempo de Recuperação de um Banco Natural do Mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na Baía de Santos, Estado de São Paulo. *HOLOS Environment.* 2001; 1(2): 85-100.

Hicks DW, Tunnell Jr JW. Ecological notes and patterns of dispersal in the recently introduced mussel, *Perna perna* (Linne, 1758), in the Gulf of Mexico. *Am Malacol Bull.* 1995; 11(2): 203-206.

IARC. A review of human carcinogens. Part C: Arsenic, metals, fibres, and dusts/ IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012.

IBAMA. Instrução Normativa nº 105, de 20 de julho de 2006. Diário Oficial da União. 2006.

IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal: Tabela 3940 - Produção da aquicultura, por tipo de produto. 2020 [acesso em: 10 nov 2021]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>.

Index Fungorum. Search Index Fungorum. 2022 [acesso em: 20 fev 2022]. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>.

Igic PG, Lee E, Harper W, Roach KW. Toxic Effects Associated with Consumption of Zinc. *Mayo Clin Proc.* 2002; 77: 713-716.

Inmetro. Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008. 2016.

Kehrig HA, Costa M, Malm O. Estudo da contaminação por metais pesados em peixes e mexilhão da Baía de Guanabara – Rio de Janeiro. *Trop Oceanogr.* 2007; 35(1): 32-50.

Kehrig HA, Costa M, Moreira I, Malm O. Total and Methyl Mercury in Different Species of Molluscs from Two Estuaries in Rio de Janeiro State. *J Braz Chem Soc.* 2006; 17(7): 1409-1418.

Kimmerling EA, Fedrick JA, Tenholder MF. Invasive *Aspergillus niger* with fatal pulmonary oxalosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest.* 1992; 101: 810-872.

Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2002. 116 pp.

Knechtges P. Food Safety: Theory and Practice. United States of America: Jones & Bartlett; 2012. 460 pp.

Kohn A. Nota prévia sobre uma nova espécie do gênero *Bucephalopsis* Diesing, 1855 (Trematoda, Bucephaliformes). *Atas Soc. Biol.* 1962; 6: 14-18.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35: 1547-1549.

Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1998; 73: 331-371.

Lage H, Jablonski S. Mussel *Perna perna* extraction and commercialization in Guanabara Bay, Brazil. *Atlântica.* 2008; 30(2): 161-169.

Lasiak T. The Susceptibility and/or Resilience of Rocky Littoral Molluscs to Stock Depletion by the Indigenous Coastal People of Transkei, Southern Africa. *Biological Conservation.* 1991; 56: 245-264.

Lasiak TA. Bucephalid trematode infections in the brown mussel *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae). *S Afr J Mar Sci.* 1993; 13: 127-134.

Lauckner G. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: Kinne O. Diseases of Marine Animals. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland; 1983. 477-961.

Lavradas RT, Rocha RCC, Bordon ICAC, Saint’Pierre TD, Godoy JM, Hauser-Davis RA. Differential metallothionein, reduced glutathione and metal levels in *Perna perna* mussels in two environmentally impacted tropical bays in southeastern Brazil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016; 129: 75-84.

Legraa MH, Er-Raioui H, Dartige AY, Zamel MLC, Abidine MMO, Sidoumou Z, Saleck AM. Assesement of metallic contamination of the Northern Atlantic coast of Mauritania (Coastal Fringe “Levrier Bay”), using *Perna perna*. *Int J Civ Eng Technol.* 2019; 10(4): 782-795.

Levinson W. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 13^a ed. Porto Alegre: AMGH; 2016. 787 pp.

Li S, Young T, Archer S., Lee K., Sharma S, Alfaro AC. Mapping the Green-Lipped Mussel (*Perna canaliculus*) Microbiome: A Multi-Tissue Analysis of Bacterial and Fungal Diversity. *Curr Microbiol.* 2022; 79(76).

Lima FC, Abreu MG, Mesquita EFM. Monitoramento histopatológico de mexilhão *Perna perna* da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001; 53(2): 1-5.

Lino AS, Galvão PMA, Longo RTL, Azevedo-Silva CE, Dorneles PR, Torres JPM, Malm O. Metal bioaccumulation in consumed marine bivalves in Southeast Brazilian coast. *J Trace Elem Med Biol.* 2016; 34: 50-55.

Linos A, Petralias A, Christophi CA, Christoforidou E, Kouroutou P, Stoltidis M, Veloudaki A, Tzala E, Makris K, Karagas MR. Oral ingestion of hexavalent chromium through drinking water and cancer mortality in an industrial area of Greece - An ecological study. *Environmental Health.* 2011; 10: 1-8.

Lopes MB, Amorim A, Calado C, Costa PR. Determination of Cell Abundances and Paralytic Shellfish Toxins in Cultures of the Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* by Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy. *J Mar Sci Eng.* 2018; 6(4): 147.

Loureiro EDR, Moraes RBC, Almeida TCM. Estudos de Campo - Influência da poluição da Baía de Guanabara na infecção parasitária de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758). In: Moraes R, Crapez M, Pfeiffer W, Farina M, Bainy A, Teixeira V. *Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos*. São Paulo: Arte & Ciências Villipress; 2001. 89-102.

Lourenço CR, Nicastro KR, Serrão EA, Zardi GI. First record of the brown mussel (*Perna perna*) from the European Atlantic coast. *Mar Biodivers Rec.* 2012; 5 e 39: 1-4.

Lunetta JE. Fisiologia da reprodução dos mexilhões (*Mytilus perna* - Mollusca lamellibranchia). Bolm Zool Biol Mar. 1969; 26: 33-111.

Luton K, Walker D, Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). Mol Biochem Parasitol. 1992; 56: 323-328

MacFarquhar JK, Broussard DL, Melstrom P, Hutchinson R, Wolkin A, Martin C, Burk RF, Dunn JR, Green AL, Hammond R, Schaffner W, Jones TF. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. Arch Intern Med. 2010; 170(3): 256-261.

Machado AS, Zarfl C, Toffolon M, Cronin K, O'Shea FT. Could climate change affect metal pollution in estuaries? 7th SETAC World Congress/SETAC North America 37th Annual Meeting. Orlando; 2016.

MAFF. Monitoring and surveillance of non-radioactive contaminants in the aquatic environment and activities regulating the disposal of wastes at sea, 1995 and 1996. Aquatic Environment Monitoring Report no. 51. CEFAS; 1998.

Magaña-Dueñas V, Cano-Lira JF, Stchigel AM. New Dothideomycetes from Freshwater Habitats in Spain. J Fungi. 2021; 7: 1102.

Magalhães ARM. Efeito da parasitose por Trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição de mexilhões *Perna perna* (L.). [PhD Thesis]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 1998. 185 pp.

Månsson M, Klejnstrup ML, Phipps RK, Nielsen KF, Frisvad JC, Gottfredsen CH, Larsen TO. Isolation and NMR characterization of fumonisin B₂ and a new fumonisin B₆ from *Aspergillus niger*. J Agric Food Chem. 2010; 58: 949-953.

Marchiori NC, Magalhães ARM, Pereira Jr J. The life cycle of *Bucephalus margaritae* Ozaki & Ishibashi, 1934 (Digenea, Bucephalidae) from the coast of Santa Catarina State, Brazil. Acta Sci Biol Sci. 2010; 32(1): 71-78.

Marques HLA. Criação comercial de mexilhões. São Paulo: Nobel; 1998. 109 pp.

Matallah-Boutiba A, Ruiz N, Sallenave-Namont C, Grovel O, Amiard J, Pouchus YF, Boutiba Z. Screening for toxigenic marine-derived fungi in Algerian mussels and their immediate environment. Aquaculture. 2012; 342-343: 75-79.

MHPRC. National food safety standard: Maximum levels of contaminants in food. GB 2762-2012; 2012.

Mogensen JM, Frisvad JC, Thrane U, Nielsen KF. Production of fumonisin B₂ and B₄ by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. J Agric Food Chem. 2010; 58: 954-958.

Moraes AML, Paes RA, Holanda VL. Micologia. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. v. 4. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC; 2009. 399-496.

Muñoz G, Valdivia I, López Z. The life cycle of *Proisorhynchoides carvajali* (Trematoda: Bucephalidae) involving species of bivalve and fish hosts in the intertidal zone of central Chile. J Helminthol. 2015; 89: 584-592.

Niterói. Praias de Niterói alcançam maior índice de balneabilidade desde 2013. 2017 [acesso em: 7 jul 2020]. Disponível em: http://www.niteroi.rj.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=5092&Itemid=1.

Niterói. “Praia Hoje” traz informações sobre balneabilidade na orla da cidade. 2019 [acesso em: 7 jul 2020]. Disponível em: http://www.niteroi.rj.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=5653&Itemid=1.

Nolan MJ, Cribb TH. The Use and Implications of Ribosomal DNA Sequencing for the Discrimination of Digenean Species. Adv Parasitol. 2005; 60: 101-163.

Nolan MJ, Curran SS, Miller TL, Cutmore SC, Cantacessi C, Cribb TH. *Dollfustrema durum* n. sp. and *Heterobucephalopsis perardua* n. sp. (Digenea: Bucephalidae) from the giant moray eel, *Gymnothorax javanicus* (Bleeker) (Anguilliformes: Muraenidae), and proposal of the Heterobucephalopsinae n. subfam. Parasitol Int. 2015; 64: 559-570.

Nylander JAA. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University; 2004.

O Globo. Expansão da maricultura em Jurujuba, que já foi premiada pela ONU, agora preocupa navegantes. 2015 [acesso em: 27 jan 2021]. Disponível em <https://oglobo.globo.com/rio/bairros/expansao-da-maricultura-em-jurujuba-que-ja-foi-premiada-pela-onu-agora-preocupa-navegantes-15961888>.

Oliveri C, Torta L, Catara V. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. Int J Food Microbiol. 2008; 127: 147-154.

Orren MJ, Eagle GA, Hennig HFKO, Green A. Variations in Trace Metal Content of the Mussel *Choromytilus meridionalis* (Kr.) with Season and Sex. Mar Pollut Bull. 1980; 11: 253-257.

Paret ML, Dufault NS, Newark M, Freeman JH. Management of Gummy Stem Blight (Black Rot) on Cucurbits in Florida. UF/IFAS Extension Service, University of Florida. 2018; PP280.

Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. Food Addit Contam. 1988; 5(3): 299-301.

Pitt JI. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC; 2000. 197 pp.

Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage. 3^a ed. New York: Springer; 2009. 519 pp.

PNQA. Indicadores de Qualidade – Índice de Balneabilidade. 2021 [acesso em 27 jan 2021]. Disponível em: <http://pnqa.ana.gov.br/indicadores-balneabilidade.aspx>.

Porea TJ, Belmont JW, Maboney DH. Zinc-induced anemia and neutropenia in an adolescent. J Pediatr. 2000; 136(5): 688-690.

Powers-Fletcher MV, Kendall BA, Griffin AT, Hanson KE. Filamentous fungi. Microbiol Spectr. 2016; 4(3): 1-29.

Purchase IFH, Van der Watt JJ. Carcinogenicity of sterigmatocystin to rat skin. Toxicol Appl Pharm. 1973; 26: 274-281.

Rambaut A. FigTree v1.4.4. 2018 [acesso em 25 nov 2021]. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. Syst. Biol. 2018; 67(5): 901-904.

Raper KB, Fennell DI. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1965. 686 pp.

Rech TF, Scherer MEG. Entre a Pedra e a Onda: Legislação e Percepções da Extração de *Perna perna* dos Costões da Ilha de Santa Catarina. Revista Costas. 2020; 2(2): 87-106

Resgalla Jr C, Weber LI, Conceição MB. O Mexilhão *Perna perna* (L.): biologia, ecologia e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência; 2008. 324 pp.

Ricci I, Damiani C, Scuppa P, Mosca M, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Capone A, Gonella E, Ballarini P, Chouaia B, Sagnon N, Esposito F, Alma A, Mandrioli M, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Favia G. The yeast *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) inhabits the midgut and reproductive system of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. *Environ Microbiol.* 2011; 13(4): 911-921.

Rivalier E, Seydel S. Nouveau procédé de culture sur lames gélosées appliqué a l'étude microscopique des champignons deteignes. *Ann Parasitol.* 1932; 10(5): 444-452.

Rosa AH, Fraceto LF, Moschini-Carlos V. Meio Ambiente e Sustentabilidade. Porto Alegre: Bookman; 2012. 411 pp.

Salazar-Vallejo SIS, González NE. A preliminary study of the relation between *Nemertopsis gracilis* (Nemertea), *Chthamalus fesus* (Cirripedia) and *Collisella* spp (Gastropoda). *Cienc Mar.* 1986; 12(1): 51-71.

Salehi M, Zibafar E, Mahmoudi S, Hashemi SJ, Gatmiri SM, Shoar MG, Manshadi SAD, Jahanbin B, Alizadeh R, Hosseinpour L, Ardi P, Ghazvini RD. First report of invasive pulmonary infection by *Didymella microchlamydospora* and successful treatment with voriconazole. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25: 392-393.

Sallenave-Namont C, Pouchus YF, Pont TR, Lassus P, Verbist JF. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycopathologia.* 2000; 149: 21-25.

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014; 78: 141-173.

Santos A, Hauser-Davis RA, Santos MJS, Simone SG. Potentially toxic filamentous fungi associated to the economically important *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) scallop farmed in southeastern Rio de Janeiro, Brazil. *Mar Pollut Bull.* 2017a; 115: 75-79.

Santos AL, Medeiros JVF, Gault CE, Santos MJS, Souza ALA, Carvalho RW. The fungus *Pestalotiopsis* sp., isolated from *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae) cultured on marine farms in Southeastern Brazil and destined for human consumption. *Mar Pollut Bull.* 2020; 153: 1-4.

Santos LS, Cândido WS, Rabelo HO, Marin MV, Gaion LA, Gomes RF, Camargo M, Braz LT. Reaction of melon genotypes to *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. *Chil. J. Agric. Res.* 2017b; 77(1): 71-77.

Santos GR, Ferreira MASV, Pessoa-Filho MACP, Ferreira ME, Café-Filho AC. Host Specificity and Genetic Diversity of *Didymella bryoniae* from Cucurbitaceae in Brazil. J Phytopathol. 2009; 157: 265-273.

SAP/MAPA. Boletim de resultados do acompanhamento dos contratos de cessão de uso da maricultura em águas da União. 2020. Boletim da Maricultura em Águas da União 2017 - 2018 - 2019.

Sarquis MIM, Oliveira PC. Diversity of microfungi in the sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil. J Basic Microbiol. 1996; 36(1): 51-58.

Shirakashi S, Waki T, Ogawa K. Bucephalid Metacercarial Infection in Wild Larval and Juvenile Ayu *Plecoglossus altivelis*. Fish Pathol. 2020; 54(4): 93-100.

Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM. Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications. WILEY-VCH; 2008. 361 pp.

Silva PM, Magalhães ARM, Barracco MA. Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* mussels from a culture station in Ratonas Grande Island, Brazil. J Invertebr Pathol. 2002; 79: 154-162.

Silva PM, Magalhães ARM, Barracco MA. Pathologies in commercial bivalve species from Santa Catarina State, southern Brazil. J Mar Biol Assoc UK. 2012; 92(3): 571-579.

Silveira NG, Souza RCCL, Fernandes FC, Silva EP. Occurrence of *Perna perna*, *Modiolus carvalhoi* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) and *Megabalanus occopoma* (Crustacea, Cirripedia) off Areia Branca, Rio Grande do Norte State, Brazil. Biociências. 2006; 14(1): 89-90.

Sodré FNGAS, Freitas RR, Rezende VLFM. Histórico e desenvolvimento da maricultura no estado do Espírito Santo, Brasil. Rev Bras Agroecol. 2008; 3(3): 36-46.

Souza TB, Silva BR, Pereira RM, Aride PHR, Oliveira AT, Souza AB, Lavander HD, Polese MF, Krohling W. Artificial Selection and Size at First Sexual Maturity of *Perna perna* Mussels (Linnaeus, 1758) in Southeastern Brazil. J Shellfish Res. 2019; 38(1): 63-69.

Stakowian N, Guilherme PDB, Ferreira AM, Bueno ML, Tavares YAG. Reproductive investment of *Perna perna* (Mytilida: Mytilidae) in subtropical regions: combining several methods. Panam J Aquat Sci. 2020; 15 (3): 178-194.

Streit B. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: Braunbeck T, Hinton DE, Streit B. Fish Ecotoxicology. Birkhäuser Verlag: Basel; 1998. 353-387.

Sumi Y, Hamasaki T, Miyakawa M. Tumors and other lesions induced in germ-free rats exposed to *Aspergillus versicolor* alone. Jpn J Cancer Res. 1987; 78: 480-486.

Tamura K, Masatoshi N, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Natl Acad Sci. 2004; 101 (30): 11030-11035.

Tapia J, Vargas-Chacoff L, Bertrán C, Carrasco G, Torres F, Pinto R, Urzúa S, Valderrama A, Letelier L. Estudo do conteúdo de cádmio, cromo e chumbo em moluscos bivalves do Oceano Pacífico (Maule Região, Chile). Food Chem. 2010; 121: 666-671.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994; 22(22): 4673-4680.

Tkach VV, Littlewood DTJ, Olson PD, Kinsella JM, Swiderski Z. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). Syst Parasitol. 2003; 56: 1-15.

Tongxin X, Fengrong W, Junling W, Zhendong Z. Sterigmatocystin induced adenocarcinoma of the lung and atypical hyperplasia of glandular stomach in mice. Chinese J Cancer Res. 1991; 3(1): 31-34.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2017. 939 pp.

Umiji S, Lunetta JE, Leonel RMV. Infestation of the mussel *Perna perna* by digenetic trematodes of the Bucephalidae family, gen. *Bucephalus*. An Acad Bras Ciênc. 1976; 47: 115-117.

USEPA (2007) Risk-based concentration Table.

Valladares V, Pasquini C, Thiengo SC, Fernandez MA, Mello-Silva CC. Field Application of NIR Spectroscopy for the Discrimination of the *Biomphalaria* Species that are Intermediate Hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. Front Public Health. 2021; 9.

Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong S-B, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Stud Mycol. 2014; 78: 343-371.

Wafa EW, Yahya RS, Sobh MA, Eraky I, El-Baz M, El-Gayar HAM, Betbeder AM, Creppy EE. Human ochratoxycosis and nephropathy in Egypt: A preliminary study. *Hum Exp Toxicol*. 1998; 17: 124-129.

Wang Z-X, Chen J-Q, Chai L-Y, Yang Z-H, Huang S-H, Zheng Y. Environmental impact and site-specific human health risks of chromium in the vicinity of a ferro-alloy manufactory, China. *J Hazard Mater*. 2011; 190: 980-985.

Watkinson SC, Boddy L, Money NP. *The Fungi*. 3^a ed. Amsterdam: Elsevier; 2015. 478 pp.

Wellbaum C, Schoenlein-Crusius IH, Malasso E, Tauk-Tornisielo SM. Fungos filamentosos isolados de folhas em decomposição na Represa de Guarapiranga, São Paulo, SP. *HOLOS Environment*. 2007; 7(2): 171-190.

White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press; 1990. 315-322.

WHO. *Ecosystems and human well-being: health synthesis*. World Health Organization; 2005.

WHO. Mercury and health. 2017 [acesso em 20 jul 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>.

Wijngaard RR, Perk M, Griff B, Nijs TCM, Bierkens MFP. The Impact of Climate Change on Metal Transport in a Lowland Catchment. *Water Air Soil Pollut*. 2017; 228(107): 1-20.

WoRMS. World Register of Marine Species. 2021 [acesso em 03 nov 2021]. Disponível em: <http://www.marinespecies.org>.

Xiã B, Li E, Du Z, Jiang R, Chen L, Yu N. Effects of temperature and salinity on metabolic rate of the Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *SpringerPlus*. 2014; 3: 1-9.

Yazdani D, Abidin MAZ, Tan YH, Kamaruzaman S. Molecular Identification of *Aspergillus* and *Eurotium* Species Isolated from Rice and Their Toxin-Producing Ability. *Microbiology*. 2011; 80(5): 720-727.

Yee-Duarte JA, Ceballos-Vázquez BP, Arellano-Martínez M, Camacho-Mondragón MA, Uría-Galicia E. Histopathological Alterations in the Gonad of *Megapitaria squalida* (Mollusca: Bivalvia) Inhabiting a Heavy Metals Polluted Environment. *J Aquat Anim Health*. 2018; 30: 144-154.

Zhou G, Whong, WZ, Ong T, Chen B. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol Cell Probes*. 2000; 14, 339-348.

Zouhair S, Laaziz A, Qjidaa S, Bouseta A. Growth and ochratoxin a production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* in relation to culture medium, water activity and temperature. *Glo Adv Res J Agric Sci*. 2017; 6(10): 314-322.

Zvereva LV, Vysotskaya MA. Filamentous fungi associated with bivalve mollusks from polluted biotopes of Ussuriiskii Bay, Sea of Japan. *Russ J Mar Biol*. 2005; 31(6): 382-385.

10 ANEXOS

10.1 Anexo A: Artigo publicado referente ao Capítulo III.

Biological Trace Element Research (2022) 200:402–412
https://doi.org/10.1007/s12011-021-02644-y



Elemental Contamination in Brown Mussels (*Perna perna*) Marketed in Southeastern Brazil

Amanda Gleyce Lima de Oliveira¹ · Rafael Christian Chávez Rocha² · Tatiana Dillenburg Saint'Pierre² · Rachel Ann Hauser-Davis¹ · Clélia Christina Mello-Silva¹ · Cláudia Portes Santos¹

Received: 29 December 2020 / Accepted: 16 February 2021 / Published online: 22 February 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

Perna perna mussels, abundant throughout the Brazilian coast, are routinely applied as bioindicators in environmental monitoring actions due to their sessile and filter-feeding characteristics. In addition, they are noteworthy for their food importance, especially for coastal populations. In this context, the aim of this study was to investigate elemental contamination in commercially marketed and highly consumed *P. perna* samples from the highly impacted Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. A total of 30 mussels were sampled, and elemental concentrations (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, V, and Zn) were determined in adductor muscle samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Human consumption risks were assessed by comparisons to Brazilian and international legislations. No significant differences between sex were observed for all analyzed elements. Even when analyzing only the adductor muscle, all mussel samples exceeded the Brazilian limit for Cr, while 12 samples exceeded the limit for Se. When compared to other regulatory agencies, As and Zn levels were higher than the limits set by China, New Zealand, and the USA. Estimated daily dietary intake values were not above limits imposed by the Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization for any of the assessed elements, although it is important to note that only the adductor muscle was assessed. Therefore, continuous metal and metalloid monitoring in bivalves in the study region is suggested, as metal transport and bioavailability, especially in coastal estuaries such as Guanabara Bay, which are currently undergoing significant changes due to anthropogenic activities.

Keywords Bivalves · Biomonitoring · Metals · Estuarine environment · Public health

✉ Rachel Ann Hauser-Davis
rachel.davis@ioc.fiocruz.br

Amanda Gleyce Lima de Oliveira
amanda.lima@ioc.fiocruz.br

Rafael Christian Chávez Rocha
rafaelcchrocha@hotmail.com

Tatiana Dillenburg Saint'Pierre
tatispierre@puc-rio.br

Clélia Christina Mello-Silva
clelia@ioc.fiocruz.br

Cláudia Portes Santos
cpsantos@ioc.fiocruz.br

¹ Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Av. Brasil, 4.365, Mangueinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil

² Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), Gávea, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Introduction

Metal and metalloid inputs to different environmental compartments may occur through natural processes, such as volcanism and weathering, or due to anthropogenic activities, i.e., domestic and industrial effluents [1]. These chemical compounds are among the main classes of environmental pollutants, as they are not biodegradable and, depending on their environmental levels, may exhibit high toxicity [2, 3]. Some metals are essential to living organisms, while non-essential elements display no metabolic function. Each organism has a specific tolerance level for both types of metals which, when above a certain threshold, may cause toxic and/or lethal effects [2, 3].

Certain metals display the ability to bioaccumulate in aquatic ecosystems. This can occur either directly, through environmental exposure, or indirectly, by the ingestion of contaminated food items [4]. A classic example of the latter occurred in the 1950s, with the accumulation of the most toxic form of mercury (Hg), methylmercury, in Minamata Bay,

10.2 Anexo B: Fungos filamentosos identificados em cada Perna perna coletado próximo a Praia de Jurujuba, Niterói, RJ.

Mexilhão	Pé	Brânquias	Glândula digestiva
1	-----	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Penicillium raistrickii</i>
2	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	-----
	<i>Aspergillus flavipes</i>		
3	-----	<i>Aspergillus versicolor</i>	-----
4	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	-----
	<i>Aspergillus sp.</i>		
5	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Mycelia sterilia</i>
		<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>
		-----	<i>Aureobasidium sp.</i>
6	-----	<i>Didymella sp.</i>	-----
7	-----	-----	<i>Cladosporium sp.</i>
8	<i>Aspergillus caespitosus</i>	<i>Aspergillus caespitosus</i>	<i>Aspergillus caespitosus</i>
9	<i>Aspergillus caespitosus</i>	-----	<i>Aspergillus caespitosus</i>
			<i>Didymella sp.</i>
10	-----	-----	-----
11	<i>Didymella sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>	-----
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus niger</i>	
12	<i>Didymella sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Mycelia sterilia</i>
			<i>Mycelia sterilia</i>
			<i>Aspergillus sp.</i>
			<i>Aspergillus japonicus</i>
13	-----	-----	<i>Didymella sp.</i>
14	-----	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Didymella sp.</i>
15	<i>Aspergillus awamori</i>	-----	<i>Didymella sp.</i>
16	<i>Didymella sp.</i>	-----	<i>Phaeoisaria sp.</i>
			<i>Mycelia sterilia</i>
17	<i>Didymella sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>
		<i>Aspergillus niger</i>	
18	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp.</i>
			<i>Aspergillus sp.</i>
19	<i>Aspergillus niger</i>	-----	<i>Aspergillus sp.</i>
	<i>Didymella sp.</i>		
20	<i>Didymella sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>	<i>Mycelia sterilia</i>
			<i>Aspergillus sp.</i>
21	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	-----
22	<i>Didymella sp.</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Didymella sp.</i>
		<i>Didymella sp.</i>	
23	<i>Penicillium raistrickii</i>	<i>Penicillium sp.</i>	-----
	<i>Aspergillus awamori</i>		
24	-----	<i>Penicillium sp.</i>	-----
25	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>
			<i>Didymella sp.</i>
26	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>	-----
	<i>Aspergillus niger</i>		
27	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Didymella sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>
	<i>Didymella sp.</i>		
28	<i>Didymella sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>	-----
29	<i>Didymella sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>	-----
30	<i>Didymella sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>	-----
31	<i>Penicillium sp.</i>	-----	-----
Total de colônias		30	27