

**DIEGO JOSÉ NOGUEIRA**

**Efeitos do fenantreno e alquilbenzenos lineares no desenvolvimento larval e na transcrição de genes em ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Coorientador: Dr. Fabricio Flores Nunes

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nogueira, Diego José

Efeitos do fenantreno e alquilbenzenos lineares no desenvolvimento larval e genes em ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789) / Diego José Nogueira ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy ; coorientador, Fabricio Flores Nunes. - Florianópolis, SC, 2015.  
115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Fenantreno . 3. Alquilbenzenos lineares. 4. *Crassostrea gigas*. 5. Embriotoxicidade. I. Bainy, Afonso Celso Dias. II. Nunes, Fabricio Flores. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Efeitos do fenantreno e alquilbenzenos lineares no desenvolvimento larval e genes em ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789)**

Por

DIEGO JOSÉ NOGUEIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

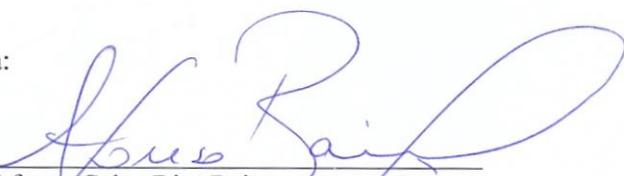
e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.



---

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



---

Dr. Afonso Celso Dias Bainy – *Orientador*

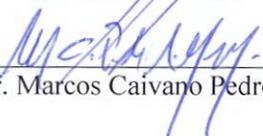


---

Dra. Karim Hahn Lichmann

---

Dra. Maria Risoleta Freire Marques



---

Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque



Este trabalho é dedicado à minha  
esposa e aos meus pais.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu DEUS pelas bênçãos recebidas, por todos os momentos felizes e porque não os tristes? Muitas coisas aprendi com eles, muitos valores guardei e muitas vitórias conquistei.

A minha esposa Eliane, quero agradecer por tudo, em especial por estar a meu lado, sempre, se doando inteira e renunciando seus sonhos para que o meu sonho fosse realizado.

Aos meus pais Antônio e Valéria mesmo de longe me apoiaram nessa jornada árdua e difícil, o desânimo tentou se apossar por vezes, entretanto, ao lembrar que vocês se sacrificaram, se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional, sinto orgulho de onde cheguei, é porque sei que vocês vieram segurando a minha mão.

Ao meu orientador Dr. Afonso Celso Dias Bainy, por ter confiado em mim e me aceito como aluno de mestrado, sua confiança e orientação foi capaz de me fazer trilhar um caminho profissional que julgava impossível em tão pouco tempo, meus sinceros agradecimentos.

Ao Fabrício Flores Nunes (meu coorientador) e Jacó Mattos, que acreditaram e incentivaram esse desafio desde o início, além de terem sido tão presentes em toda a construção desse trabalho, suas orientações detalhadas foram fundamentais para o sucesso, sem vocês isso não seria possível. Muito obrigado.

Ao apoio fundamental de todos do LABCAI, em especial, Daína e Rômi que me ajudaram na hora que mais precisei, nunca esquecerei que fizeram na reta final desse trabalho, obrigado meninas!

Obrigado por àquelas pessoas que sempre estiveram ao meu lado, nos bons e maus momentos, Cecília e Mirian, nunca esquecerei a força que me deram para seguir em frente!

Agradeço ao Guilherme Toledo pelo seu carisma, amizade e por todo o auxílio e disposição nas análises de bioinformática, Rafael Trevisan que me ajudou muito através de suas opiniões e conselhos, Flávia pela ajuda no desenho dos iniciadores, meu muito obrigado.

A todos do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, que tem como responsável o professor Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, quero agradecer por me receberem de braços abertos e não medirem esforços para a realização desse trabalho e ao Patrick e o Chico por terem sido fundamentais nos experimentos *in situ* e claro, passando seu conhecimento para que tudo desse certo.

Ao LAMAR e principalmente aos Profs. Zenilda Laurita Bouzon e Éder Carlos Schimdt, pela parceria e por todo o suporte, estrutura e apoio para realização das análises de microscopia.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, cooperaram para que este trabalho consiga alcançar os objetivos propostos.

Agradeço aos funcionários do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pela ajuda nas análises das amostras de microscopia de varredura. A CAPES pela bolsa de pesquisa.

**Muito obrigado!**

Ouçã conselhos e aceite instruções, e  
acabará sendo sábio (Provérbios 19:20).



## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade de fenantreno (FEN) e dos alquilbenzenos lineares (ABLs) durante o desenvolvimento larval da ostra *Crassostrea gigas* e verificar a influência do FEN e ABLs sobre respostas moleculares. Os gametas foram recolhidos a partir de ostras adultas, separados por telas, fertilizados e mantidos nas unidades experimentais durante 24 h. Com base em ensaios preliminares (Capítulo 1), foram definidas concentrações para o teste de toxicidade FEN (0,37; 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e ABLs (3,5; 5,3; 8,0; 12,0 e 18,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). E no (Capítulo 2) A escolha das concentrações baseou-se na  $\text{EC}_{50}$  encontrada nos testes de toxicidade (Capítulo 1). A avaliação do desenvolvimento larval foi expresso como porcentagens líquidas do desenvolvimento normal (NPNe) de larvas em forma de D, as alturas da concha foi utilizado como um indicador de crescimento e a concentração efetiva ( $\text{CE}_{50}$ ) foi calculada utilizando o método Spearman Karber. Avaliação química da concha das larvas foi feita através da análise de espectrometria de energia dispersiva (EDS) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Através da técnica *PCR* quantitativo em tempo real (*qPCR*) foi analisada a transcrição de genes-alvo. A  $\text{CE}_{50}$  para FEN foi de 1,91  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e de 8,94  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para ABLs. Após 24 horas de exposição, os contaminantes afetaram o desenvolvimento morfológico. O NPNe mostrou uma diferença significativa para FEN e ABLs com relação ao controle, o crescimento larval foi levemente afetado, a análise química das conchas revelaram alteração e houve desregulação na transcrição gênica. Este é o primeiro estudo que demonstra a suscetibilidade de larvas de moluscos marinhos quando expostos aos contaminantes ambientais FEN e ABLs, causando um aumento nas deformidades nas larvas, reduzindo seu crescimento e alterando a transcrições de genes importantes no desenvolvimento, mesmo em concentrações muito baixas.

**Palavras-chave:** Aquicultura, Fenantreno; Alquilbenzenos lineares; *Crassostrea gigas*; Embriotoxicidade.



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the toxicity of phenanthrene (PHE) and linear alkyl benzenes (LAB) during the embryo-larval development of *C. gigas* oyster and the influence of the FEN and LAB on molecular responses. The gametes were collected from adult oysters, separated by screens, fertilized and kept in the experimental units for 24 h. Based on preliminary tests (Chapter 1), concentrations were defined for the FEN toxicity test (0,37; 0,75; 1,5; 3,0 and 6,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and LAB (3,5; 5,3; 8,0; 12,0 and 18,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). In (Chapter 2) the choice of concentrations based on  $\text{EC}_{50}$  found in toxicity tests (Chapter 1). The embryo-larval development of evaluation were expressed as net percentages of normal development (NPNe) larvae D-shaped shell heights of was used as an indicator of growth and effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) was calculated using the Spearman Karber-method. Chemical evaluation of the shell of the larvae was performed through the analysis of energy dispersive spectrometry (EDS) coupled to a scanning electron microscope (SEM). Through technical real-time polymerase chain reaction (qPCR) was analyzed transcription of target genes. The  $\text{EC}_{50}$  was 1.91  $\mu\text{g.L}^{-1}$  FEN and 8.94 to 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  LAB. After 24 hours of exposure, the contaminants affect the morphological development. The NPNe showed a significant difference to FEN and LAB with the control, the larval growth was slightly affected, the chemical analysis of the shells revealed change and there was deregulation in gene transcription. This is the first study to show the susceptibility of marine mollusc embryos when exposed to environmental contaminants FEN and LAB, causing an increase in deformities larvae, reducing its growth, and changing the major gene transcripts in development, even in very low concentrations.

**Keywords:** Aquaculture, Phenanthrene; Linear alkylbenzenes; *Crassostrea gigas*; Embriotoxicity.



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1** - Ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Arquivo pessoal). ..... 28

Figura 2 – Ciclo de vida da ostra *C. gigas*, adaptado de Tirapé et al. (2007). ..... 30

### CAPITULO I

**Figura 1** – Esquema representativo das fases de desenvolvimento da ostra *Crassostrea gigas*, indicando a fase de exposição (quadrado contínuo) e a fase de amostragem (quadrado pontilhado). ..... 43

**Figura 2** – Gráfico da curva concentração-resposta para fenantreno (FEN) (A) e alquilbenzenos lineares (ABLs) (B) referente ao teste embriotóxico e definição dos valores de  $CE_{50}$ . ..... 45

**Figura 3** - Gráfico da porcentagem líquida de desenvolvimento normal (NPNe) para fenantreno (FEN) (A) e alquilbenzenos lineares (ABLs) (B) referente ao teste embriotóxico. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (Kruskall-Wallis,  $p < 0,05$ ; teste de Newman Keuls). ..... 46

**Figura 4** - Imagens de microscopia óptica, mostrando diferentes alterações observadas em larvas-D referente ao teste embriotóxico: (A) normal, (B) alteração na concha e/ou alteração na articulação da concha, (C) alteração de hipertrofia de manto, (D) alteração na concha e manto, (E) estágio de desenvolvimento paralisado, ocorrendo atraso. ..... 47

**Figura 5** – Gráfico das frequências de diferentes tipos de alterações para fenantreno (FEN) e alquilbenzenos lineares (ABLs) referente ao teste embriotóxico. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey). ..... 49

**Figura 6** - Gráfico do efeito do fenantreno (FEN) e alquilbenzenos lineares (ABLs) sobre o crescimento larval. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey). ..... 49

## CAPITULO II

- Figura 1** – Esquema representativo das fases de desenvolvimento da ostra *Crassostrea gigas*, indicando a fase de exposição (quadrado contínuo) e a fase de amostragem (quadrado pontilhado)..... 65
- Figura 2** - Extração de compostos orgânicos em água. ....66
- Figura 3** - Porcentagens líquidas de desenvolvimento normal (NPNe) em *C. gigas* embrião-larvas observado após 24h de exposição ao FEN e ABLs. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (Kruskall-Wallis,  $p < 0,05$ ; teste de Newman Keuls).....72
- Figura 4** – Efeitos do FEN e ABLs sobre a altura de concha em *C. gigas*. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey). ....72
- Figura 5** - Frequências de diferentes tipos de alterações após exposição de 24h a FEN e ABLs. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey). ....74
- Figura 6** - Imagens de microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostrando as alterações morfológicas em larvas de *C. gigas* após 24hs de exposição: (A) – larva-D normal, (B) – larva-D exibindo alteração na concha e/ou alteração na articulação da concha, (C) – larva-D exibindo alteração de hipertrofia de manto, (D) - exibindo alteração na concha e manto, (E) – estágio de desenvolvimento paralisado, ocorrendo atraso. ....76
- Figura 7** - Transcrição de genes em larvas de *C. gigas* expostas a FEN. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey). ....79
- Figura 8** - Transcrição de genes em larvas de *C. gigas* expostas aos ABLs. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey). ....80

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO II

- Tabela 1** - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação de cada gene. (S: senso; A: antisenso). ..... 70
- Tabela 2** - Concentração nominal e real ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) de o FEN e ABLs nas águas de exposição dos testes de toxicidade no desenvolvimento embriotóxico de *C.gigas*..... 71
- Tabela 3** - Percentual de Ca em conchas de *C. gigas*, obtido por espectros EDS. .... 77



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### CAPITULO I

ABLs: Alquilbenzeno lineares  
ASL: alquilbenzeno sulfonato linear  
CE50: Concentração efetiva  
CEE: Comunidade Econômica Europeia  
CT: Controle  
DMSO: dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo  
EC<sub>50</sub>: effective concentration (Português: concentração efetiva)  
FEN: Fenantreno  
HPA - hidrocarboneto policíclico aromático  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
L: litro  
LAB: linear alkylbenzene  
mL: mililitro  
ng.L<sup>-1</sup>: nanograma por litro  
NPNe: porcentagem líquida do desenvolvimento normal  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
*p*: significância estatística  
pH: potencial hidrogeniônico ou potencial de hidrogênio  
PHE: Phenanthrene  
ppm: partes por milhão  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
%: porcentagem  
<: menor que  
±: mais ou menos  
°C: graus Celsius  
µg.L<sup>-1</sup>: micrograma por litro  
µm: micrômetro

### CAPITULO II

ABL: Alquilbenzeno linear  
ASL: alquilbenzeno sulfonato linear  
cDNA: sequência nucleotídica complementar de DNA  
cm: centímetros  
CE50: Concentração efetiva  
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono  
CYPs: citocromos P450  
DMSO: dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo  
EC<sub>50</sub>: effective concentration (Português: concentração efetiva)  
EDS: Espectrometria de energia dispersiva

F: Forward  
FEN: Fenantreno  
G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase  
*GeneBank* - Banco de genes público que possui os dados produzidos pelo NCBI  
GR: glutationa redutase  
HPA: hidrocarbonetos policíclico aromático  
HPAs: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos  
HSP70: heat shock proteins (português: proteínas de choque térmico)  
IDT: acrônimo do inglês *integrated DNA Technologies*  
L: litro  
LMM: Laboratório de Moluscos Marinhos  
LCME: Laboratório Central de Microscopia Eletrônica  
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura  
mL: mililitro  
mm: milímetro  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato de sódio  
ng.L<sup>-1</sup>: nanograma por litro  
nm: nanômetro  
NPN: porcentagem líquida do desenvolvimento normal  
*p*: significância estatística  
PCR: reação em cadeia da polimerase; do inglês *polymerase chain reaction*  
pH: potencial hidrogeniônico ou potencial de hidrogênio  
ppm: partes por milhão  
psu: unidades práticas de salinidade  
R: Reverse  
RNA: ácido ribonucléico  
RNAm: ácido Ribonucleico mensageiro  
s: segundo  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SOD: superóxido dismutase  
Tris-HCl: tris (hidroximetil) aminometano-hidrocloreto  
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina  
\$: cifrão  
%: porcentagem  
<: menor que  
±: mais ou menos  
~: aproximado  
°C: graus Celsius  
µg.L<sup>-1</sup>: micrograma por litro  
µm: micrometro

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	23
1.1	Zonas costeiras e esgoto sanitário .....	23
1.2	Contaminantes orgânicos no ambiente.....	24
1.2.1	Fenantreno e Alquilbenzenos Lineares (ABLs).....	24
1.3	Moluscos bivalves como bioindicadores.....	27
1.4	Fases iniciais de vida.....	29
1.5	Testes de toxicidade: Embriotoxicidade .....	31
1.6	Biomarcadores .....	31
1.7	Biomarcadores moleculares .....	31
2	OBJETIVOS .....	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos .....	33
3	JUSTIFICATIVA.....	35
4	CAPÍTULO I <u>E</u> FEITOS EMBRIOTÓXICOS DE FENANTRENO E ALQUILBENZENOS LINEARES EM OSTRA DO PACÍFICO <i>Crassostrea gigas</i> .....	37
5	INTRODUÇÃO .....	39
6	MATERIAIS E MÉTODOS .....	41
6.1	Obtenção dos animais .....	41
6.2	Delineamento experimental .....	42
6.3	Análise estatística dos dados.....	44
7	RESULTADOS.....	45
7.1	Características físicas e químicas da água de exposição .....	45
7.2	Embriotoxicidade .....	45
8	DISCUSSÃO.....	50
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
11	CAPITULO 2 <u>R</u> ESPOSTAS MOLECULARES NO DESENVOLVIMENTO LARVAL DA OSTRA DO PACÍFICO <i>Crassostrea gigas</i> EXPOSTA A FENANTRENO E ALQUILBENZENOS LINEARES.....	59
12	INTRODUÇÃO .....	61
13	MATERIAL E MÉTODOS .....	63
13.1	Obtenção dos animais .....	63
13.2	Delineamento experimental .....	64
13.3	Análise de compostos orgânicos em água.....	66
13.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	67
13.5	Espectrometria de energia dispersiva (EDS).....	68

13.6	Preparação das amostras para análises moleculares .....	68
13.6.1	Extração do RNA total e síntese do cDNA.....	68
13.6.2	Técnica PCR quantitativo em tempo real (qPCR) .....	68
13.7	Análise estatística .....	70
14	RESULTADOS.....	71
14.1	Análise dos contaminantes na água .....	71
14.2	Efeitos do FEN e ABLs sobre o desenvolvimento larval .....	71
14.3	Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) .....	77
14.4	Efeitos do FEN e ABLs sobre a transcrição gênica .....	77
14.5	Efeitos do FEN na transcrição gênica .....	78
14.6	Efeitos dos ABLs na transcrição gênica .....	79
15	DISCUSSÃO .....	80
15.1	Análise morfológica.....	81
15.2	Análise EDS.....	82
15.3	Análise de transcrição gênica .....	83
16	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
17	CONCLUSÕES GERAIS .....	87
18	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
19	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (INT. GERAL) .....	101
20	ANEXOS .....	114

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Zonas costeiras e esgoto sanitário

A zona costeira possui uma grande importância mundial, visto que aproximadamente 60% da população do planeta se concentram a menos de 100 km da costa (VITOUSEK et al., 1997). A geomorfologia litorânea é especialmente particular, pois apresenta ecossistemas singulares (estuários, praias, manguezais, restingas, etc.) que possibilitam a execução de atividades econômicas de grande importância (MORAES, 2007). Estas mesmas atividades têm gerado impacto negativo considerável nestas regiões. As atividades industriais são responsáveis pela contaminação significativa da água, liberando compostos sintéticos potencialmente poluidores, contribuindo assim, para o acúmulo de uma infinidade de produtos químicos em diferentes compartimentos do ecossistema (FREIRE et al., 2008).

A introdução desses compostos de origem antrópica em zonas costeiras ocorre por diversas vias, tais como esgoto, embarcações, rios, deposição atmosférica, agricultura e atividades de aquicultura intensivas, atividades portuárias ou de marinas, extração de petróleo e derramamentos acidentais de vários produtos químicos (GOLDBURG; ELLIOTT; NAYLOR, 2001; KENNISH, 1991; PRÓSPERI; NASCIMENTO, 2006).

A poluição marinha e costeira vem sendo amplamente estudada em diversas partes do mundo, por se tratar de um problema ambiental, econômico e de saúde pública. A capacidade de tratamento de resíduos é muito limitada. Grande parte da África Subsaariana tem uma baixa cobertura de redes de esgotos, chegando a menos de 10% da população urbana (VIKAS; DWARAKISH, 2015). Em outros países como a Indonésia, grandes cidades como Jacarta e Manila têm níveis de cobertura de esgotos mais baixos (8-10%) do que cidades da África Ocidental como Dacar e Abidjan, promovendo efeitos adversos sobre a vida marinha em todos os níveis de vida oceânica (VIKAS; DWARAKISH, 2015).

Embora seja difícil imaginar o esgoto sanitário sem tratamento sendo despejado em zonas costeiras, isso ocorre principalmente em países subdesenvolvidos. A Organização Mundial de Saúde estima que na América Latina e Caribe são lançados diariamente cerca de 86% da água distribuída nas regiões urbanas sem qualquer tipo de tratamento prévio (CEPIS, 1997; SAMUEL, 2004).

De acordo com os dados do Ministério das Cidades (Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento – SNIS), em 2013 48,6 % da população, isto é, mais de 100 milhões brasileiros não tem acesso a coleta de esgoto. Mais de 3,5 milhões de brasileiros, nas 100 maiores cidades do país, despejam esgoto irregularmente, mesmo tendo redes coletoras disponíveis e apenas 39 % do esgoto é tratado no Brasil.

Este cenário repete em intensidades semelhantes de prejuízos socioambientais em países do continente africano e asiático. Sendo o Brasil um país que possui cerca de oito mil quilômetros de costa (ICMBio, 2012) e com cerca de 22% da população brasileira vivendo em municípios litorâneos (MORAES, 2007), a questão da poluição na zona costeira é de extrema relevância.

Infelizmente, no Brasil, poucos centros urbanizados têm instalações adequadas para a captação, tratamento e disposição final de esgotos. A maioria das cidades brasileiras não realiza qualquer tratamento prévio, tendo à sua disposição final o meio aquático (ABESSA et al., 2005; IBGE, 2008).

Um estudo divulgado esta semana pelo Instituto Trata Brasil indica que apenas 14% da população possui rede de tratamento de esgoto, cerca de 911 mil pessoas. Quando a estatística se refere à área de cobertura da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (Casan), este índice chega a pouco mais de 18%, ainda bem abaixo da cobertura nacional: 45% (TRATA BRASIL, 2014)

## 1.2 Contaminantes orgânicos no ambiente

### 1.2.1 Fenantreno e Alquilbenzenos Lineares (ABLs)

O esgoto sanitário contém uma complexa mistura de componentes orgânicos e inorgânicos (CRAIG, 2012). Alguns dos contaminantes presentes nessa mistura são de origem petrolífera, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (ex. fenantreno - FEN) e surfactantes e derivados de detergentes como os alquilbenzenos lineares (ABL) (SCANES, 1996; GIBSON et al., 2005; PENG et al., 2005).

Especificamente, os HPAs são compostos orgânicos, lipofílicos, que apresentam dois ou mais anéis carbônicos fundidos e podem ser formados por meio de fontes biogênicas diversas (incêndios florestais, afloramentos de petróleo, erupções vulcânicas e sínteses biológicas). Entretanto, é de fontes antrópicas que ocorrem as formas mais significativas de contaminação ambiental (LINS, 2010).

Segundo Neff (1979), os HPAs antropogênicos têm como fontes principais as atividades de incineração de resíduos, queimadas de campos e florestas, geração de energia via queima de combustíveis fósseis e emissão de motores de veículos movidos a combustíveis fósseis (PUC – RIO, 2011).

A legislação existente sobre HPAs está vigente principalmente nos Estados Unidos e na União Européia. Na legislação brasileira, o órgão que trata da contaminação por HPA é o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) através de suas resoluções 357, 410 e 430.

Apesar de já identificadas várias vias de contaminação ambiental por HPAs, o escoamento da água contaminada, a deposição atmosférica e os derrames de petróleo são as maiores fontes de contaminação aquática por fenantreno (LIMA et al., 2003; INCARDONA et al., 2005). De acordo com Lima et al. (2003) a entrada de fenantreno no ambiente manteve-se constante de 1980 até 1990, quando um aumento abrupto e substancial das concentrações foi observado, em consequência, principalmente, do aumento das atividades poluidoras nos Estados Unidos.

Devido a seus efeitos carcinogênicos, o fenantreno está presente na lista dos 16 HPAs rigorosamente controlados pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Comunidade Econômica Européia (CEE) (CAVRET; FEIDT, 2005). Apesar da presença do fenantreno nos ambientes aquáticos, existe pouca informação disponível da toxicidade sobre organismos aquáticos.

Alguns estudos demonstram que as concentrações de fenantreno em áreas poluídas podem variar de  $14,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  (VRANA et al., 2001) a  $1460 \mu\text{g.L}^{-1}$  em áreas de exploração de petróleo (ANYAKORA et al., 2005), onde níveis consideráveis também podem ser detectados em organismos aquáticos. Em áreas costeiras urbanizadas em diversas partes do mundo, as concentrações de fenantreno na água observadas estavam entre  $0,28 \text{ ng.L}^{-1}$  e  $78 \text{ ng.L}^{-1}$  (TELLI-KARAKOÇ et al., 2002; DELGADO et al., 2004; BIHARI; FAFANDEL; PIŠKUR, 2007; VALAVANIDIS et al., 2008; WU et al., 2011).

Diversos efeitos tóxicos são atribuídos aos HPAs, como alterações na morfologia de órgãos internos (INCARDONA et al., 2004) mudanças no metabolismo (VIEIRA et al., 2008) e comportamento (GREGG et al., 1997). Devido a sua persistência ambiental e toxicidade, o fenantreno está entre o grupo de HPAs que causam maiores danos aos seres aquáticos (HANNAM et al., 2010).

Estudos para avaliação da toxicidade dos HPAs em organismos aquáticos começou com Zechmeister e Koe (1952), que avaliaram esses compostos em cracas (*Tetraclita rubescens*). Décadas se passaram e estudos indicaram os efeitos deletérios de HPAs em uma variedade de organismos aquáticos (EISLER, 1987; NISBET; LAGOY, 1992; MEADOR et al., 1995; ARFSTEN; SCHAEFFER; MULVENY, 1996; BISPO; JOURDAIN; JAUZEIN, 1999; TUVIKENE, 1999; JONER et al., 2001; VIVES et al., 2005; MASULLO et al., 2006; BLEEKER; VERBRUGGEN, 2010; VERBRUGGEN, 2008).

Recentemente, a maioria desses estudos têm trabalhado com compostos individuais como o fenantreno em concentrações relativamente elevadas para avaliar o impacto de HPAs de derrames de petróleo ou a partir da queima de combustíveis fósseis (MOORE et al., 1984; LOTUFO; FLEEGER, 1997; MCCONKEY et al., 1997; JEE; KIM; KANG, 2004; TREMBLAY et al., 2005; LÜCHMANN et al., 2014; DOS REIS et al., 2015).

Detergentes comerciais são consideravelmente resistentes à degradação e o acúmulo destes nos recursos hídricos pode aumentar sua toxicidade, acarretando na diminuição do oxigênio dissolvido, diminuição da permeabilidade da luz, e estar associado ao aumento da concentração de outros xenobióticos, como HPAs presentes no sedimento, dificultando sua degradação (HAIGH, 1996; WARNE; SCHIFKO, 1999).

Muitas vezes considerados como indicadores de atividades antrópicas, os alquilbenzenos lineares (ABL) têm sido utilizados como marcadores moleculares de descarga de esgotos (EGANHOUSE et al., 2000; MARTINS et al., 2010). Diversos autores exploraram efeitos tóxicos desse composto e sua concentração em diversos tipos de águas e efluentes (MUNGRAY; KUMAR, 2009).

No Brasil a produção de detergentes sintéticos tem crescido expressivamente atingindo níveis de cerca de 220 mil t/ano de ABL e 80 mil t/ano de alquilbenzeno lineares sulfonados (ASL), sendo a Deten Química S.A, a maior fabricante de ABL no país. Essa produção representa cerca de 10% da produção mundial e coloca o Brasil entre os principais produtores e consumidores mundiais (PENTEADO et al., 2006).

Os ABLs possuem uma cadeia de 10 a 14 átomos de carbono, são um grupo de matérias-primas para a fabricação de ASL, que por sua vez são utilizados como agentes tensoativos aniônicos para a produção de detergentes comerciais (EGANHOUSE et al., 1983; DE ALMEIDA et al., 1994; TAKADA et al., 1992).

Devido à sulfonação incompleta, o ASL contém entre 1 a 3% de ABLs, podendo entrar no ambiente aquático através da descarga de esgoto sanitário (TAKADA; EGANHOUSE, 1998; HARTMANN et al., 2000; EGANHOUSE; SHERBLOM, 2001, HEIM et al., 2004; ISOBE et al., 2004; PENTEADO, 2006). Este fato já foi comprovado e têm sido detectados em várias matrizes ambientais a partir de diferentes regiões do mundo (EGANHOUSE et al., 1983; TAKADA; ISHIWATARI, 1987; TAKADA et al., 1992; ISOBE et al., 2004; MEDEIROS; BÍCEGO, 2004, MARTINS et al., 2010; MARTINS et al., 2012, VENKATESAN et al., 2010; KOIKE et al., 2012).

Poucos estudos avaliaram a influência dos ABLs sobre organismos aquáticos. Tsutsumi et al. (2002) encontraram 14 vezes mais ABLs em mexilhões coletados perto de áreas urbanizadas, em comparação com áreas remotas. Ostra *Crassostrea gigas* mantidas em uma área contaminada com efluentes urbanos acumularam cerca de 10 vezes mais ABLs do que ostras mantidas em áreas de aquicultura (SOUZA et al., 2012). Flores-Nunes et al. (2015) observou em um primeiro estudo de exposição de moluscos marinhos aos ABLs, a influência desse contaminante sobre respostas bioquímicas (GR e G6PDH) e moleculares (*HSP70-like*, *SOD-like* e *G6PDH-like*) em ostras *Crassostrea gigas*.

### 1.3 Moluscos bivalves como bioindicadores

Moluscos bivalves são amplamente usados como bioindicadores, a fim de detectar os efeitos biológicos causados por contaminantes encontrados no ambiente (RICHARDSON et al., 2008). Por serem, em geral, organismos sésseis, filtradores, bem distribuídos, de grande importância econômica (BAINY et al., 2000; CAJARAVILLE et al., 2000), este grupo se destaca por possuir a capacidade de bioacumular contaminantes do ambiente e de responder rapidamente à presença deles (BEBIANNO; BARREIRA, 2009; SOLÉ et al., 2007).

Dentre os moluscos bivalves utilizados nestes estudos, destaca-se a espécie *Crassostrea gigas*, conhecida como ostra do Pacífico ou ostra japonesa, e que foi introduzida no Brasil na década de 70 (MELO et al., 2009). Desde então, vários estudos têm sido realizados fortalecendo a produção aquícola desta espécie no país (FERREIRA et al., 2006). Essa espécie possui grande potencial para aquicultura, sendo uma espécie cultivada em muitas regiões do mundo. É uma espécie estuarina que tolera salinidades desde 10 a mais de 35, com intervalo ótimo de crescimento e sobrevivência entre 20 e 25 e temperaturas de -1,8 a 35°

(FAO, 2012). No Brasil, representa 12% da produção de moluscos bivalves, onde são cultivadas também outros bivalves como o mexilhão *Perna perna*, as ostras nativas *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gasar* e a vieira *Nodipecten nodosus* (MPA, 2010).

Santa Catarina atualmente é o maior produtor brasileiro de moluscos cultivados, sendo responsável por cerca de 95% da produção nacional de moluscos para comércio (EPAGRI, 2013). As baías da Grande Florianópolis respondem pela produção de mais de 70% dos moluscos, sendo 96% referentes à espécie *C. gigas* (EPAGRI, 2013).

Estudos de avaliação da contaminação ambiental têm utilizado a *C. gigas* como organismo bioindicador de exposição a contaminantes antropogênicos (MEDEIROS et al., 2008; ZANETTE et al., 2008; SOUZA et al., 2012; SERRANO et al., 2015; FLORES-NUNES et al., 2014; FLORES-NUNES et al., 2015). A espécie recentemente teve seu genoma sequenciado por ZHAN et al. (2012), auxiliando no desenvolvimento de novas pesquisas e enfatizando ainda mais o uso deste molusco como uma espécie sentinela em programas de biomonitoramento (SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006).

As ostras pertencem à ordem Ostreoida, família Ostreidae como consta na classificação biológica abaixo.

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Classe: Bivalvia

Ordem: Ostreoida

Família: Ostreidae

Gênero: *Crassostrea*

Espécie: *Crassostrea gigas*



**Figura 1** - Ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Arquivo pessoal).

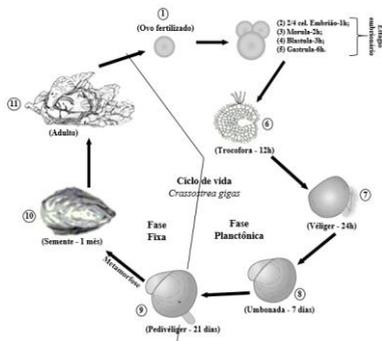
#### 1.4 Fases iniciais de vida

A ostra *Crassostrea gigas* é ovípara e hermafrodita sequencial, sem dimorfismo sexual, apresentam um alto nível de fecundidade (DESOLOUS-PAOLI e HERAL, 1988) seguido de desenvolvimento larval planctônico (ANDREWS, 1979). A gametogênese depende diretamente da temperatura de pelo menos 18 - 25 °C para a desova, dependendo da localização (KOBAYASHI et al., 1997).

Nas costas do Atlântico dos países europeus, a desova ocorre no verão em temperaturas acima de 18 °C a 21-22 °C e a salinidade pode variar entre 25 e 35. Nas lagoas na costa do Mediterrâneo, *C. gigas* deixa de reproduzir quando a temperatura no verão chega a 24 - 25 °C e salinidade atinge 37-38 (HERAL e DESOLOUS-PAOLI, 1991). A fecundidade é elevada; uma fêmea produz 20 - 100 milhões de ovócitos por desova (diâmetro de 50 - 60 µm).

Depois que se dá a fecundação, ocorre o desenvolvimento embrionário. As células vão se dividindo e depois de 12 a 18 hs, há a formação de uma larva livre-natante, denominada trocófora. Passadas 24hs da fecundação a larva assume o formato de “D”, chamando-se larva D ou véliger (FAO, 2012). Essa larva já possui a capacidade de se alimentar, com o auxílio do véluo, que também serve para natação. Quando completam 14 a 18 dias, as larvas começam a deixar de ser planctônicas e sofrem modificações morfológicas, como o aparecimento de uma mancha ocular e do pé.

Agora denominam-se pedivéliger e começam a procurar um substrato ideal para se fixarem (Figura). Assim que se fixam, sofrem uma metamorfose, assumindo a forma definitiva de uma ostra, tendo, porém, um pequeno tamanho. Neste substrato elas crescem até atingirem o tamanho comercial. (FAO, 2012).



**Figura 2** – Ciclo de vida da ostra *C. gigas*, adaptado de Tirapé et al. (2007).

### 1.5 Testes de toxicidade: Embriotoxicidade

Vários estudos têm relatado que os estágios iniciais de vida dos peixes e invertebrados são mais sensíveis a substâncias tóxicas do que organismos nos estágios adultos (HERKOVITS et al., 1997; HUTCHINSON et al., 1998; MOHAMMED et al., 2009). Hutchinson et al. (1998) usando dados do Centro Europeu de Ecotoxicologia e Toxicologia de Químicos (ECETOC), analisaram os dados de  $CE_{50}$  (concentração do composto para qual 50% do efeito é observado) a partir de estudos de ciclo de vida total e parcial e relataram que a sensibilidade de larvas de invertebrados aquáticos eram maiores ou igual a 66% comparado aos juvenis das substâncias testadas, enquanto que a sensibilidade dos juvenis foi maior ou igual à adultos para 54% das substâncias testadas.

Os mesmos autores também relataram que embriões de peixes são mais sensíveis do que as larvas expostas a 68% das substâncias testadas, enquanto a sensibilidade das larvas de peixes foi maior ou igual à dos juvenis expostos a 83% das substâncias testadas. Com base em dados de  $CE_{50}$  de peixe, juvenis foram mais sensíveis do que os adultos expostos a 92% das substâncias (HUTCHINSON et al., 1998).

Todas as etapas do ciclo de vida (gametas, embriões, larvas e adultos) têm sido usadas para o monitoramento em ambientes aquáticos (toxicidade aguda ou crônica).

Testes de toxicidade em moluscos bivalves são geralmente fáceis de executar, altamente sensíveis (HIS et al., 1997), podendo apresentar

resultados significativos em curto tempo (24h), ou ainda menor quando alguns parâmetros são levados em consideração (LIBRALATO, 2008). Entretanto, em escalas de sensibilidade relativa, as fases da vida específicas podem variar dependendo da espécie.

O teste embriotóxico usando *C. gigas* como bioindicador é reconhecido como um dos mais sensíveis de todos os organismos (HIS et al., 1997; POIRIER et al., 2007; MOTTIER et al., 2013).

## 1.6 Biomarcadores

O monitoramento da qualidade ambiental, de um modo geral, tem como um de seus objetivos a prevenção dos danos causados por contaminantes oriundos de diferentes fontes presentes no ambiente, fazendo com que os níveis desta exposição sejam mantidos em valores que não apresentem um risco (CAJARAVILLE et al., 2000).

No ambiente aquático, para ser possível o monitoramento, torna-se necessária a identificação e quantificação de diferentes parâmetros, através do uso de tecnologias específicas, no sentido de avaliar a presença de contaminantes no ambiente aquático. Um dos exemplos é o uso de biomarcadores que avaliam diferentes níveis de alterações (moleculares, celulares e/ou fisiológicas) expressando os efeitos tóxicos causados pelos diferentes tipos de contaminantes (WALKER et al., 2001; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005; SOUZA et al., 2012).

Neste contexto, chama-se de biomarcador qualquer substância e/ou contaminante, que possa ser medido no organismo e que possa prever ou influenciar a incidência de um evento, um distúrbio fisiológico ou patológico (WHO, 2001).

## 1.7 Biomarcadores moleculares

Biomarcadores moleculares são os que fornecem os primeiros sinais de estresse, sendo muito sensíveis em relação a certos compostos tóxicos. Permitem uma identificação antecipada de efeitos adversos em níveis superiores de organização biológica, e podem ser utilizados preventivamente em avaliações de qualidade ambiental, de modo a iniciar estratégias de bioremediação antes de danos irreversíveis (PRIETO-ÁLAMO et al., 2012; CHAPMAN et al., 2011).

Com o avanço da tecnologia de biologia molecular, métodos de expressão gênica diferencial, onde o produto da transcrição RNA mensageiro (RNAm) é processado e enviado ao citoplasma para que o ribossomo sintetize a proteína/enzima correspondente, constitui a base

molecular da resposta biológica à presença de xenobióticos (JU et al., 2007; PIÑA; CASADO; QUIROS, 2007; BRULLE et al., 2008). Esta tecnologia de expressão diferencial está sendo usada com frequência para selecionar biomarcadores cada vez mais específicos (LIANG; PARDEE, 1992; LISITSYN; WIGLER, 1993; DIATCHENKO et al., 1999; CONNON et al., 2008). Muitas bibliotecas de sequências expressas (ESTs - acrônimo do inglês *Expressed Sequence Tag*) em certas espécies de moluscos bivalves têm sido identificadas e fornecido informações extremamente úteis para a elucidação de mecanismos bioquímicos e moleculares (ZANETTE et al., 2010; LUCHMANN et al., 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Da mesma forma, o sequenciamento genômico de uma variedade de moluscos, como a ostra *C. gigas*, tem permitido a elucidação de algumas dúvidas relacionadas ao seu genoma e que podem vir a contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas de biomonitoramento (ZHANG et al., 2012).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do fenantreno (FEN) e alquilbenzenos lineares (ABL) no desenvolvimento larval e na transcrição diferencial de alguns genes alvo em *Crassostrea gigas*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração que provoca efeito adverso observado em 50% dos indivíduos ( $EC_{50}$ ) expostos ao contaminantes (FEN e ABL) em larvas de *C. gigas*;
- Avaliar a ocorrência e identificar diferentes tipos de alterações morfológicas em larvas D, 24 horas após a exposição aos contaminantes (FEN e ABL);
- Quantificar os níveis transcricionais de alguns genes-alvo relacionados com a biotransformação de fase I e II, formação de tecidos, formação de concha, sistema imunológico e apoptose em larvas de ostras *C. gigas* expostas aos contaminantes (FEN e ABL).



### 3 JUSTIFICATIVA

Estuários e habitats costeiros de todo o planeta estão continuamente submetidos a contaminantes resultantes da alta densidade populacional, industrialização, entre outros (SCHNITZLER et al., 2011).

Os moluscos bivalves apresentam ampla distribuição geográfica, são filtradores, sésseis, frequentemente eurialinos e espécies dominantes em seu hábitat (O'CONNOR, 2002). Entre as espécies importantes que habitam estas zonas está a ostra *C. gigas* originária do noroeste do Pacífico, porém introduzida a nível mundial para produção comercial, se tornando uma das espécies mais importantes da aquicultura mundial (FAO, 2014).

*C. gigas* tem sido comumente utilizada em estudos a fim de avaliar os efeitos dos contaminantes antropogênicos. As fases iniciais de vida são comprovadamente mais sensíveis à exposição aos xenobióticos sendo, portanto, fases críticas para o sucesso do estabelecimento de novas coortes populacionais (GEFFARD et al., 2002).

Os estágios iniciais de desenvolvimento da *C. gigas* são usados para avaliar a toxicidade de uma grande variedade de contaminantes (DI POI et al., 2013; MAI et al., 2012; NICE et al., 2000; WESSEL et al., 2007), no entanto, inexitem pesquisas sobre os efeitos de FEN e ABLs no desenvolvimento larval de *C. gigas*, da mesma forma que inexitem informações sobre a correlação entre as alterações morfológicas e a transcrição gênica nas fases larvais dessa espécie expostas a estes contaminantes.

Este trabalho tem como objetivo contribuir para a elucidação dos efeitos, através dos mecanismos moleculares associados à exposição a FEN e ABLs nas fases iniciais do desenvolvimento larval de ostras *C. gigas*.



## 4 CAPÍTULO I

### EFEITOS EMBRIOTÓXICOS DE FENANTRENO E ALQUILBENZENOS LINEARES EM OSTRA DO PACÍFICO *Crassostrea gigas*

**Resumo:** Vários contaminantes, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e surfactantes, estão presentes em efluentes urbanos, como o esgoto sanitário. No entanto, há um conhecimento incipiente sobre os efeitos desses poluentes nas fases iniciais de vida de organismos aquáticos, como bivalves. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade de fenantreno (FEN) e de alquilbenzenos lineares (ABLs) durante o desenvolvimento larval da ostra *C. gigas*. Os gametas foram recolhidos a partir de ostras adultas, separados por telas, fertilizado e mantidos nas unidades experimentais (100 mL, 150 larvas/mL) durante 24 h. As concentrações de FEN foram definidas em 0,37; 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e de ABL, 3,5; 5,3; 8,0; 12,0 e 18,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Como controle positivo, as larvas foram expostas ao dodecil sulfato de sódio (SDS: 320-3200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A análise do desenvolvimento larval foi expressa como percentagens líquidas do desenvolvimento normal (NPNe) de larvas em forma de D, a altura das conchas foi utilizada como um indicador de crescimento e a concentração efetiva ( $\text{CE}_{50}$ ) foi calculada utilizando o método de Spearman Karber. Observou-se uma sobrevivência de  $95 \pm 3,8\%$  no grupo controle e a  $\text{CE}_{50}$  do SDS foi de 949,86  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A  $\text{CE}_{50}$  de FEN foi de 1,91  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e de 8,94  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para ABLs. Após 24 horas de exposição, os contaminantes afetaram o desenvolvimento morfológico. O NPNe mostrou uma diferença significativa para todas as concentrações de FEN e ABLs com relação ao controle. Em geral, o FEN provocou mais alterações nas larvas do que o ABLs. Exposição ao FEN causou um aumento nas alterações no manto ( $44,5 \pm 7,4\%$ ) e na concha ( $27,9 \pm 17,5\%$ ). Exposição ao ABL também causou alterações na concha ( $38 \pm 14,7\%$ ) e no manto ( $33 \pm 21\%$ ). Inibição significativa do crescimento foi observada nas larvas expostas ao FEN (0,75 a 6,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e naquelas expostas a todas concentrações de ABLs. Este é o primeiro estudo que demonstra a suscetibilidade de embriões de moluscos marinhos quando expostos aos contaminantes ambientais FEN e ABLs.

**Palavras chave:** Fenantreno; Alquilbenzenos lineares; *Crassostrea gigas*; embriotoxicidade; desenvolvimento larval

**Abstract:** Several contaminants such as polycyclic aromatic hydrocarbons and surfactants are present in sanitary sewage. However, there is incipient knowledge about the effects of these pollutants in the early life stages of aquatic organisms, like bivalves. The aim of this study was to evaluate the toxicity of phenanthrene (PHE) and linear alkylbenzenes (LAB) during the embryo-larval development of the oyster *C. gigas*. The gametes were collected from adult oysters, separated by screens, fertilized and maintained in the experimental units (100 mL, 100 larvae/mL) during 24 h. PHE concentrations were set as 0.37; 0.75; 1.5; 3.0 and 6.0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and LAB as 3.5; 5.3; 8.0, 12.0 and 18,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . As positive control, larvae were exposed to sodium dodecyl sulfate (SDS: 320-3200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). The embryo-larval development assessment were expressed as net percentages of the normal development (NPNe) of D-shaped larvae, the shell heights was used as an indicator of growth and the effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) was calculated using Trimmed Spearman Karber method. It was observed a survival of  $95 \pm 3.8\%$  in the control group and  $\text{EC}_{50}$  was 949, 86  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (848 - 1063  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) in SDS exposed group. The PHE  $\text{EC}_{50}$  was 1.91  $\mu\text{g/L}$  (1.57 – 2.31  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and LAB 8.94  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (7.20 – 11.11  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). After 24h of exposure, the contaminants affected the morphological development. The NPNe showed a significant difference in all concentrations of PHE and LAB compared to controls. In general, the PHE provoked more larval abnormalities than LAB. PHE exposure increased larval abnormalities in mantle ( $44.5 \pm 7.4\%$ ) and shell ( $27.9 \pm 17.5\%$ ). LAB exposure also caused changes in the shell ( $38 \pm 14.7\%$ ) and mantle ( $33 \pm 21\%$ ). Significant growth inhibition was observed in larvae exposed to PHE (0.75 to 6.0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and to all LAB concentrations. This is the first study demonstrating the susceptibility of *C. gigas* embryos to PHE and LAB.

**Keywords:** Phenantrene; linear alkylbenzenes; *Crassostrea gigas*; embriotoxicity; embryo-larval development

## 5 INTRODUÇÃO

Devido à expansão demográfica e industrial nas cidades costeiras, uma enorme quantidade de efluentes domésticos e industriais são despejados em zonas costeiras (BARON et al., 1982; DANIEL et al., 2002). O impacto causado nos ecossistemas marinhos e estuarinos promove efeitos adversos nos organismos aquáticos expostos (DEBLONDE et al., 2011; TAYEB et al., 2015).

O esgoto sanitário possui uma complexa mistura de componentes, tais como, produtos de higiene pessoal e limpeza doméstica, fármacos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), seus produtos refinados (ex. fenantreno - FEN), surfactantes e derivados de detergentes como os alquilbenzenos lineares (ABLs), matéria orgânica, patógenos, entre outros (PETROVIC et al., 2003).

Esses contaminantes não necessitam ser persistentes no ecossistema para causar efeitos tóxicos, visto que há uma introdução contínua no ambiente associada às limitações dos sistemas de tratamento de esgoto em áreas costeiras (LIU et al., 2012).

Os HPAs são amplamente distribuídos na água e sedimentos marinhos causando grande preocupação para a conservação dos recursos naturais (RUDNICK; CHEN, 1998). Esta classe de contaminantes apresenta um alto potencial tóxico que pode causar efeitos negativos ao ambiente aquático principalmente por acumularem nos organismos por via direta ou indireta (através da cadeia alimentar), além de muitos apresentarem potencial carcinogênico, citotóxico e mutagênico (PANDEY, 2011; COMMENDATORE et al., 2012).

O fenantreno (FEN) é um HPA que pode ser encontrado em altas concentrações na água de ambientes próximos a indústria petrolífera (CARLS et al., 2002). O FEN é considerado como contaminante prioritário pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Comunidade Econômica Européia (CEE) em função de seus efeitos potencialmente carcinogênicos, genotóxicos e neurotóxicos (NETTO et al., 2000; CAVRET; FEIDT, 2005; MARTYNIUK et al., 2009).

Os efeitos do FEN foram estudados em anelídeos (BROWN et al., 2010), moluscos (HANNAM et al., 2010; LÜCHMANN et al., 2014), insetos (PAUMEN et al., 2008) e peixes (MARTYNIUK et al., 2009).

Dentre os efeitos encontrados, estão a supressão do sistema imune, redução da expressão de genes relacionados a gonodotrofina, neurotransmissores, estresse oxidativo, atraso no desenvolvimento e

diminuição da sobrevivência dos organismos (PAUMEN et al., 2008; MARTYNIUK et al., 2009; BROWN, 2010; HANNAM et al., 2010; MARINKOVIC et al., 2011).

Existem poucos estudos sobre os danos causados pelos alquilbenzenos lineares (ABLs). Segundo Takada et al., (2004) os ABLs são amplamente utilizados como base para agentes de limpeza e constituem-se em um dos principais elementos na formulação de surfactantes (ALS) para a produção de produtos de limpeza como detergente. Cerca de 1% a 3% de ABLs não reagem durante o processo de sulfonação permanecendo resíduos de ABLs em produtos de limpeza (EGANHOUSE; BLUMFIELD; KAPLAN, 1983; TAKADA; EGANHOUSE, 1998).

Os ABLs são potencialmente prejudiciais aos organismos vivos devido a sua capacidade de perturbar membranas e proteínas, podendo levar à desnaturação (ASOK; JISHA, 2012).

Alguns estudos demonstraram que FEN e ABLs são tóxicos para os organismos aquáticos (FLORES-NUNES et al., 2015; LUCHMANN et al., 2014; MEIER et al., 2013; STRINGER et al., 2012), podendo causar riscos potenciais para o ambiente, porém, pouco se sabe sobre os efeitos sobre o desenvolvimento larval em espécies marinhas.

Por meio de bioensaios, organismos aquáticos respondem a presença to de uma substância tóxica, isolada ou combinada com outras, fornecendo uma base de dados que pode ser usada para avaliar o risco associado as condições de exposição (RAND; PETROCELLI, 1985).

Diferentes métodos de ensaios com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e/ou de campo, têm sido utilizados e consagrados como instrumentos de controle ambiental, fornecendo dados quali-quantitativos sobre os efeitos adversos de estressores ambientais (COONEY, 1995).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios, pode-se empregar diferentes métodos estatísticos, com o propósito de calcular a  $EC_{50}$  (concentração eficaz que provoca alteração em 50% dos organismos) ou  $CL_{50}$  (concentração média letal a 50% dos organismos expostos) (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

As fases iniciais do desenvolvimento de bivalves são particularmente adequadas para este tipo de ensaio por serem facilmente produzidas e mantidas em condições laboratoriais controladas, e por se desenvolverem rapidamente em poucas horas ou dias, dependendo da espécie (CHAPMAN; MORGAN, 1983).

Os testes de embriotoxicidade de molusco bivalve têm sido utilizados como uma ferramenta de diagnóstico simples, confiável e

altamente sensível para a avaliação de anomalias embrionárias e para o controle da poluição marinha (EMBRY et al., 2010). A ostra *Crassostrea gigas*, especialmente nas fases iniciais de desenvolvimento, é usada como organismo sentinela para avaliar a toxicidade de uma grande variedade de poluentes em bioensaios marinhos, devido à sua alta sensibilidade (DI POI et al., 2014; MAI et al., 2012; MOTTIER et al., 2013; GEFFARD et al., 2002 e WESSEL et al., 2007).

Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo determinar a concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) para o FEN e ABLs sobre o desenvolvimento larval de *C. gigas*, contribuindo para a avaliação desses contaminantes. Tal avaliação é útil considerando que o FEN e os ABLs são encontrados no ambiente costeiro e inexistem estudos que avaliam seus efeitos no desenvolvimento larval de moluscos bivalve.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Obtenção dos animais

Para a obtenção das larvas foram realizadas desovas com reprodutores de *C. gigas* provenientes do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM - UFSC), Florianópolis-SC. As desovas foram feitas através do método de sacrifício (“*strip*”), que consiste na raspagem do corpo mole do animal com auxílio de bisturi (ALLIEGRO; WRIGHT, 1983; ALLEN; DOWNING; CHEW, 1988; THAIN, 1991).

As ostras foram identificadas quanto ao sexo e a qualidade de seus gametas, avaliada através de microscopia ótica a fim de verificar o formato dos ovócitos e a motilidade dos espermatozóides (CARVALHAES, 2001; VÉLEZ; MARTINEZ, 1967).

Após a raspagem, o material foi separado usando peneiras com telas de 70  $\mu\text{m}$  (para reter impurezas) e 18  $\mu\text{m}$  (para reter gametas femininos). Os gametas obtidos foram acondicionados em um recipiente de 20 litros de água do mar filtrada, diluídos e hidratados por uma hora a 25°C. A fertilização dos ovócitos ocorreu na proporção de 1:7 (ovócito:espermatozóide) (MELO, 2011).

Uma vez identificada a fertilização, uma alíquota dos embriões em suspensão foi analisada após 20 minutos ao microscópio óptico (100 x) em uma câmara de Sedgwick-Rafter a fim de ajustar a densidade em cada unidade experimental.

## 6.2 Delineamento experimental

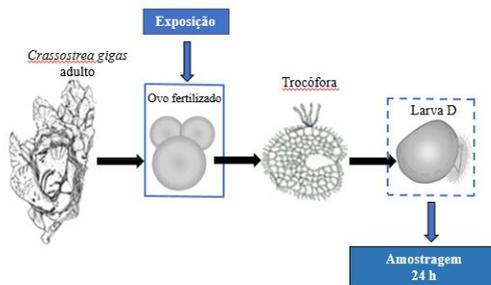
De modo a se obter uma faixa de concentrações do FEN e os ABLs para realização dos ensaios definitivos foram realizados ensaios preliminares. Estes ensaios seguiram os mesmos procedimentos dos ensaios definitivos e possibilitaram um conhecimento prévio dos gradientes de concentrações a serem empregados nos mesmos. Devido à baixa solubilidade em água, os contaminantes testados foram diluídos em solventes orgânicos (FEN: Dimetilsulfóxido – DMSO 0,01%; ABLs: Etanol 0,01%).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por três controles e cinco concentrações de FEN e ABLs com três réplicas cada. Para cada tratamento foram utilizados béqueres de 100 mL, onde a densidade de embriões foi ajustada em 150 embriões/mL. Os béqueres utilizados nos ensaios foram lavados e mantidos em solução de ácido clorídrico 10% durante 24 horas, de acordo com protocolo de Nascimento et al. (2002).

Os grupos foram: grupos controle: CT - controle (água do mar filtrada); CT-FEN - controle solvente FEN (água do mar filtrada + DMSO 0,01%); CT-ABLs - controle solvente ABLs (água do mar filtrada + Etanol 0,01%); FEN nas respectivas concentrações definitivas (0,37; 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ); e ABLs nas respectivas concentrações definitivas (3,5; 5,3; 8,0; 12,0 e 18,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

O Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado como controle positivo para testar a sensibilidade dos embriões em concentrações que variaram de (320; 560; 1000; 1800 e 3200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Após uma hora da fertilização, os embriões com três a quatro células foram separados em tela de 18  $\mu\text{m}$  e transferidos para as unidades experimentais, permanecendo expostos durante 24 horas, com temperatura e salinidade controladas. Durante este período de incubação, os embriões se desenvolveram até o estágio véliger (larva-D) (Figura 1). Ao final desse período, as larvas foram avaliadas quanto ao atraso no desenvolvimento e alterações morfológicas.

A qualidade da água foi avaliada através dos seguintes parâmetros físicos e químicos: oxigênio dissolvido  $>4,0$  ppm, salinidade 28 a 35, temperatura  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e pH 7,0 a 8,5.



**Figura 1** – Esquema representativo das fases de desenvolvimento da ostra *Crassostrea gigas*, indicando a fase de exposição (quadrado contínuo) e a fase de amostragem (quadrado pontilhado).

Após a exposição, as larvas foram coletadas (tela de 18  $\mu$ m), fixadas, utilizando uma solução de formol 8%, e armazenadas em criotubos de 2 ml para posterior avaliação das alterações morfológicas para cada contaminante. Os resultados foram expressos em porcentagem líquida do desenvolvimento normal (NPNe), utilizando as seguintes fórmulas segundo Afnor (2009):

$$NPNe = 100 - \left[ \frac{PAe - \overline{PAC}}{100 - \overline{PAC}} \times 100 \right]$$

Onde:

$$PAe = \frac{NAe \times 100}{Te}$$

NAe = Número de larvas anormais em uma réplica do tratamento;

Te = Número total de larvas na réplica;

$\overline{PAC}$  = Média do PAC (em um experimento).

$$PAC = \frac{NAC \times 100}{Tc}$$

NAC = Número de larvas anormais em uma réplica do controle;

Tc = Número total de larvas em uma réplica do controle.

A avaliação dos efeitos dos contaminantes sobre o desenvolvimento larval foi analisada de acordo com o descrito por Mottier et al. (2013) modificado e padronizado pelo método AFNOR XP-T-90-382 (AFNOR, 2009), onde 100 indivíduos (larvas véliger) foram analisados em uma câmara de Sedgwick-Rafter ao microscópio. Para o cálculo da NPNe foram considerados quatro tipos de alterações, segundo Mottier et al. (2013): anormalidade da concha e/ou articulação; anormalidade do manto (hipertrofia); anormalidade do manto e concha e/ou articulação; e desenvolvimento final paralisado. Também foi medida a altura da concha, a partir do umbo, como um indicador do crescimento.

### 6.3 Análise estatística dos dados

A partir dos resultados obtidos, foram determinados os valores de  $CE_{50}$  (concentração eficaz que provoca alteração em 50% dos organismos, considerando o nível de confiança de 95%). Essa determinação foi feita através do método computadorizado Trimmed Spearman-Kärber 1.5v (HAMILTON et al., 1977). Os dados relativos aos efeitos dos contaminantes sobre o desenvolvimento líquido normal e a altura das conchas foram estatisticamente testadas para a verificação da distribuição normal (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância dos dados (Levene).

No caso de dados paramétricos, os parâmetros entre os diferentes tratamentos e concentrações foram comparados por análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. No caso de dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas entre os grupos foram aceitas com  $p \leq 0,05$ .

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (SD) e mostrados em gráficos gerados no Prism 6 (GraphPad). Não foram observadas diferenças no desenvolvimento larval em *C. gigas* entre os grupos CT-FEN, CT-ABLs e o controle de água do mar. Desta forma, optou-se por utilizar somente este último na representação gráfica em todas as análises. As análises de dados foram feitas pelo programa Statistica (StatSoft, versão 10).

## 7 RESULTADOS

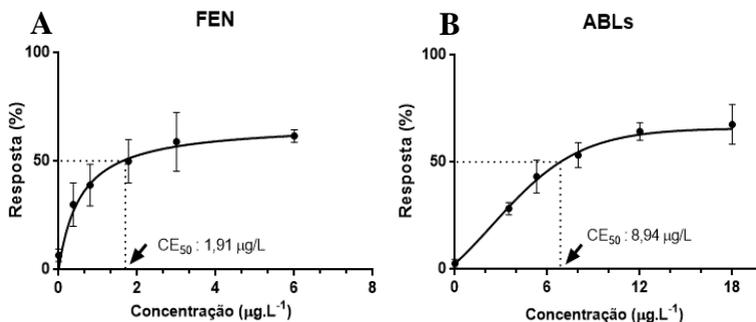
### 7.1 Características físico-químicas da água de exposição

As características da água no teste definitivo permaneceram estáveis durante os testes de toxicidade, considerando-se o início e final do experimento (24h). Os valores médios de temperatura (média  $\pm$  desvio padrão) da água nas unidades experimentais durante o experimento foram de  $25,5 \pm 0,9$  °C. A salinidade média foi de  $30,7 \pm 1,3$ . O oxigênio dissolvido foi de  $6,0 \pm 0,2$  mg.L<sup>-1</sup>. O pH na foi de  $7,6 \pm 0,05$

### 7.2 Embriotoxicidade

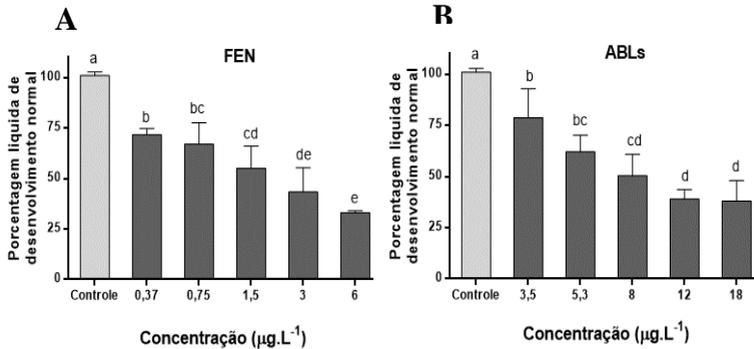
Os testes de embriotoxicidade foram válidos nesse estudo, uma vez que se respeitaram as duas condições de validação exigida (AFNOR, 2009). Nos controles, as taxas de larvas normais foram de pelo menos ( $95 \pm 3,8\%$ ) e a CE<sub>50</sub> do SDS variou de 848 a 1063 µg/L<sup>-1</sup>.

Os valores da CE<sub>50</sub> e as curvas concentração-resposta obtidos no presente estudo são mostrados na Figura 2. O valor de CE<sub>50</sub> obtido para o FEN foi de 1,91 µg.L<sup>-1</sup>, com intervalo de confiança de 95% entre 1,57 e 2,31 µg.L<sup>-1</sup>. Para os ABLs, o valor da CE<sub>50</sub> foi de 8,94 µg.L<sup>-1</sup>, com intervalo de confiança de 95% entre 7,20 e 11,11 µg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 2** – Gráfico da curva concentração-resposta para fenantreno (FEN) (A) e alquilbenzenos lineares (ABLs) (B) referente ao teste embriotóxico e definição dos valores de CE<sub>50</sub>.

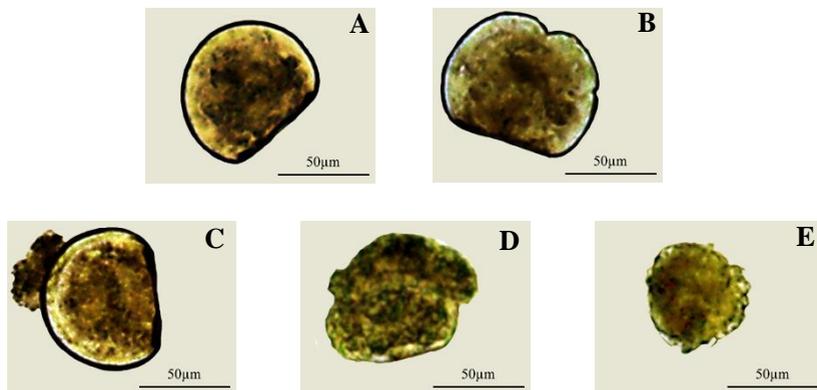
A curva concentração-resposta mostrou um aumento significativo da percentagem de larvas alteradas com concentrações crescentes de FEN e ABLs, apresentando um efeito dependente da concentração no desenvolvimento larval caracterizada por uma diminuição na frequência de larvas D normais em comparação ao controle (Figura 3).



**Figura 3** - Gráfico da porcentagem líquida de desenvolvimento normal (NPNe) para fenantreno (FEN) (A) e alquilbenzenos lineares (ABLs) (B) referente ao teste embriotóxico. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (Kruskall-Wallis,  $p < 0,05$ ; teste de Newman-Keuls).

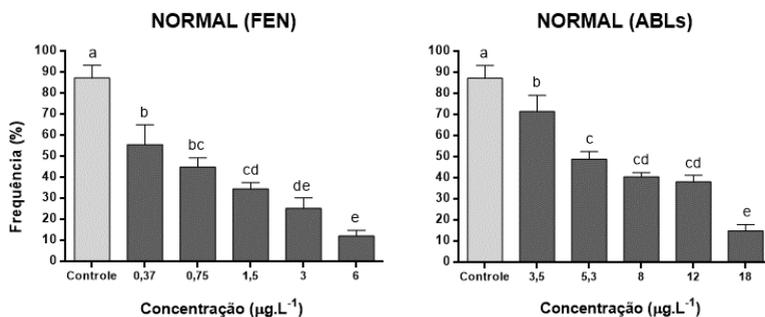
Quanto às alterações morfológicas causadas pela exposição ao FEN, independentemente da concentração, a alteração observada mais frequente foi hipertrofia do manto ( $44,5 \pm 7,4\%$ ) seguida pelas alterações na concha ( $27,9 \pm 17,5\%$ ). As larvas expostas aos ABLs também apresentaram alterações na concha ( $38 \pm 14,7\%$ ) e no manto ( $33 \pm 21\%$ ).

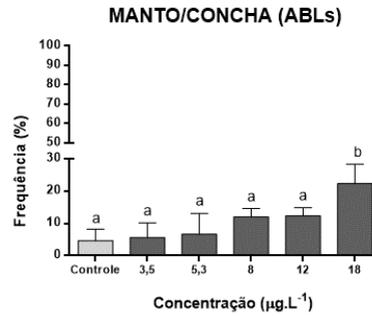
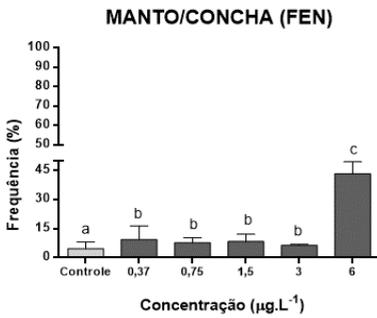
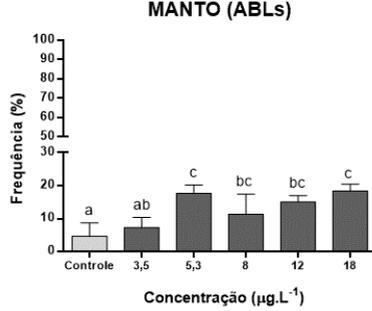
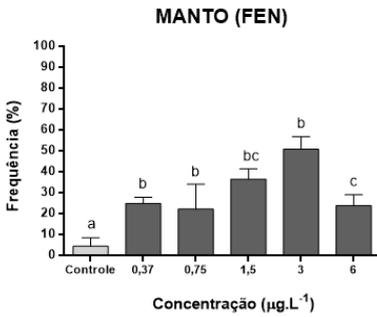
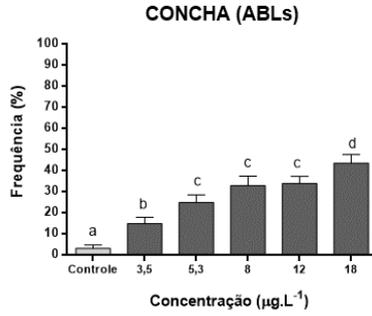
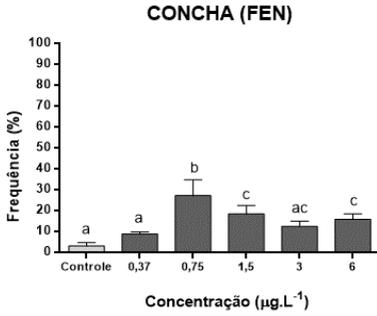
Diferentes tipos de alterações nas larvas expostas por 24 horas foram observadas claramente, tais como assimetria nas conchas, estruturas moles incompletas ou desenvolvimento incompleto (Figura 4).

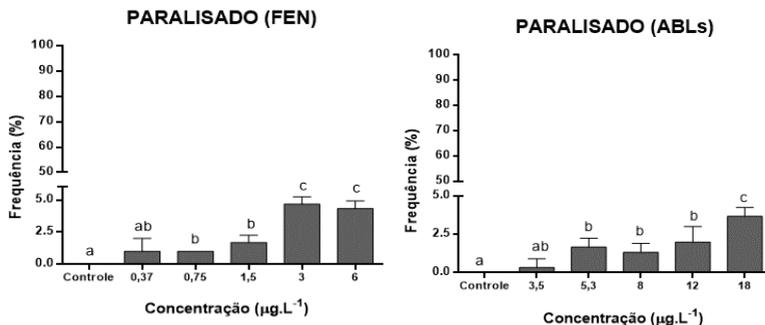


**Figura 4** - Imagens de microscopia óptica, mostrando diferentes alterações observadas em larvas-D referente ao teste embriotóxico: (A) normal, (B) alteração na concha e/ou alteração na articulação da concha, (C) alteração de hipertrofia de manto, (D) alteração na concha e manto, (E) estágio de desenvolvimento paralisado, ocorrendo atraso.

Diferenças significativas no desenvolvimento de larvas, como evidenciado pela diminuição da frequência de larvas normais, ocorreram entre o grupo controle e aqueles expostos a algumas concentrações maiores testadas com ambos contaminantes (Figura 5).

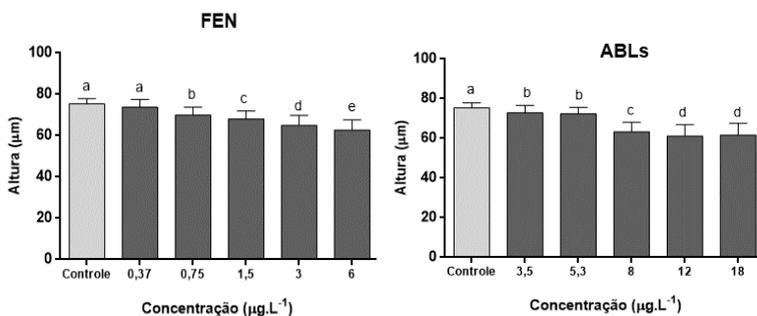






**Figura 5** – Gráfico das frequências de diferentes tipos de alterações para fenantreno (FEN) e alquilbenzenos lineares (ABLs) referente ao teste embriotóxico. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey).

Após 24 horas, os embriões expostos às concentrações crescentes de FEN e ABLs apresentaram um tamanho de concha significativamente menor, comparados aos controles. As diferenças de tamanho foram mais pronunciadas nas concentrações de 3 e 6  $\mu\text{g.L}^{-1}$  nas larvas expostas ao FEN e 12 e 18  $\mu\text{g.L}^{-1}$  nas expostas aos ABLs (Figura 6).



**Figura 6** - Gráfico do efeito do fenantreno (FEN) e alquilbenzenos lineares (ABLs) sobre o crescimento larval. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey).

## 8 DISCUSSÃO

Este trabalho trata de um primeiro estudo sobre os efeitos de FEN e ABLs no desenvolvimento morfológico dos estágios larvais de *C. gigas*. Fases iniciais de vida são normalmente mais sensíveis aos efeitos tóxicos dos contaminantes que no estágio adulto (HIS et al., 1997). Essa sensibilidade está relacionada com os processos biológicos que ocorrem nesse período, como formação dos eixos morfológicos e rearranjo celular (GILBERT, 2003).

Devido a isto, o desenvolvimento larval tem sido amplamente utilizado como “*endpoint*” na ecotoxicologia marinha, inclusive utilizando diferentes espécies de bivalves, tais como a ostra do Pacífico (LYONS et al., 2002; CACHOT et al., 2006; WESSEL et al., 2007; LIBRALATO et al., 2008; AKCHA et al., 2012; MOTTIER et al., 2013).

Comparando as concentrações que induziram efeitos embriotóxicos em *C. gigas* utilizadas nesse estudo para ambos contaminantes (FEN –  $1,91 \mu\text{g.L}^{-1}$  e ABLs –  $8,94 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) com os herbicidas à base de glifosato utilizados por Mottier et al. (2013), verifica-se que esses últimos são menos tóxicos pois seus efeitos são observados a uma concentração mínima de  $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Roundup Express®).

Wessel et al. (2007) mostraram um aumento no número de larvas alteradas na concentração mais elevada ( $122 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) de exposição ao inseticida Endosulfan. Alguns metais, tais como o  $\text{HgCl}_2$ , foram mais tóxicos, apresentando uma  $\text{CE}_{50}$  de  $12,3 \mu\text{g.L}^{-1}$  (His et al., 1999). Martin et al. (1981) realizaram um estudo para analisar os efeitos de alguns metais sobre o desenvolvimento larval de *C. gigas* e observaram que a  $\text{CE}_{50}$  para  $\text{ZnSO}_4$  foi  $119 \mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $\text{CdCl}_2$ ,  $611 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{AgNO}_3$ ,  $22 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Entretanto alguns contaminantes orgânicos, do grupo dos HPAs são conhecidos por sua elevada toxicidade, tais como o benzo[a]pireno, que mesmo em concentrações baixas ( $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) induziram alterações sobre o desenvolvimento larval em *C. gigas* (LYONS et al., 2002). Compostos alquilfenóis, como o 4-nonilfenol, foram relatados como indutores de alterações na concentração de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  em larvas de *C. gigas* (NICE, et al., 2000).

Diferentemente dos HPAs, existem poucos estudos sobre a toxicidade de tensoativos sintéticos (ABLs e ALS) nos primeiros estágios de vida de moluscos, apesar da alta relevância da contaminação ambiental por estes compostos.

Hidu (1965) foi o primeiro a estudar a toxicidade do tensoativo (ALS) sobre o desenvolvimento de bivalves. Outros estudos foram realizados testando o ALS em *Crassostrea virginica* (CALABRESE; DAVIS, 1967; RENZONI, 1973), *Mytilus edulis* (GRANMO, 1972) e o último trabalho realizado foi por Hansen et al. (1997) que observaram efeitos fisiológicos, sobre a atividade natatória, alimentação e crescimento de larvas de mexilhão *Mytilus edulis*. O primeiro estudo de exposição a moluscos marinhos aos ABLs mostrou a influência deste contaminante sobre respostas bioquímicas e moleculares em ostras adultas de *C. gigas* (FLORES-NUNES et al., 2015).

Sobre os efeitos diretos do FEN e ABLs no crescimento larval, observou-se uma diminuição da altura da concha das larvas expostas a FEN abaixo da  $CE_{50}$  ( $0,75 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Este resultado corrobora com o trabalho feito por Geffard et al. (2002) onde avaliando elutriatos de sedimento contaminados com HPAs e metais verificaram uma maior sensibilidade do teste de crescimento larval, em comparação com teste de embriotoxicidade.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do estudo foi fornecer os primeiros dados sobre a toxicidade do FEN e dos ABLs no desenvolvimento larval de *C. gigas*. Os valores de  $CE_{50-24h}$  encontrados nos testes de embriotoxicidade foram menores do que aqueles relatados para outros contaminantes, tais como, fármacos, herbicidas e metais para a mesma espécie, mostrando que larvas de *C. gigas* apresentam menor limiar de sensibilidade a FEN e aos ABLs. Entretanto, as concentrações utilizadas que resultaram efeitos significativos são mais elevadas que as encontradas em águas costeiras ( $\text{ng.L}^{-1}$ ). Além das taxas de alterações, a identificação dos diferentes graus destas alterações (ex. concha) permite uma melhor padronização dos efeitos observados.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFNOR, **Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieu aqueux.** XP-T90-382. AFNOR, La Plaine-Saint-Denis, France, pp. 19, 2009.

AKCHA, Farida; SPAGNOL, Charlene; ROUXEL, Julien. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 106, p. 104-113, 2012.

ALLEN, Standish K.; DOWNING, Sandra L.; CHEW, Kenneth K. **Hatchery manual for producing triploid oysters.** Washington Sea Grant Program, P. 27, 1988.

ALLIEGRO, Mark C.; WRIGHT, David A. Polyspermy inhibition in the oyster, *Crassostrea virginica*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 227, n. 1, p. 127-137, 1983.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaios de Toxicidade com Organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.** São Carlos, SP. Rima, p. 117-152, 2006.

ASOK, Aju K.; JISHA, M. S. Biodegradation of the Anionic Surfactant Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) by Autochthonous *Pseudomonas* sp. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 223, n. 8, p. 5039-5048, 2012.

BARON, ROY C. et al. Norwalk gastrointestinal illness an outbreak associated with swimming in a recreational lake and secondary person-to-person transmission. **American Journal of Epidemiology**, v. 115, n. 2, p. 163-172, 1982.

BROWN, Sarah AE et al. 1 H NMR metabolomics of earthworm exposure to sub-lethal concentrations of phenanthrene in soil. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 6, p. 2117-2123, 2010.

CACHOT, Jerome et al. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 3, p. 257-267, 2006.

CALABRESE, Anthony; DAVIS, Harry. Effects of 'soft' detergents on embryos and larvae of the american oyster (*Crassostrea virginica*).

**Proceedings of the National Shellfisheries Association**. V. 57, p. 11-16, 1967.

CARLS, M. G.; RICE, S. D.; HOSE, J. E. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 481-493, 2002.

CARVALHAES, Ane de Lima. **Método de extrusão: alternativa para testes de toxicidade com o mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 70 f, 2001.

CAVRET, S; FEIDT, C. Intestinal metabolism of PAH: in vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. **Environmental Research**, v. 98, n. 1, p. 22-32, 2005.

CHAPMAN, Peter M.; MORGAN, John D. Sediment bioassays with oyster larvae. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 438-444, 1983.

COMMENDATORE, M. G. et al. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). **Marine Environmental Research**, n.74, p.20-31, 2012.

COONEY, J.D. Sediment Tests. In: RAND, G. M. (Editor). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. Ecological Services Inc. North Palm Beach, Florida, 1995.

DANIEL, Mariely HB et al. Effects of urban sewage on dissolved oxygen, dissolved inorganic and organic carbon, and electrical conductivity of small streams along a gradient of urbanization in the Piracicaba river basin. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 136, n. 1-4, p. 189-206, 2002.

DEBLONDE, Tiphanie; COSSU-LEGUILLE, Carole; HARTEMANN, Philippe. Emerging pollutants in wastewater: a review of the

literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 442-448, 2011.

DI POI, Carole et al. Toxicity of five antidepressant drugs on embryo-larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 23, p. 13302-13314, 2014.

EGANHOUSE, Robert P.; BLUMFIELD, Dara L.; KAPLAN, Isaac R. Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. **Environmental Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 523-530, 1983.

EMBRY, Michelle R. et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic Toxicology**, v. 97, n. 2, p. 79-87, 2010.

FLORES-NUNES, Fabrício et al. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p. 17386–17396, 2015.

GEFFARD, Olivier; BUDZINSKI, Hélène; HIS, Edouard. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bioaccumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. **Ecotoxicology**, v. 11, n. 6, p. 403-416, 2002.

GILBERT, Scott F. *Developmental Biology*. Sunderland, MA. 2003.

GOMES, L. A. O. **Cultivo de Crustáceos e Moluscos**. São Paulo: Nobel, 226, p. 1986.

GRANMO, Å. Development and growth of eggs and larvae of *Mytilus edulis* exposed to a linear dodecylbenzenesulphonate, LAS. **Marine Biology**, v. 15, n. 4, p. 356-358, 1972.

HAMILTON, Martin A.; RUSSO, Rosemarie C.; THURSTON, Robert V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

- HANNAM, Marie L. et al. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 779-784, 2010.
- HANSEN, B. et al. Physiological effects of the detergent linear alkylbenzene sulphonate on blue mussel larvae (*Mytilus edulis*) in laboratory and mesocosm experiments. **Marine Biology**, v. 128, n. 4, p. 627-637, 1997.
- HIDU, Herbert. Effects of synthetic surfactants on the larvae of clams (*M. mercenaria*) and oysters (*C. virginica*). **Journal (Water Pollution Control Federation)**, v. 37 p. 262-270, 1965.
- HIS, E.; ROBERT, R.; DINET, A. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Biology**, v. 100, n. 4, p. 455-463, 1989.
- HIS, Edouard et al. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. **Water Research**, v. 33, n. 7, p. 1706-1718, 1999.
- LIBRALATO, Giovanni et al. Ecotoxicological evaluation of industrial port of Venice (Italy) sediment samples after a decontamination treatment. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 644-650, 2008.
- LIU, Cheng et al. Past and future trends in grey water footprints of anthropogenic nitrogen and phosphorus inputs to major world rivers. **Ecological Indicators**, v. 18, p. 42-49, 2012.
- LÜCHMANN, K. H. et al. A light in the darkness: New biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 324-334, 2014.
- LYONS, B. P.; PASCOE, C. K.; MCFADZEN, I. R. B. Phototoxicity of pyrene and benzo [a] pyrene to embryo-larval stages of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3, p. 627-631, 2002.

MAI, Huong et al. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 12, p. 2663-2670, 2012.

MARTIN, Michael et al. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. **Marine Pollution Bulletin**, v. 12, n. 9, p. 305-308, 1981.

MARTYNIUK, Christopher J. et al. Aquatic contaminants alter genes involved in neurotransmitter synthesis and gonadotropin release in largemouth bass. **Aquatic Toxicology**, v. 95, n. 1, p. 1-9, 2009.

MCLUSKY, D. S. Practical handbook of Marine Science: Edited by MJ Kennish; Times Mirror International Publishers, London (CRC Press, Boca Raton, FL). 566 pp. 1995.

MEIER, John R. et al. An integrated assessment of sediment remediation in a midwestern US stream using sediment chemistry, water quality, bioassessment, and fish biomarkers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 3, p. 653-661, 2013.

MELO, Emílio Mateus Costa. **Indução à Triploidia em *Crassostrea gigas***. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em aquicultura, Departamento de Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 38 f, 2011.

MOTTIER, Antoine et al. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, v. 128, p. 67-78, 2013.

NASCIMENTO, Iracema Andrade; DE SOUSA, Eduinetty Ceci Pereira Moreira; NIPPER, Marion Grosze. **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil**. Artes Gráficas e Indústria, p.73-81, 2002.

NETTO, Annibal D. Pereira et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

NICE, H. E. et al. Development of *Crassostrea gigas* larvae is affected by 4-nonylphenol. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 6, p. 491-496, 2000.

PANDEY, S. K.; KIM, Ki-H; BROWN, R. JC. Review of techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in air. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 1716-1739, 2011.

PAUMEN, Miriam León et al. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to polycyclic aromatic compound exposure. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 1, p. 225-232, 2008.

PETROVIĆ, Mira; GONZALEZ, Susana; BARCELÓ, Damià. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685-696, 2003.

RAISUDDIN, Sheikh et al. The copepod Tigriopus: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. **Aquatic Toxicology**, v. 83, n. 3, p. 161-173, 2007.

RAND, Gary M.; PETROCELLI, Sam R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. FMC Corp., Princeton, NJ, 1985.

RENZONI, A. The influence of some detergents on the larval life of marine bivalve larvae. In: **Proceedings of the 5 th International Colloquium of Medical Oceanography**. p. 101-104. 1973.

RUDNICK, Steven M.; CHEN, Robert F. Laser-induced fluorescence of pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in seawater. **Talanta**, v. 47, n. 4, p. 907-919, 1998.

STRINGER, Tristan J. et al. Development of a harpacticoid copepod bioassay: selection of species and relative sensitivity to zinc, atrazine and phenanthrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 363-371, 2012.

TAKADA, Hideshige; EGANHOUSE, Robert P. Molecular markers of anthropogenic waste. **Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation**, v. 5, p. 2883-2940, 1998.

TAYEB, A. et al. Impact of urban and industrial effluents on the coastal marine environment in Oran, Algeria. **Marine Pollution Bulletin**, v. 98, n. 1, p. 281-288, 2015.

THAIN, J. E. **Biological effects of contaminants: oyster (*Crassostrea gigas*) embryo bioassay**. Copenhagen (DK): International Council for the Exploration of the Sea, 1991.

VÉLEZ, A.; MARTÍNEZ, R. Reproducción y desarrollo larval experimental del mejillón comestible de Venezuela *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Boletín del Instituto Oceanográfico Universidad de Oriente**, v. 6, p. 266-285, 1967.

VIEIRA, Khauê Silva. **Parâmetros genéticos para peso e altura de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*)**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em aquicultura, Departamento de Centro de Ciências Agrarias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 40 f, 2013.

WESSEL, Nathalie et al. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 85, n. 2, p. 133-142, 2007.

ZARONI, Letícia Pires. **Testes de toxicidade com a utilização de embriões do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758)**: Uma adequação do método. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - IO-USP, São Paulo, 43 f, 2000.

## 11 CAPITULO 2

### RESPOSTAS MOLECULARES DURANTE O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE OSTRAS DO PACÍFICO *Crassostrea gigas* EXPOSTAS A FENANTRENO E ALQUILBENZENOS LINEARES

#### RESUMO

Há décadas, vários contaminantes como o FEN e ABLs vêm sendo descartados continuamente no ambiente marinho acarretando problemas aos organismos que habitam esses locais. Entretanto, o efeito desses contaminantes em estágios iniciais de desenvolvimento ainda é pouco conhecido. O objetivo desse estudo foi realizar um ensaio de embriotoxicidade para verificar a influência do FEN e ABLs em *C. gigas* e avaliar as respostas moleculares, através da transcrição de genes envolvidos na biotransformação de contaminantes, sistema imunológico, crescimento de tecidos, crescimento de concha e apoptose. Os gametas foram recolhidos a partir de ostras adultas, separados por telas, fertilizados e mantidos nas unidades experimentais (1000 mL, 150 larvas/mL) durante 24 h. As concentrações foram definidas para FEN (0,02 e 2,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e ABLs (0,09 e 9,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). O desenvolvimento larval foi expresso como percentagens líquidas do desenvolvimento normal (NPNe) de larvas em forma de D. A altura da concha foi utilizada como um indicador de crescimento. A avaliação química da concha das larvas foi feita através da análise de espectrometria de energia dispersiva (EDS) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Através da técnica *PCR* quantitativo em tempo real (*qPCR*) foi analisada a transcrição de genes-alvo. Foram observados maiores danos nas concentrações mais elevadas de ambos contaminantes. Foi observada uma diminuição de NPNe nas larvas expostas ao FEN (19,7 $\pm$ 2,9%) e aos ABLs (18,2 $\pm$ 3,4%). O crescimento larval foi levemente afetado (FEN: 53,5 $\pm$  2,8 $\mu\text{m}$ ; ABLs 52,5 $\pm$  2,6 $\mu\text{m}$ ) e foi observado um aumento na frequência de alterações no manto/concha (FEN: 37,5 $\pm$ 6,0%; ABLs: 29,7 $\pm$ 13,9%) seguido de alterações no manto (FEN: 36,9 $\pm$ 7,9%; ABLs: 34 $\pm$ 4,1%). A análise química das conchas revelou pequenos picos de cálcio detectados em ambas as concentrações comparados ao controle. A transcrição gênica demonstrou uma indução no gene *CG-TAL* (FEN 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), *CG-TYR* e *CALMODULIN-LIKE* (FEN 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e ABLs 9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e uma diminuição na transcrição dos genes *CYP30C1*, *FERRITIN-*

*LIKE* e *NACREIN* ( $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e *INSULIN-LIKE* (todos os tratamentos). O presente estudo forneceu evidências de que a exposição ao FEN e ao ABLs, podem prejudicar seriamente o desenvolvimento inicial da ostra *C. gigas*, causando um aumento nas deformidades nas larvas, reduzindo seu crescimento e alterando a transcrições de genes importantes no desenvolvimento, mesmo em concentrações muito baixas.

**Palavras-chave:** embriotoxicidade, fenantreno, aquilbenzenos lineares, *Crassostrea gigas*, transcrição gênica, alterações morfológicas.

## ABSTRACT

For decades several contaminants like FEN and LAB has been continuously discarded in the marine environment causing problems for organisms that inhabit these areas. However, the effects of these contaminants in early life stages are still little known. Therefore the aim of this study was to carry out embryotoxicity tests to verify the influence of FEN and LAB in *C. gigas* larvae and to evaluate molecular responses, through the analysis of transcription of genes involved in the biotransformation of contaminants, immune system, tissue growth, shell growth and apoptosis. Gametes were collected from adult oysters, separated by screens, fertilized and kept in the experimental volume (1000 mL, 150 larvae/ml) for 24 h. The concentrations were established for FEN ( $0.02$  and  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) and LAB ( $0.09$  and  $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Embryolarval development was expressed as net percentages of normal development (NPNe) D-shaped larvae. Shell height was used as a growth indicator, chemical evaluation of larvae the shell was taken by spectrometric energy dispersive (EDS) coupled to a scanning electron microscope (SEM). Real-time polymerase chain reaction technique (qPCR) analyzed the transcription of target genes. There was a significant decrease in NPNe at the highest concentrations of  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  FEN ( $19,75 \pm 2,86\%$ ) and  $9 \mu\text{g.L}^{-1}$  LAB ( $18,25 \pm 3,45\%$ ), the larval growth was slightly affected, FEN  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $53,50 \pm 2,80\mu\text{m}$ ) and  $9 \mu\text{g.L}^{-1}$  LAB ( $52,52 \pm 2,61\mu\text{m}$ ) and an increase in the frequency of alterations in the mantle/shell ( $37,75 \pm 6,01\%$ ) followed by alterations in the mantle ( $36,88 \pm 7,9\%$ ) in the concentration FEN  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  and LAB  $9 \mu\text{g.L}^{-1}$  also showed a high frequency of such alterations mantle/shell ( $29,75 \pm 13,95\%$ ) and mantle ( $34 \pm 4,09\%$ ). Chemical analysis of the shells revealed small calcium peaks were detected in both concentrations compared to the control. Analysis of gene transcription

showed induction in the *CG-TAL* gene (2 FEN  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), *CG-TYR* and *CALMODULIN-LIKE* (FEN 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and LAB 9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and a decrease in transcription genes *CYP30C1*, *FERRITIN-LIKE* and *NACREIN* (FEN 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and *INSULIN-LIKE* (FEN 0,02  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , LAB 0,09  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and 9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). The present study provided evidences than FEN and LAB, can seriously damage initial development of *C. gigas* oyster, causing an increase in deformities larvae, reducing its growth, and changing the transcription of genes important in development even at very low concentrations.

**Keywords:** embryotoxicity; phenanthrene; linear alkylbenzenes; *Crassostrea gigas*; transcription genes; morphological alterations.

## 12 INTRODUÇÃO

Com o rápido desenvolvimento da indústria pós-revolução industrial, vários contaminantes vêm sendo despejados no ambiente marinho, promovendo o declínio da qualidade do meio biótico. Este declínio causa instabilidade do ecossistema e resulta em perdas econômicas (CONG et al., 2012; LADHAR-CHAABOUNI et al., 2012).

Entre os contaminantes mais encontrados, os efluentes urbanos são continuamente despejados sem tratamento e têm afetado os ecossistemas (JADEJA; TEWARI, 2007). Tratados ou não, esses efluentes podem liberar muitos poluentes, tais como HPAs, produtos farmacêuticos, metais e alquilbenzenos lineares (ABLs) entre outros (NOTCH; MAYER, 2009; SIM et al., 2013).

Estudos já demonstraram o impacto do despejo de efluentes em áreas costeiras (BALLS et al., 1989; MEDEIROS et al., 2008; ZANETTE et al., 2008; PETROVIC et al., 2012; FISCHER et al., 2013; FLORES-NUNES et al., 2014; GUIGUE et al., 2014).

Os HPAs são considerados como um grupo potencialmente perigoso para o meio ambiente e seus recursos biológicos, especialmente em ambientes costeiros, adjacente aos grandes centros urbanos. O reconhecimento desses fatos levou a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) a incluir 16 HPAs na lista de poluentes prioritários (MANOLI et al., 2000).

Fenantreno (FEN) é um HPA abundante e amplamente encontrado nestes ambientes (YIN et al., 2007) contribuindo de forma significativa para os efeitos tóxicos que as misturas de HPAs podem causar nas fases iniciais de desenvolvimento (TORREIRO-MELO et al.,

2015). Em peixes, estes efeitos incluem a mortalidade, deformidades craniofaciais, natação deficiente e reduções no crescimento, como observado em *Oncorhynchus gorboscha* e *Clupea pallasii* (BARRON et al., 2004). Além disso, larvas de *Danio rerio* expostas a uma mistura de HPAs, incluindo fenantreno, desenvolve uma síndrome de disfunção de efeitos cardíacos, edema e deformidades craniofaciais (INCARDONA et al., 2004).

Alquilbenzenos lineares (ABLs) são um grupo de marcadores geoquímicos que têm sido utilizados com sucesso como marcadores moleculares geoquímicos para avaliar a fonte de poluição de esgoto sanitário em sedimentos marinhos (EGANHOUSE; BLUMFIELD; KAPLAN, 1983; TAKADA; EGANHOUSE, 1998). Além disso, os ABLs estão presentes em níveis de 1% a 3% em surfactantes e detergentes como alquilbenzeno linear sulfonado (ALSs), sendo compostos orgânicos amplamente utilizados em muitas aplicações industriais e domésticas (ZENG et al., 1998; MARTINS et al., 2010).

Estudos sobre os efeitos dos ABLs em vertebrados foram realizados por Robinson e Nair (1992) em ratos, sendo que observaram efeitos genotóxicos e teragênicos. Em *C. gigas*, Souza et al., (2012) observaram em um experimento *in vivo* em uma região que recebe grande quantidade de esgoto sanitário que as ostras bioacumularam mais ABL que ostras mantidas em áreas de cultivo. Flores-Nunes et al. (2015), observaram a influência desse contaminante sobre respostas bioquímicas (GR e G6PDH) e moleculares (*HSP70-like*, *SOD-like* e *G6PDH-like*).

A ostra *C. gigas* tem uma grande contribuição (609.000 toneladas - US \$ 1,3 bilhão) para a produção mundial de ostras, na aquicultura (4,7 milhões de toneladas - US \$ 3,9 bilhões) (FAO, 2014) e é um dos moluscos mais bem estudados, com seu genoma recém sequenciado (ZHANG et al., 2012). Esta espécie habita as zonas costeiras e desempenha um papel importante na ecologia estuarina (BROWN, 1988).

Ao contrário de outros animais intertidais, ostras ficam aderidas às rochas e não podem se mover para locais diferentes, o que fez com que desenvolvessem muitos mecanismos de regulação de adaptação a ambientes altamente dinâmicos e estressantes (BARTOL; MANN; LUCKENBACH, 1999). A tolerância da ostra a condições extremas de estresse faz com que seja um excelente organismo estudo para a análise de resposta ao estresse e adaptação (HEILMAYER et al., 2008).

Quando os animais são expostos a algum estresse ambiental, as respostas mais rápidas são observadas quanto às alterações na regulação

da transcrição de genes. Nesses processos, moléculas de RNA mensageiro (RNAm) são enviadas ao citoplasma para que ocorra a síntese proteica (PIÑA; CASADO; QUIROS, 2007). Essa regulação é essencial para o desenvolvimento de todos os organismos vivos através de processos como a proliferação celular, desenvolvimento de tecidos, imunidade, entre outros (HUSSAIN; SHAW; HIRST, 2011).

Alterações moleculares, bioquímicas, citológicas, imunológicas e fisiológicas têm sido extensivamente estudadas em bivalves e desenvolvidas para aplicação no monitoramento e a avaliação dos efeitos deletérios em organismos aquáticos (LAM; GRAY, 2003; GALLOWAY et al., 2004). Estas alterações, em diferentes níveis, expressam os efeitos de agentes estressores e são chamadas de biomarcadores (HUGGETT et al., 1992). Em bivalves, os biomarcadores estão contribuindo para compreensão de efeitos causados por diferentes contaminantes (GALLOWAY et al., 2002; RODRÍGUEZ-ORTEGA et al., 2003; VAROTTO et al., 2013; LIU; GIN; CHANG, 2014; LÜCHMANN et al., 2014; SERRANO et al., 2015).

Apesar de encontrarmos estudos que utilizaram a aplicação de testes de toxicidade em estágios iniciais de desenvolvimento, observamos que grande parte deles avaliaram apenas os ensaios de embriotoxicidade (HIS et al., 1999; GEFFARD et al., 2002; WESSEL et al., 2007; MAI et al., 2013; MOTTIER et al., 2013; DI POI et al., 2014). Atualmente, a utilização de ensaios de embriotoxicidade combinados com a avaliação das respostas moleculares de estresse em estágios iniciais de desenvolvimento de *C. gigas* é um tema pouco estudado.

Por esse motivo, o objetivo do presente estudo foi realizar um ensaio de embriotoxicidade para verificar a influência do FEN e ABLs em *C. gigas* e avaliar as respostas moleculares em larvas de ostras, através da transcrição de genes-alvo envolvidos na biotransformação de contaminantes, sistema imunológico, crescimento de tecidos, crescimento de concha e apoptose.

## 13 MATERIAL E MÉTODOS

### 13.1 Obtenção dos animais

Para a obtenção das larvas, foram realizadas desovas com reprodutores de *C. gigas* provenientes do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM - UFSC),

Florianópolis-SC. As desovas foram feitas através do método de sacrifício (“*strip*”), que consiste na raspagem do corpo mole do animal com auxílio de bisturi (ALLIEGRO; WRIGHT, 1983; ALLEN; DOWNING; CHEW, 1988; THAIN, 1991).

As ostras foram identificadas quanto ao sexo e a qualidade de seus gametas, avaliada através de microscopia ótica a fim de verificar o formato dos ovócitos e a motilidade dos espermatozóides (CARVALHAES, 2001; VÉLEZ; MARTINEZ, 1967).

Após a raspagem, o material foi separado usando peneiras com telas de 70  $\mu\text{m}$  (para reter impurezas) e 18  $\mu\text{m}$  (para reter gametas femininos). Os gametas obtidos foram acondicionados em um recipiente de 20 litros de água do mar filtrada, diluídos e hidratados por uma hora a 25°C. A fertilização dos ovócitos ocorreu na proporção de 1:7 (ovócito:espermatozóide) (MELO, 2011).

Uma vez identificada a fertilização, uma alíquota dos embriões em suspensão foi analisada após 20 minutos ao microscópio óptica em uma câmara de Sedgwick-Rafter a fim de ajustar a densidade em cada unidade experimental.

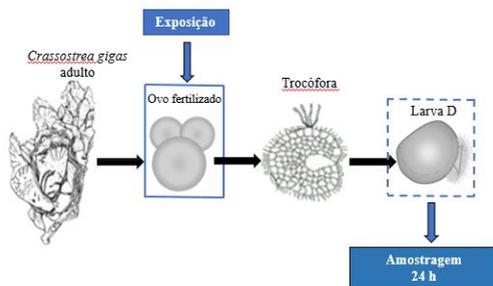
### 13.2 Delineamento experimental

Após uma hora da fertilização, os embriões com três a quatro células foram transferidos (tela de 18  $\mu\text{m}$ ) para as unidades experimentais contendo os contaminantes (FEN, ABLs). Durante este período de incubação, os embriões se desenvolveram até o estágio véliger (larva-D) (Figura 1). A escolha das concentrações baseou-se na  $CE_{50}$  encontrada nos testes de toxicidade (Capítulo 1) portanto, a maior concentração utilizada foi o valor da  $CE_{50}$  e a menor concentração foi 100 vezes menor, próximo a encontrada em ambientes costeiros.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por três controles e quatro concentrações com 10 réplicas cada. Para cada tratamento foram utilizados béqueres de 1000 mL, onde a densidade de embriões foi ajustada em 150 embriões/mL. Os béqueres utilizados nos ensaios foram lavados e mantidos em solução de ácido clorídrico 10% durante 24 horas, de acordo com protocolo de Nascimento et al. (2002).

Os grupos experimentais foram: CT - controle (água do mar filtrada); CT-FEN - controle solvente FEN (água do mar filtrada + DMSO 0,01%); CT-ABLs - controle solvente ABLs (água do mar filtrada + Etanol 0,01%); FEN (0,02 e 2,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ); e ABLs (0,09 e 9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

A qualidade da água foi avaliada através dos seguintes parâmetros físicos e químicos: oxigênio dissolvido >4.0 ppm, salinidade 28 a 35, temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e pH 7,0 a 8,5.



**Figura 1** – Esquema representativo das fases de desenvolvimento da ostra *Crassostrea gigas*, indicando a fase de exposição (quadrado contínuo) e a fase de amostragem (quadrado pontilhado).

Após a exposição, as larvas foram coletadas (tela de  $18 \mu\text{m}$ ), fixadas, utilizando uma solução de formol 8%, e armazenadas em criotubos de 2 ml para posterior avaliação das alterações morfológicas para cada contaminante. Os resultados foram expressos em porcentagem líquida do desenvolvimento normal (NPNe), utilizando as seguintes fórmulas segundo Afnor (2009):

$$\text{NPNe} = 100 - \left[ \frac{\text{PAe} - \overline{\text{PAC}}}{100 - \overline{\text{PAC}}} \times 100 \right]$$

Onde:

$$\text{PAe} = \frac{\text{NAe} \times 100}{\text{Te}}$$

NAe = Número de larvas anormais em uma réplica do tratamento;

Te = Número total de larvas na réplica;

$\overline{\text{PAC}}$  = Média do PAC (em um experimento).

$$\text{PAC} = \frac{\text{NAC} \times 100}{\text{Tc}}$$

NAC = Número de larvas anormais em uma réplica do controle;

Tc = Número total de larvas em uma réplica do controle.

A avaliação dos efeitos dos contaminantes sobre o desenvolvimento larval foi analisada de acordo com o descrito por Mottier et al. (2013) modificado e padronizado pelo método AFNOR XP-T-90-382 (AFNOR, 2009), onde 100 indivíduos (larvas véliger) foram analisados em uma câmara de Sedgwick-Rafter ao microscópio.

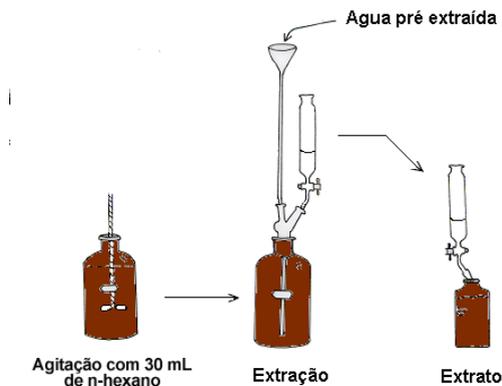
Para o cálculo da NPNe foram considerados quatro tipos de alterações, segundo Mottier et al. (2013): anormalidade da concha e/ou articulação; anormalidade do manto (hipertrofia); anormalidade do manto e concha e/ou articulação; e desenvolvimento final paralisado. Também foi medida a altura da concha, a partir do umbo, como um indicador do crescimento.

### 13.3 Análise de compostos orgânicos em água

As amostras de água foram coletadas em frascos de vidro âmbar de 4 L. As amostras de 4 L de água foram extraídas dentro do próprio frasco de coleta, com 30 mL de n-hexano, grau residual. As extrações foram realizadas em triplicata.

As amostras podem ser contaminadas durante a coleta e/ou processamento das mesmas, através do manuseio indevido do material utilizado ou mesmo pelo ar (aromáticos provenientes de fumaças de cigarros, combustão incompleta de combustíveis e/ou matéria orgânica). Todos os cuidados foram tomados para evitar qualquer contaminação durante as análises.

Os extratos foram guardados em frascos âmbar com batoque, a -15°C até análise em laboratório. Um esquema da extração de compostos orgânicos em água é ilustrado na figura 2.



**Figura 2** - Extração de compostos orgânicos em água.

Foi adicionado  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  como secante e o extrato foi transferido para um balão de fundo chato sendo concentrado a 900  $\mu\text{L}$  em evaporador rotativo a vácuo.

Após a concentração dos extratos foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de padrões surrogados (Fenantreno D10 e 1- $\text{C}_{12}\text{LAB}$ ) para a quantificação dos compostos. O controle de possíveis contaminações foi efetuado através de um branco de solvente (n-hexano).

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com detector de espectrometria de massas (GC/MS) 6890/5973N da Agilent Technologies para análise de FEN e ABLs.

As temperaturas do GC/MS foram de 280, 280 e 300°C no injetor, interface e fonte de íons, respectivamente. A coluna cromatográfica utilizada foi Agilent Technologies com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. O modo de aquisição foi o SIM (monitoramento seletivo de íons). A rampa de aquecimento teve início em 40°C com aumento a taxa de 20°C até 60°C e a 5°C  $\text{min}^{-1}$  até 290°C onde permaneceu por 5 minutos e aumentou a 10°C até 300°C onde se manteve constante durante 10 minutos.

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA e Fluka, Suíça. Os compostos analisados no GC/MS também foram identificados através do íon de quantificação (razão massa/carga, m/z). A quantificação foi feita por razões entre os surrogates e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 05 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

#### 13.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para obter mais nitidez na identificação das alterações, uma parcela de larvas foi examinada por MEV. As larvas foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante a noite a temperatura de 4°C (Schmidt et al., 2009). Após três lavagens no mesmo tampão, as amostras foram desidratadas em séries crescentes etanólicas, secas em ponto crítico de  $\text{CO}_2$  (EM-CPD-030, Leica, Heidelberg, Alemanha).

Posteriormente foram aderidas ao suporte de alumínio com fita de carbono dupla face, e revestidas com 20 nm de ouro, em metalizador marca Baltec, modelo CED 030. As amostras foram observadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo

Jeol (JSM) 6390LV SEM (JEOL Ltd. Tóquio, Japão) a 10 kV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

### 13.5 Espectrometria de energia dispersiva (EDS)

A análise de EDS foi utilizada para informar a composição química e fornecer a quantidade dos elementos contidos na concha. A análise foi realizada em 2 larvas por tratamento, raios-X foram emitidos e recolhidos a 10 kV a uma distância de trabalho de 15 milímetros e o tempo de aquisição para os espectros foi 30-120s. Sinais de raios-X foram apresentados como picos ou linhas no espectro de EDS. Para isso, foi utilizado o detector EDS-Thermoelectro, acoplado ao microscópio de varredura modelo Jeol 6390 LV.

### 13.6 Preparação das amostras para análises moleculares

#### 13.6.1 Extração do RNA total e síntese do cDNA

Amostras contendo um número conhecido de larvas (~70,000 larvas por amostra) foram coletadas e centrifugadas para retirada de água do mar. A extração do RNA total foi realizada de acordo com o protocolo utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen Life Technologies). A concentração e pureza do RNA foi checada no espectrofotômetro NanoDrop software ND1000 (Thermo Fisher Scientific Inc) utilizando a absorvância a 260 nm e a relação de 260/280nm, respectivamente. A transcrição reversa para síntese de cDNA a partir de 1 ug de RNA total foi realizada utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante.

#### 13.6.2 Técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os iniciadores foram desenhados a partir de sequências de genes depositados para *C. gigas* no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Análises realizadas por nosso grupo de pesquisa (TOLEDO-SILVA, 2015, comunicação pessoal), que utilizaram dados públicos do sequenciamento do genoma da espécie (ZHANG et al., 2012), nortearam a escolha dos genes-alvo considerando a transcrição gênica inferida para diferentes estágios de desenvolvimento (embrião, mórula, blástula, gástrula, trocófora, véliger, umbonada, pedivéliver e semente). Cada gene de interesse passou por uma verificação prévia *in silico*, visando

garantir uma maior taxa de sucesso na amplificação nas reações de *qPCR*.

Como critério principal, os genes candidatos deveriam apresentar evidências de expressão gênica na fase véliger (Larva-D). Desta maneira, foram escolhidos 15 genes para as análises de transcrição gênica por (*qPCR*). As seqüências gênicas escolhidas são referentes a genes envolvidos com a biotransformação (*CYP356A1*; *CYP2AU2*; *CYP30C1*; *GSTΩ-like* e *GSTπ-like*), sistema imunológico (*CG-TYR*, *CG-TIMP* e *CG-TAL*), crescimento de tecidos (*INSULIN-LIKE* e *FERRITIN-LIKE*), crescimento de concha (*CALMODULIN* e *NACREIN*) e apoptose (*CASPASE 7*). Como normalizadores foram usados *RIBOSOMAL PROTEIN L7* e *TUBULINA β*. Os pares de iniciadores foram desenhados seguindo os critérios do *site Integrated DNA Technologies (IDT)*, utilizando-se a ferramenta *PrimerQuest* (Tabela 1).

Para a realização da reação de *qPCR*, o *cDNA* foi diluído em uma concentração de 100 ng/μL e foram utilizados 8 μL de amostra por reação. A curva padrão das reações de *qPCR* foi realizada a partir de um *pool* de *cDNA* contendo uma mesma quantidade de todas as amostras expostas e controle de todos os tratamentos. A partir do *pool* de *cDNA* foi realizada uma diluição seriada.

Os níveis de transcrição gênica foram quantificados utilizando o *QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen)*. Para a reação de *qPCR* foi utilizado um volume final de 20μL, onde 10μL foi do *QuantiFast SYBR Green*, 1μL de cada iniciador (1μM) e 8μL do *cDNA* diluído (100 ng/reação), em um termociclador *ROTOR-GENE-Q (Qiagen, Alemanha)*, seguindo os parâmetros de padronização de cada gene, a fim de garantir o mínimo de variação e a alta precisão na quantificação do *qPCR*.

As condições da reação de *qPCR* foram: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, de acordo com o fabricante. O produto amplificado foi submetido à análise da curva de dissociação – *melting* (temperatura de 55°C a 95°C, aumentando a cada 1°C, dependendo da fluorescência adquirida) para a confirmação da amplificação de um único produto. A eficiência da reação de *PCR (E)* foi determinada para cada par de iniciadores, através da curva padrão de diluição seriada.

**Tabela 1** - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação de cada gene. (S: senso; A: antisenso).

Gene	Sequência dos iniciadores	Código GenBank
<i>CYP356A1</i>	S: TCACAAGTTGGTGGATACGATGTC A: CGAGATAGCGAAGTGGGTCAAA	EF645271
<i>CYP2AU2</i>	S: AGATGGGCACTCCTCTTCTTAATTC A: CATCTTTGGTTGACTTTGTCCGATTAC	EKC26764.1
<i>CYP30C1</i>	S: CTTGGTCACGCCATTCTGTTTATG A: TCAGGATTTGTAGCCAGGTTATACG	EKC28276.1
<i>GSTΩ-LIKE</i>	S: GTTTCGGCTCTAAGTGACGA A: GCTCTTGGATGAAATTGATGATGGAAC	XP_011429380.1
<i>GSTπ-LIKE</i>	S: CCAGCATTGAAGTCCTACCATTAC A: CGACCTTCTCACTCCTTCCGTTA	XP_011421103.1
<i>CG-TYR</i>	S: CCGATGTCACATTGCCGATTG A: GACCATCTCCGTTACCAAGGAA	EKC38463.1
<i>CG-TIMP</i>	S: GTATTAGCCATCATCCTCATCAGAACTT A: CAGGGTTTCCAGATCCTCAGTAG	XP_011421069.1
<i>CG-TAL</i>	S: CGTGTTGTGTCCGAGTGTATGTA A: GCTGTCGTCGCATTCTTCATC	XP_011439324.1
<i>INSULIN-LIKE</i>	S: TCGTCCATATCCTCATCACCCCTCT A: GGACCCATCGTTCGCTAACAAAGTCATAC	CAD59674.1
<i>FERRITIN-LIKE</i>	S: CAACTGAGTGATGTGGTCCGATA A: CGATTTCTTGAGACCCACTACTT	CAD92096.1
<i>CALMODULIN-LIKE</i>	S: GCTCCGAGTTAATCCAATGGC A: TCTCCTCGAGGTTGTTTCATCAC	XP_011436591
<i>NACREIN</i>	S: CGACAAGAATGCCAAACGCTATC A: GGTGAATGCGGTATCTTCAGTAAGT	XP_011426380.1
<i>CASPASE 7</i>	A: GCTGTCTGAGGTCCTGATGAA A: GGAGGTGTTAGACTGGAAGTTGT	EKC34324.1
<i>RIB. L7</i>	S: GGTTGTACTTCTTCTCCATCCACCA A: GACCCAACCTCAAGTATGCTGCCAAC	CAD89885.1
<i>TUBULINA β</i>	S: CTTCTCCCTCTTCCTCCTCAAAC A: GGGTATGGACGAGATGGAGTTTAC	AB196534.1

### 13.7 Análise estatística

Os dados relativos aos efeitos do FEN e dos ABLs sobre o desenvolvimento líquido normal, alturas das conchas e níveis de transcritos foram estatisticamente testados, para se verificar a distribuição normal (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância dos dados (Levene).

No caso de dados com distribuição normal, os parâmetros entre os diferentes tratamentos e concentrações foram comparados por análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. No caso de dados

não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas entre os grupos foram aceitas com  $p < 0,05$ .

Baseando-se nestas informações, os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD) foram apresentados em gráficos gerados no Prism 6 (GraphPad). Uma vez que o CT-FEN e CT-ABLs não demonstraram nenhuma toxicidade para o desenvolvimento larval em *C. gigas* em comparação com o controle de água do mar, optou-se por utilizar só o controle água do mar na representação gráfica em todas as análises. As análises de dados foram feitas com o programa Statistica (StatSoft, versão 10).

## 14 RESULTADOS

### 14.1 Análise dos contaminantes na água

A água destinada aos ensaios de toxicidade pode ser um interferente direto nos resultados obtidos em experimentos desta natureza; conseqüentemente, a manutenção das características físico-química é essencial para a interpretação, discussão e proposição de efeitos tóxicos. Os parâmetros físicos e químicos analisados na água se mantiveram estáveis ao longo do tempo. A salinidade média foi de  $32,5 \pm 1,1$ , a temperatura foi de  $26,2 \pm 1^\circ\text{C}$ , o oxigênio dissolvido foi de  $6,0 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e o pH foi  $7,7 \pm 0,04$ .

Na tabela 2 pode-se observar as concentrações reais medidas na água dos contaminantes utilizados no início dos experimentos.

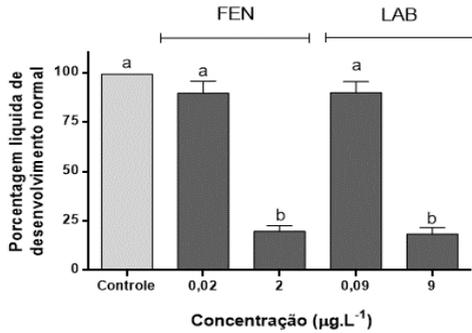
**Tabela 2** - Concentração nominal e real ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) de o FEN e ABLs nas águas de exposição dos testes de embriotóxicos em *C. gigas*.

	FEN		ABLs	
Concentração nominal	0,02	2,0	0,09	9,0
Concentração real	0,05	1,6	0,19	2,0
Controle	0,01	0,12		

### 14.2 Efeitos do FEN e ABLs sobre o desenvolvimento larval

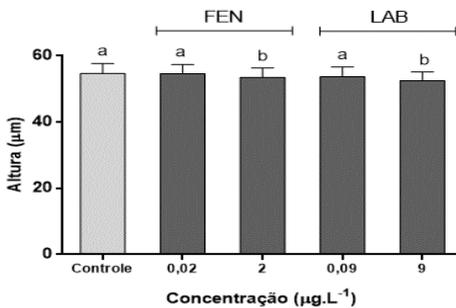
Não foram encontrados efeitos significativos sobre a taxa de larvas normais nas menores concentrações testadas em ambos tratamentos (FEN  $0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; ABLs  $0,09 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Entretanto, uma

diminuição na frequência das larvas normais foi observada nas maiores concentrações de ambos os contaminantes (Figura 3).



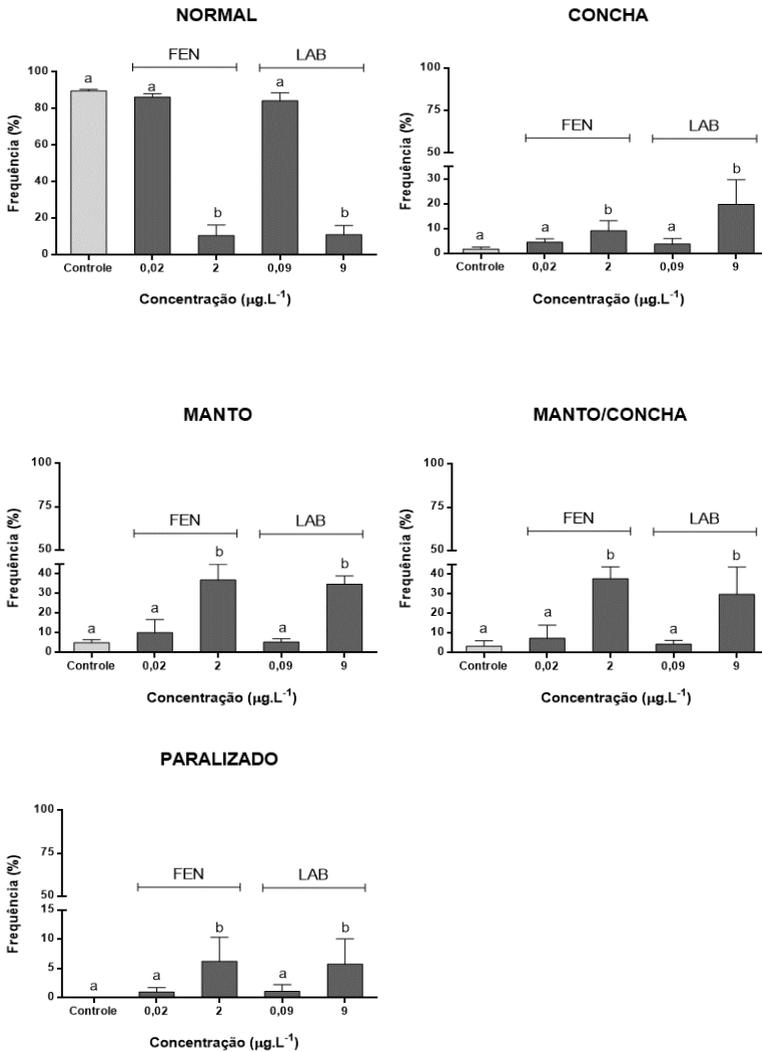
**Figura 3** - Porcentagens líquidas de desenvolvimento normal (NPNe) em *C. gigas* observado após 24h de exposição ao FEN e ABLs. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (Kruskall-Wallis,  $p < 0,05$ ; teste de Newman-Keuls).

A altura da concha das larvas expostas a FEN e ABLs está apresentada na figura 4. Comparado com o grupo controle, não foi observada diferença significativa na altura das larvas expostas a menor concentração de FEN 0,02 µg.L<sup>-1</sup> e ABLs 0,09 µg.L<sup>-1</sup>. No entanto, o crescimento larval foi levemente inibido nas maiores concentrações de exposição de ambos compostos, sugerindo um efeito de FEN e ABLs no crescimento.



**Figura 4** – Efeitos do FEN e ABLs sobre a altura de concha em *C. gigas*. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey).

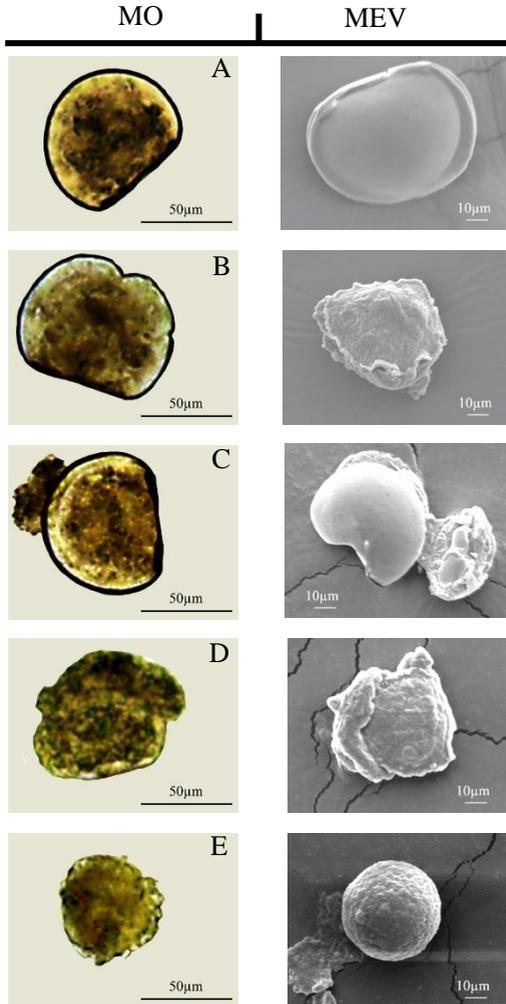
Estes contaminantes não só afetaram o crescimento larval, mas também causaram efeitos adversos sobre o desenvolvimento larval. Foi observada uma frequência maior de alterações no manto/concha ( $37,75 \pm 6,01\%$ ) (Figura 5D) e de alterações no manto ( $36,88 \pm 7,9\%$ ) (Figura 5C) nas larvas expostas a FEN  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ . As larvas expostas aos ABLs  $9 \mu\text{g.L}^{-1}$  também mostraram uma frequência alta das mesmas alterações no manto/concha ( $29,75 \pm 13,95\%$ ) e no manto ( $34 \pm 4,09\%$ ). No entanto, nas menores concentrações de FEN e ABLs não foram encontradas diferenças significativas nas frequências das alterações nas larvas, quando comparadas ao grupo controle (Figura 5B, C, D e E).



**Figura 5** - Frequências de diferentes tipos de alterações após exposição de 24h a FEN e ABLs. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey).

A fim de simplificar a avaliação de diferentes tipos de alterações que podem ser identificadas, larvas-D sem alterações possuem uma concha bivalve assimétrica em forma de D completamente formada (Figura 6A). Partindo desse critério, foram identificadas alterações em todas as concentrações testadas (Figura 6B, C, D e E).

Para obter mais informação sobre as alterações, algumas larvas foram analisadas por MEV (Figura 6). Através do aumento de 1000 vezes, foram observados diferentes graus de uniformidade nas larvas em cada tratamento, com evidentes alterações morfológicas no desenvolvimento larval causadas pela exposição aos contaminantes.



**Figura 6** - Imagens de microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostrando as alterações morfológicas em larvas de *C. gigas* após 24hs de exposição: (A) – larva-D normal, (B) – larva-D exibindo alteração na concha e/ou alteração na articulação da concha, (C) – larva-D exibindo alteração de hipertrofia de manto, (D) - exibindo alteração na concha e manto, (E) – estágio de desenvolvimento paralisado, ocorrendo atraso.

### 14.3 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A técnica de EDS foi utilizada para avaliar se o FEN e os ABLs poderiam interferir na composição de cálcio (Ca) das conchas. Os espectros foram tomados durante o processamento de imagem das larvas. A morfologia típica da concha de larva-D de ostra normal, bem como o seu espectro é mostrado no Anexo 6A e Anexo 1A e B. Um grande pico de Ca foi observado nas larvas do tratamento controle, evidenciando a grande importância do Ca na formação da concha. Estes picos foram também observados em conchas de larvas expostas a FEN 0,02  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e ABLs 0,09  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Anexo 1 C, D, E e F).

Contudo, nas maiores concentrações de exposição ao FEN 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e ABLs 9  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pequenos picos de Ca foram detectados. A tabela 2 mostra as porcentagens de Ca nas conchas expostas aos contaminantes nas respectivas concentrações (Anexo 1 E, F, I e J).

Apesar de outros elementos fazerem parte da composição da concha, como o carbono, oxigênio, silício, sódio e magnésio, entre outros, somente o Ca foi observado em todas as amostras analisadas por EDS. No entanto, ressalta-se que as análises de EDS são pontuais e seus resultados podem variar dependendo do local analisado.

**Tabela 3** - Percentual de Ca em conchas de *C. gigas*, obtido por espectros EDS.

Controle	FEN (0,02 $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	FEN (2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	ABLs (0,09 $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	ABLs (9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
42,63	48,94	10,84	28,45	3,49
43,72	27,42	1,74	33,56	1,52

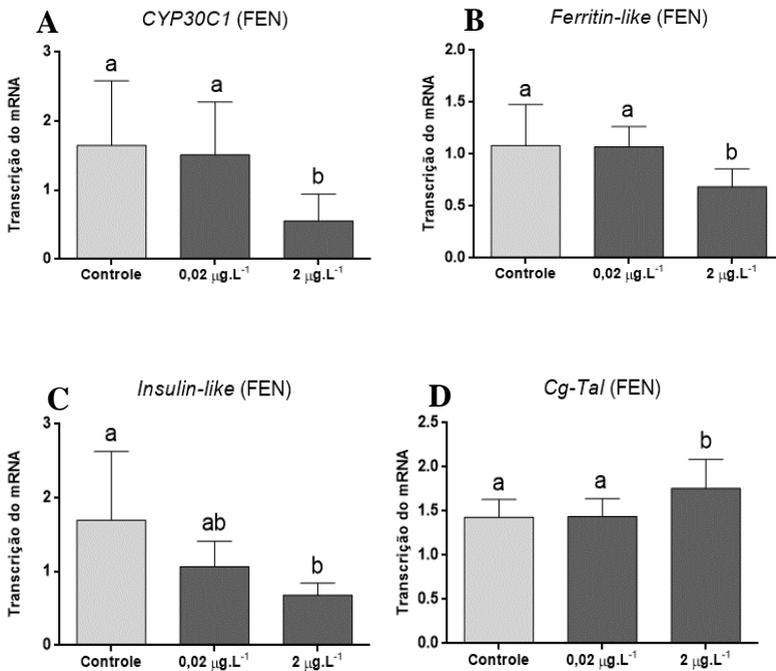
### 14.4 Efeitos do FEN e ABLs sobre a transcrição gênica

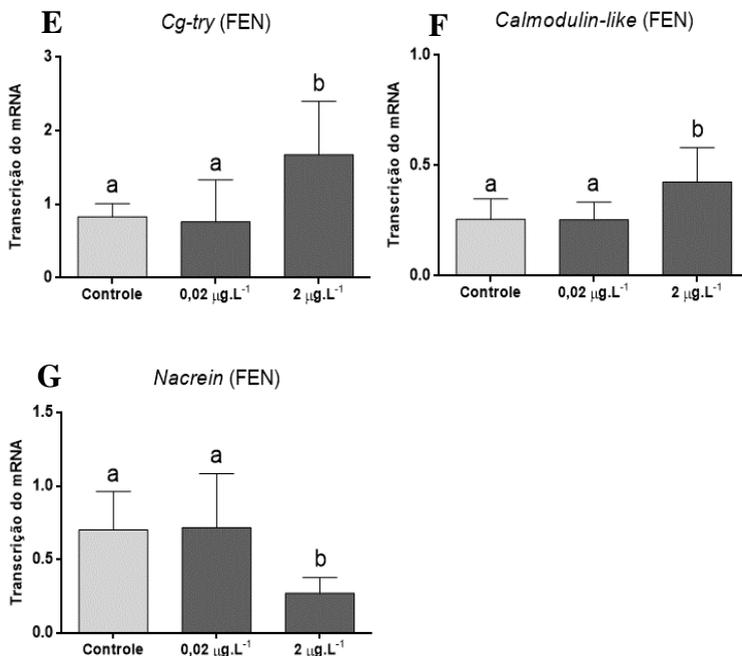
A transcrição dos genes *CYP30C1* (envolvido na biotransformação de xenobiótico) *FERRITIN-LIKE* (envolvido no desenvolvimento de tecidos e concha), *INSULIN-LIKE* e *CG-TYR* (envolvido no desenvolvimento de tecidos), *CG-TAL* (envolvido no sistema imunológico), *CALMODULIN-LIKE* (envolvido na manutenção do cálcio dentro da célula) e *NACREIN* (envolvido no crescimento de concha) foi analisada 24 h após exposição, correspondendo ao estágio do desenvolvimento larval véliger ou larva-D.

### 14.5 Efeitos do FEN na transcrição gênica

As larvas expostas ao FEN  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ , apresentaram menores níveis de transcritos dos genes *CYP30C1* (1,15 vezes), *FERRITIN-LIKE* (0,4 vezes), *INSULIN-LIKE* (1,01 vezes) e *NACREIN* (0,43 vezes) em relação ao grupo controle (Figura 7A, B, C e G).

A transcrição dos genes *CG-TAL*, *CG-TYR* e *CALMODULIN-LIKE* foi significativamente maior nas larvas expostas a mesma concentração de FEN, respectivamente 0,32, 0,84 e 0,16 vezes (Figura 7D, E e F).



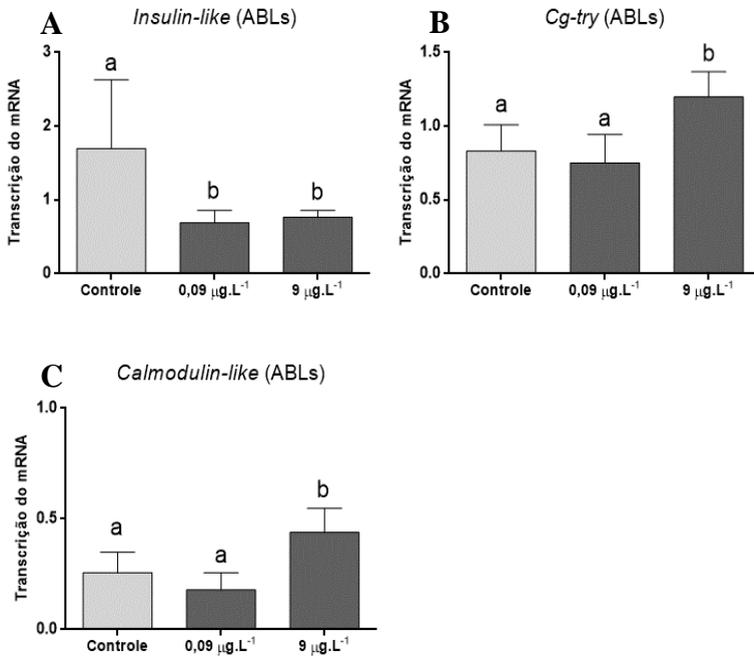


**Figura 7** - Transcrição de genes em larvas de *C. gigas* expostas a FEN. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey).

#### 14.6 Efeitos dos ABLs na transcrição gênica

Os níveis de transcrição do gene *INSULIN-LIKE* das larvas expostas aos ABLs  $0,09 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $9 \mu\text{g.L}^{-1}$  foram significativamente menores que os do grupo controle (0,92 e 1 vez, respectivamente) (Figura 8A). Os genes *CG-TYR* e *CALMODULIN-LIKE* apresentaram níveis de transcrição significativamente maiores nas larvas expostas aos ABLs  $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente de 0,36 e 0,18 vezes (Figuras 9B e 9C). Não foram observadas diferenças na transcrição dos genes *CYP30C1*, *FERRITIN-LIKE*, *CG-TAL* e *NACREIN* nas larvas expostas às duas concentrações de ABLs.

Além dos genes citados, os genes *CASP3*, *CY2AU2*, *CYPY365A1*, *GST $\Omega$* , *GST $\pi$* , e *CG-TIMP* não apresentaram diferenças significativas com relação ao controle nas concentrações utilizadas em ambos os contaminantes FEN e ABLs (dados não mostrados).



**Figura 8** - Transcrição de genes em larvas de *C. gigas* expostas aos ABLs. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ; teste de Tukey).

## 15 DISCUSSÃO

Larvas de ostras são planctônicas e passam por um período de uma a três semanas nadando na coluna d'água, quando sofrem importantes alterações morfológicas e fisiológicas (STRATHMANN, 1985). Essas alterações de desenvolvimento são frequentemente influenciadas pelas condições ambientais (BONAR et al., 1990). Alterações na abundância e sucesso no desenvolvimento neste período larval pode interferir no tamanho das ostras adultas e viabilidade das populações bentônicas (GREEN et al., 2004), induzindo, portanto, alterações significativas no funcionamento dos ecossistemas costeiros e na economia (GAZEAU et al., 2011).

Respostas das larvas aos contaminantes ambientais que são despejados em áreas costeiras podem variar.

### 15.1 Análise morfológica

A sensibilidade aos poluentes depende do tipo de organismo e a fase de desenvolvimento utilizado. Os embriões e larvas de bivalves, tais como ostras e mexilhões têm sido amplamente utilizados em testes de toxicidade, devido à sua alta sensibilidade (HIS et al., 1999). Vários estudos sobre a toxicidade de HPAs em embriões de invertebrados marinhos já foram realizados. Pelletier et al. (1997) avaliaram a ação de antraceno, fluoranteno sobre o desenvolvimento larval do bivalve bentônico *Mulinia lateralis*. Embriões de ostras *C. gigas* se mostraram sensíveis à exposição a benzo(a)pireno (LYONS et al., 2002). Bellas et al. (2008) avaliaram a toxicidade de vários HPAs para embriões de mexilhão, ouriço-do-mar e ascídias.

Diferentemente do interesse dos efeitos dos HPAs, estão os estudos sobre a toxicidade de tensoativos sintéticos (ABLs e ALS). Nas últimas décadas, não foram realizados estudos sobre a toxicidade destes compostos no desenvolvimento larval de bivalves, mesmo considerando os altos níveis encontrados dos mesmos no ambiente. Hidu (1965) foi o primeiro a estudar a toxicidade do tensoativo ALS sobre o desenvolvimento de bivalves. Outros estudos foram realizados testando este mesmo contaminante (CALABRESE; DAVIS, 1967; GRANMO, 1972; RENZONI, 1973), sendo que o último trabalho realizado foi por Hansen et al. (1997), onde observaram efeitos fisiológicos, comportamental (natação e alimentação) e morfológico (crescimento) em larvas de mexilhão *Mytilus edulis*. No primeiro estudo de exposição de moluscos marinhos aos ABLs, Flores-Nunes et al. (2015) observaram a influência deste contaminante sobre respostas bioquímicas e moleculares em ostras adultas de *C. gigas* expostas durante 36 horas.

Neste estudo, as concentrações de FEN  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  e de ABLs  $9 \mu\text{g.L}^{-1}$  mostraram alta toxicidade para embriões de *C. gigas*, embora o FEN tenha sido um pouco mais tóxico que os ABLs. Comparado com outros estudos utilizando bivalves, o FEN  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  se mostrou mais tóxico para *C. gigas*. A porcentagem de desenvolvimento normal de larvas foi de  $19,75 \pm 2,8 \%$ .

Após a exposição a  $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  de benzo(a)pyrene, Lyons et al. (2002) observaram uma porcentagem de desenvolvimento normal de larvas de *Meretrix Meretrix* ( $52.1 \pm 9.6 \%$ ). Em *C. gigas*, Jeong e Cho et al. (2005) verificaram uma porcentagem de larvas normais variando de

57,1 a 68,3 % quando expostos a 50-200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de uma mistura de dez HPAs, em comparação com o grupo de controle.

A porcentagem de larvas normais expostas aos ABLs (9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) foi de  $18,75 \pm 3,4\%$ , o que sugere uma maior toxicidade, em relação aos ALS. Alguns autores observaram que as concentrações de ALS que causaram efeitos na porcentagem de larvas normais e crescimento foram relativamente bem altas. Em *Crassostrea virginica*, Calabrese e Davis, (1967) observaram diminuição na porcentagem de larvas normais em concentrações 50-100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , em *Mytilus edulis*, Granmo (1972) observou diminuição em 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Segundo His et al. (1997), geralmente a exposição á substâncias químicas induzem tamanhos altamente heterogêneos em comparação com larvas com crescimento normal. Foi observada uma diferença significativa no tamanho da concha das larvas expostas a FEN 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e ABLs 9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , sugerindo que o crescimento larval foi sensível a exposição aos contaminantes testados, assim as larvas afetadas podem ser relacionadas a um maior predação ou dificuldade de encontrar alimentação em ambientes naturais. Normalmente, substâncias químicas primeiro afetam o comportamento larval (natação) e respostas fisiológicas (crescimento), em seguida podem levar á mortalidade (WANG et al., 2012).

Nesse estudo a utilização do MEV se mostrou um método bastante útil para analisar as alterações nas larvas de *C. gigas*, quer do material duro (concha) ou do tecido mole. Desta maneira, é possível analisar as estruturas finas da morfologia da superfície, por exemplo, padrões de crescimento da concha, com uma resolução elevada. Foi possível observar com detalhe os diferentes graus de severidade de uma mesma alteração (ex. concha), e se há letalidade, avaliando todo o desenvolvimento das larvas afetadas, permitindo uma melhor padronização dos resultados.

## 15.2 Análise EDS

Num período de 24 horas o ovo fecundado passa pelas fases de blástula, gástrula, larva trocófora móvel e larva-D (HELM; BOURNE, 2004). No estágio de larva trocófora ocorre a biomineralização da primeira concha, através de um grupo especializado de células (WEISS et al., 2002). A fase larval velígera, designada como larva-D, apresenta a primeira concha larvar, a chamada prodissoconcha I (CHRISTO; ABSHER, 2008), formada sobretudo por depósitos de carbonato de

cálcio amorfo, que são então parcialmente transformados em aragonita (WEISS et al., 2002).

A fase mineral da concha da larva-D foi analisada através do EDS, com um pico proeminente de cálcio no controle e nas menores concentrações de FEN e ABLs e menores picos nas maiores concentrações de exposição. A partir desse resultado, podemos sugerir que a mineralização da concha das larvas expostas a FEN e ABLs foi afetada causando inibição do desenvolvimento inicial das larvas de *C. gigas*.

### 15.3 Análise de transcrição gênica

A análise de transcritos auxilia na avaliação do mecanismo molecular de ação dos contaminantes e na elucidação das atividades celulares em organismos, incluindo o crescimento, o desenvolvimento e a defesa imune.

A exposição a FEN  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  diminuiu os níveis do gene *CYP30C1* que participa na biotransformação de contaminantes, que está classificado evolutivamente próximo à subfamília *CYP3* (BROWN et al., 1998). As proteínas codificadas por este gene estão envolvidas na oxidação de vários substratos, e apresentam um papel importante no metabolismo de xenobióticos (NELSON, 2009), sendo importantes na biotransformação de drogas (CHRISTEN et al., 2010; LEE; BUHLER, 2003; LI et al., 2008; TSENG et al., 2005). Diferentes isoformas dessa família foram induzidas por uma variedade de compostos, incluindo esteróides (NEBERT; WIKVALL; MILLER, 2013).

Peter et al. (1998) observaram uma inibição do *CYP3A* em *Mytilus galloprovincialis* contaminados com altos níveis de HPAs e PCBs. De acordo com Shimada et al. (2001) a resposta dos CYP3 na presença de HPAs são inferiores às enzimas da subfamília CYP1. Para uma melhor avaliação dos efeitos de contaminantes na atividade da enzima CYP3, futuros estudos são necessários.

O gene *INSULIN-LIKE* em invertebrados, assim como em vertebrados, participa de muitos processos biológicos incluindo a reprodução (GRICOURT et al., 2003). Segundo Cong et al. (2014) em *C. gigas* a família insulina está envolvida na regulação do crescimento, reprodução e no metabolismo de carboidratos. Em nosso estudo foi observada uma redução significativa da transcrição desse gene nas concentrações testadas de FEN e ABLs, exceto na concentração FEN  $0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ , sugerindo que o desenvolvimento de funções essenciais que envolvem uma variedade de tipos de células foram afetadas.

O único trabalho encontrado que analisou a transcrição do gene *INSULIN-LIKE* em larvas de bivalves foi realizado por Qin et al. (2012) para melhor compreensão sobre os mecanismos de crescimento em larvas eles observaram alguns genes relacionados ao desenvolvimento larval, em *Crassostrea angulata*, o gene *INSULIN-LIKE* participa no desenvolvimento em vários estágios larvais incluindo em larva-D. Segundo Gricourt et al. (2006) a *INSULIN-LIKE* pode regular uma variedade de efeitos biológicos envolvendo células de moluscos como: manto, glândula digestiva, gônadas e hemolinfa. Serpentine et al. (2000) observaram que a insulina estimulou a síntese de proteínas em hemócitos de *Haliotis tuberculata*.

Um gene com papel importante nos moluscos é a *FERRITIN-LIKE*. Estudos sugerem que esse gene participa da formação da concha (JACKSON et al., 2007; WANG e XIANG, 2009; HASHIMOTO et al., 2012;) e tem sido amplamente estudado em respostas imunes ao estresse (KIM et al., 2012; CHÁVEZ-MARDONES et al., 2013; ZHANG et al., 2013; SUN et al., 2014; ZHOU, et al., 2014). No entanto, os efeitos de contaminantes sobre a transcrição de *ferritina* em bivalves adultos têm sido raramente encontrados (COLLIN et al., 2010).

Huan et al. (2014) analisaram a potencial função de diferentes isoformas de *ferritina* no desenvolvimento inicial de *C. gigas*. Em larvas trocóforas e larvas-D o gene da *ferritina* (*CGI-FER2*) foi mais expresso em regiões que se encontram tecidos ciliados, sugerindo que esse gene participa da função ciliar. Em ostra *Saccostrea kegaki*, o gene (*CGI-FER1*) começou a ser transcrito no início da fase larva-D e seguiu um padrão de transcrição semelhante a atividade da fosfatase alcalina em larva-D (KAKOI et al., 2008).

No presente trabalho, uma diminuição significativa da expressão da *ferritina* foi observada após exposição a FEN 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Portanto, é razoável sugerir que ocorreu uma diminuição das células que expressam *ferritina* após exposição a FEN, consequentemente interferindo no desenvolvimento de tecidos da endoderme do sistema digestivo. Um estudo de Wang et al. (2009) mostrou que um gene da *ferritina* é expresso no sistema digestivo de larvas *Meretrix meretrix*, o que corrobora esta hipótese.

O aumento da transcrição do gene *CG-TAL* foi observado na concentração FEN 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Este resultado sugere que ocorreu a ativação da atividade hematopoiética, levando a um aumento do número de células precursoras de hemócitos (TIRAPÉ et al., 2007). O gene *CG-TAL* atua como marcador de células precursoras de hemócitos, que são as células imunocompetentes de ostra *C. gigas*, participando de uma

variedade de funções (GAGNAIRE et al., 2006). Um estudo realizado por Barreau-Roumiguière et al. (2003) confirmou que a *CG-TAL* pertence à família *Tall/SCL* (também conhecido como Stem Cell Leucemia), sendo crucial para a geração de células hematopoiéticas no início do desenvolvimento embrionário (VISVADER et al., 1998), como também em adultos (BEGLEY; GREEN, 1999).

Da mesma forma, o gene *CG-TYR* apresentou um aumento de transcrição nas larvas expostas a FEN 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e ABLs 9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Esse gene pertence à família das tirosinases (GARCÍA-BORRÓN; SOLANO, 2002). A partir do sequenciamento do genoma da *C. gigas* descobriu-se que existem pelo menos 26 isoformas de tirosinase (*CG-TYR*) (ZHANG et al., 2012) atuando na pigmentação, formação de concha e imunidade na ostra (HELLIO, et al., 2007; LUNA-ACOSTA et al., 2011; HUAN, et al., 2013).

Huan et al., (2013) clonaram um gene de tirosinase (*CGI-TYR1*) de *C. gigas* e observaram que o mesmo participa especificamente no crescimento de concha nas fases iniciais do desenvolvimento larval até a fase de larva-D (22-24 horas pós-fertilização). A partir desse estágio a transcrição não é mais detectada. Tendo em vista a hipótese de que *CG-TYR* está envolvido na formação da concha, podemos sugerir que as alterações morfológicas observadas nas larvas expostas ao FEN e ABLs estejam relacionadas aos efeitos moleculares observados.

Alterações na transcrição do gene *CALMUDULIN-LIKE* resultante da exposição a FEN 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e ABLs 9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , sugerem que o citoesqueleto das células das larvas expostas foram afetadas. O gene da calmodulina codifica uma proteína de ligação do cálcio envolvida em uma série de funções intracelulares, incluindo a regulação da atividade do citoesqueleto, alterando o particionamento do cálcio intracelular (DESRIVIÉRES et al., 2002).

Wang et al. (2010) observaram que a *calmodulina* teve sua expressão alterada em ostras *Crassostrea virginica* parasitadas com *Perkinsus marinus*. Em *C. gigas*, Renault et al. (2011) obtiveram resultado semelhante após desafio com a *Ostreid herpesvirus 1* e Taylor et al. (2015) após a exposição a metais teve o mesmo resultado. Yan et al. (2007) demonstraram que a *calmodulina* modifica a morfologia dos cristais de aragonita e calcita localizadas nas camadas da concha (prismática e nacar). Portanto o estresse pode afetar funções celulares essenciais como biomineralização (formação de concha) (LI et al., 2004).

Biomineralização é o processo complexo pelo qual os organismos vivos produzem minerais para enrijecer algum tecido

existente biologicamente controlado (LIU et al., 2011), estando presente em todas as formas de vida (ZOCOLA et al., 2009) e pode ser afetado por qualquer modificação ambiental (MEDAKOVIC et al., 1997). Conchas de moluscos adultos são compostas essencialmente por carbonato de cálcio (~95%) e uma pequena quantidade de macromoléculas orgânicas, incluindo proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos e lipídios (WEINER et al., 2003).

Em estágios iniciais de desenvolvimento de *C. gigas*, carbonato de cálcio “amorfo” é produzido durante a fase trocófora, em seguida, começa a transformar-se em cristais de aragonita na fase de larva-D até pedivéliger; durante o assentamento ocorre um decréscimo na quantidade de aragonita e um aumento da calcita até a formação final da concha em juvenis (LEE et al., 2006; SONG et al., 2014).

Até agora, vários genes relacionados com a biomineralização, foram identificados em *C. gigas* (ZHANG et al., 2012). *Nacrein*, utilizado em nosso estudo, tem a função de regular a mineralização de  $\text{CaCO}_3$  e estar especificamente envolvida na formação da camada nacrada da concha (MIYAMOTO et al., 1996). No presente estudo foi observado uma diminuição da transcrição do gene *NACREIN* em ostras expostas a FEN  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Segundo Miyamoto et al. (1996) a *NACREIN* é um gene envolvido na formação da aragonita. Assim pode-se sugerir, que houve uma interferência do FEN no metabolismo do cálcio, conseqüentemente a formação da aragonita foi afetada.

## 16 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo forneceu evidências de que o FEN e os ABLs, podem prejudicar o desenvolvimento larval da ostra *C. gigas*, causando um aumento nas deformidades e uma redução no tamanho das larvas, mesmo em concentrações muito baixas. A utilização do MEV se mostrou um método bastante útil para analisar as alterações nas larvas de *C. gigas*, mostrando características das alterações morfológicas que não podem ser observadas na MO. O presente estudo mostrou a sensibilidade de larvas de *C. gigas* aos contaminantes FEN e ABLs, relacionando as alterações morfológicas às alterações na transcrição (indução ou inibição) de genes considerados importantes associados ao desenvolvimento larval (sistema imunológico, crescimento de tecido e concha).

## 17 CONCLUSÕES GERAIS

- Pela primeira vez foi possível determinar os efeitos do FEN e dos ABLs, em baixas concentrações, sobre larvas de *C. gigas*, um dos organismos mais sensíveis e utilizados em ecotoxicologia marinha. Os ensaios de embriotoxicidade combinados com a avaliação das respostas moleculares, estabeleceram novas perspectivas de estudos mais abrangentes sobre a toxicidade do FEN e dos ABLs.
- A exposição a estes contaminantes aumentou as deformidades e reduziu o tamanho das larvas, assim, estudos devem ser realizados em termos de sobrevivência de embriões até estágios de juvenil/adulto, para confirmar se as alterações podem prejudicar o desenvolvimento até estágios mais avançados de crescimento.
- A embriotoxicidade e as alterações na transcrição de genes após exposição ao FEN e ABLs, foram confirmadas em concentrações pequenas comparadas a outros contaminantes. Estas concentrações podem ser consideradas elevadas, baseado em dados bibliográficos disponíveis dos níveis encontrados em ambientes costeiros, mas tornam-se relevantes considerando-se que são efeitos de curta duração em um estágio crucial do ciclo de vida.
- Foi mostrado que as larvas de ostras expostas a  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  de FEN e  $9 \mu\text{g.L}^{-1}$  de ABLs exibiram aumento significativo de larvas D alteradas, diminuindo significativamente o tamanho das larvas, acarretando alterações nas partes moles e duras das larvas e alterando os níveis de cálcio nas conchas, que possivelmente estão associadas às alterações observadas na transcrição de genes importantes para o desenvolvimento (ex: *CALMODULIN-LIKE*).

## 18 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFNOR, **Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieu aqueux**. XP-T90-382. AFNOR, La Plaine-Saint-Denis, France, pp. 19, 2009.

ALLEN, Standish K.; DOWNING, Sandra L.; CHEW, Kenneth K. **Hatchery manual for producing triploid oysters**. Washington Sea Grant Program, P. 27, 1988.

ALLIEGRO, Mark C.; WRIGHT, David A. Polyspermy inhibition in the oyster, *Crassostrea virginica*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 227, n. 1, p. 127-137, 1983.

BALLS, P. W. The partition of trace metals between dissolved and particulate phases in European coastal waters: a compilation of field data and comparison with laboratory studies. **Netherlands Journal of Sea Research**, v. 23, n. 1, p. 7-14, 1989.

BARREAU-ROUMIGUIÈRE, Catherine; MONTAGNANI, Caroline; ESCOUBAS, Jean-Michel. Characterization of a Tal/SCL-like transcription factor in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 27, n. 9, p. 793-800, 2003.

BARRON, Mace G. et al. Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. **Toxicological Sciences**, v. 78, n. 1, p. 60-67, 2004.

BARTOL, Ian K.; MANN, Roger; LUCKENBACH, Mark. Growth and mortality of oysters (*Crassostrea virginica*) on constructed intertidal reefs: effects of tidal height and substrate level. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 237, n. 2, p. 157-184, 1999.

BEGLEY, C. Glenn; GREEN, Anthony R. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. **Blood**, v. 93, n. 9, p. 2760-2770, 1999.

BELLAS, Juan et al. Ecotoxicological evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons using marine invertebrate embryo-larval bioassays. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, n. 6, p. 493-502, 2008.

BONAR, Dale B. et al. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. **Bulletin of Marine Science**, v. 46, n. 2, p. 484-498, 1990.

BROWN, David J.; CLARK, George C.; VAN BENEDEEN, Rebecca J. A new cytochrome P450 (CYP30) family identified in the clam, *Mercenaria mercenaria*. **Comparative Biochemistry and Physiology**

**Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 121, n. 1, p. 351-360, 1998.

BROWN, James R. Multivariate analyses of the role of environmental factors in seasonal and site-related growth variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Ecology Progress Series. Oldendorf**, v. 45, n. 3, p. 225-236, 1988.

CALABRESE, anthony; DAVIS, harry c. Effects of 'soft' detergents on embryos and larvae of the american oyster (*crassostrea virginica*). **Proceedings of the National Shellfisheries Association**. 57, 11-16. 1967.

CARLS, M. G.; MARTY, G. D.; HOSE, J. E. Synthesis of the toxicological impacts of the Exxon Valdez oil spill on Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Prince William Sound, Alaska, USA. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 59, n. 1, p. 153-172, 2002.

CARVALHAES, Ane de Lima. **Método de extrusão: alternativa para testes de toxicidade com o mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 70 f, 2001.

CHÁVEZ-MARDONES, Jacqueline et al. Concholepas concholepas Ferritin H-like subunit (CcFer): Molecular characterization and single nucleotide polymorphism associated to innate immune response. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 3, p. 910-917, 2013.

CHRISTEN, Verena et al. Identification of a CYP3A form (CYP3A126) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and characterisation of putative CYP3A enzyme activity. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 2, p. 585-595, 2010.

CHRISTO, Susete Wambier; ABSHER, Theresinha Monteiro. Crescimento da prodissoconcha de ostras do gênero *Crassostrea Sacco*, 1897 (Bivalvia, Ostreidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 1, p. 71-77, 2008.

COLLIN, Hélène et al. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental

conditions. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 23, p. 4010-4017, 2010.

CONG, Ming et al. Effects of heavy metals on the expression of a zinc-inducible metallothionein-III gene and antioxidant enzyme activities in *Crassostrea gigas*. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 7, p. 1928-1936, 2012.

CONG, Rihao et al. Association between polymorphism in the insulin receptor-related receptor gene and growth traits in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 54, p. 144-149, 2014.

DESRIVIÉRES, Sylvane et al. Calmodulin controls organization of the actin cytoskeleton via regulation of phosphatidylinositol (4, 5)-bisphosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, v. 366, p. 945-951, 2002.

DI POI, Carole et al. Toxicity of five antidepressant drugs on embryo-larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 23, p. 13302-13314, 2014.

EGANHOUSE, Robert P. Molecular markers and environmental organic geochemistry: an overview. In: **ACS Symposium Series**. 1997. p. 1-20.

FAO YEARBOOK, F. A. O. Fishery and Aquaculture Statistics. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome**, v. 219, 2014.

FISCHER, Hugo B. et al. **Mixing in Inland and Coastal Waters**. Elsevier, 2013.

FLORES-NUNES, Fabrício et al. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2015.

GAGNAIRE, Beatrice et al. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. **Cell biology and toxicology**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2006.

GALLOWAY, Tamara S. et al. A multibiomarker approach to environmental assessment. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 6, p. 1723-1731, 2004.

GALLOWAY, Tamara S. et al. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 61, n. 3, p. 169-180, 2002.

GARCÍA-BORRÓN, José C.; SOLANO, Francisco. Molecular Anatomy of Tyrosinase and its Related Proteins: Beyond the Histidine-Bound Metal Catalytic Center. **Pigment Cell Research**, v. 15, n. 3, p. 162-173, 2002.

GAZEAU, Frédéric et al. Effect of carbonate chemistry alteration on the early embryonic development of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **PLoS one**, v. 6, n. 8, p. e23010, 2011.

GEFFARD, Olivier; BUDZINSKI, Hélène; HIS, Edouard. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bioaccumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. **Ecotoxicology**, v. 11, n. 6, p. 403-416, 2002.

GRANMO, Å. Development and growth of eggs and larvae of *Mytilus edulis* exposed to a linear dodecylbenzenesulphonate, LAS. **Marine Biology**, v. 15, n. 4, p. 356-358, 1972.

GREEN, Mark A. et al. Dissolution mortality of juvenile bivalves in coastal marine deposits. **Limnology and Oceanography**, v. 49, n. 3, p. 727-734, 2004.

GRICOURT, L. et al. Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. **General and comparative endocrinology**, v. 134, n. 1, p. 44-56, 2003.

GRICOURT, L.; MATHIEU, M.; KELLNER, K. An insulin-like system involved in the control of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reproduction: hrIGF-1 effect on germinal cell proliferation and maturation associated

with expression of an homologous insulin receptor-related receptor. **Aquaculture**, v. 251, n. 1, p. 85-98, 2006.

GUIGUE, Catherine et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage effluent, continental and coastal waters from the Northwestern Mediterranean Sea: Comparison between two contrasted catchment areas (Marseilles Bay and Vermeille coast). In: **EGU General Assembly Conference Abstracts**. 2014. p. 3602.

HANSEN, B. et al. Physiological effects of the detergent linear alkylbenzene sulphonate on blue mussel larvae (*Mytilus edulis*) in laboratory and mesocosm experiments. **Marine Biology**, v. 128, n. 4, p. 627-637, 1997.

HEILMAYER, Olaf et al. Stress tolerance of a subtropical *Crassostrea virginica* population to the combined effects of temperature and salinity. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 79, n. 1, p. 179-185, 2008.

HELLIO, Claire et al. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, n. 4, p. 433-440, 2007.

HELM, Michael M.; BOURNE, Neil; LOVATELLI, Alessandro. **Hatchery culture of bivalves: a practical manual**. Food and agriculture organization of the United Nations, No. 471. Roma, FAO. 177, p 2004.

HIDU, Herbert. Effects of synthetic surfactants on the larvae of clams (*M. mercenaria*) and oysters (*C. virginica*). **Journal (Water Pollution Control Federation)**, p. 262-270, 1965.

HIS, E.; SEAMAN, M. N. L.; BEIRAS, R. A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. **Water Research**, v. 31, n. 2, p. 351-355, 1997.

HIS, Edouard et al. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. **Water research**, v. 33, n. 7, p. 1706-1718, 1999.

HUAN, Pin et al. Identification of a tyrosinase gene potentially involved in early larval shell biogenesis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Development Genes and Evolution**, v. 223, n. 6, p. 389-394, 2013.

HUGGETT, R. J. et al. Biomarkers. **Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton, FL: Lewis, 1992.

HUSSAIN, Abrar; SHAW, Peter E.; HIRST, Jonathan D. Molecular dynamics simulations and in silico peptide ligand screening of the Elk-1 ETS domain. **Journal Cheminformatics**, v. 3, p. 49, 2011.

INCARDONA, John P.; COLLIER, Tracy K.; SCHOLZ, Nathaniel L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, n. 2, p. 191-205, 2004.

JADEJA, Rajendrasinh N.; TEWARI, Akhilesh. Effect of soda ash industry effluent on bioaccumulation of metals by seaweeds of coastal region of Gujarat, India. **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 1, p. 148-154, 2007.

JEONG, Woo-Geon; CHO, Sang-Man. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on the fertilization and larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal of Shellfish Research**, v. 24, n. 1, p. 209-213, 2005.

KAKOI, Shota et al. Early development of the Japanese spiny oyster (*Saccostrea kegaki*): characterization of some genetic markers. **Zoological science**, v. 25, n. 5, p. 455-464, 2008.

KIM, Hyowon et al. Ferritin H-like subunit from Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): molecular insights as a potent player in host antibacterial defense. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 926-936, 2012.

LADHAR-CHAABOUNI, Rim; MACHREKI-AJMI, Monia; HAMZA-CHAFFAI, Amel. Use of metallothioneins as biomarkers for environmental quality assessment in the Gulf of Gabès (Tunisia). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 4, p. 2177-2192, 2012.

LAM, Paul KS; GRAY, John S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003.

LEE, Seung Woo; HONG, Seong Moo; CHOI, Cheong Song. Characteristics of calcification processes in embryos and larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Bulletin of Marine Science**, v. 78, n. 2, p. 309-317, 2006.

LEE, Su-Jun; BUHLER, Donald R. Cloning, tissue distribution, and functional studies of a new cytochrome P450 3A subfamily member, CYP3A45, from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal ceca. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 412, n. 1, p. 77-89, 2003.

LEWIS, Michael A. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. **Water Research**, v. 25, n. 1, p. 101-113, 1991.

LI, Dan et al. Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): possible implications for the establishment of a fish CYP3A induction model. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 1, p. 17-29, 2008.

LI, Shuo et al. Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 138, n. 3, p. 235-243, 2004.

LIU, Changhui; GIN, Karina YH; CHANG, Victor WC. Multi-biomarker responses in green mussels exposed to PFCs: effects at molecular, cellular, and physiological levels. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 4, p. 2785-2794, 2014.

LIU, Xiaojun et al. A new method to extract matrix proteins directly from the secretion of the mollusk mantle and the role of these proteins in shell biomineralization. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 981-991, 2011.

- LÜCHMANN, Karim H. et al. A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 324-334, 2014.
- LUNA-ACOSTA, Andrea et al. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 795-800, 2011.
- LYONS, B. P.; PASCOE, C. K.; MCFADZEN, I. R. B. Phototoxicity of pyrene and benzo [a] pyrene to embryo-larval stages of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3, p. 627-631, 2002.
- MAI, Huong et al. Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research**, v. 89, p. 1-8, 2013.
- MANOLI, E. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bulk precipitation and surface waters of Northern Greece. **Chemosphere**, v. 41, n. 12, p. 1845-1855, 2000.
- MARTINS, Cesar C. et al. Depositional history of sedimentary linear alkylbenzenes (LABs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil). **Environmental Pollution**, v. 158, n. 11, p. 3355-3364, 2010.
- MEDAKOVIĆ, D. et al. X-ray diffraction study of the first larval shell of *Ostrea edulis*. **Marine Biology**, v. 101, n. 2, p. 205-209, 1989.
- MEDEIROS, Igor Dias et al. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 156-157, 2008.
- MIYAMOTO, Hiroshi et al. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 18, p. 9657-9660, 1996.

- MOTTIER, Antoine et al. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, v. 128, p. 67-78, 2013.
- NASCIMENTO, Iracema Andrade; DE SOUSA, Eduinetty Ceci Pereira Moreira; NIPPER, Marion Grosze. **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil**. Artes Gráficas e Indústria, p.73-81, 2002.
- NEBERT, Daniel W.; WIKVALL, Kjell; MILLER, Walter L. Human cytochromes P450 in health and disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1612, p. 20120431, 2013.
- NOTCH, Emily G.; MAYER, Gregory D. Wastewater treatment effluent alters nucleotide excision repair in zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 150, n. 2, p. 307-313, 2009.
- PELLETIER, Marguerite C. et al. Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 2190-2199, 1997.
- PETERS, Laurence D.; NASCI, Cristina; LIVINGSTONE, David R. Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus* sp. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 121, n. 1, p. 361-369, 1998.
- PETROVIC, Mira et al. Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 37-46, 2002.
- PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145-1154, 2007.

QIN, Ji et al. Sequencing and de novo analysis of *Crassostrea angulata* (Fujian oyster) from 8 different developing phases using 454 GSFlx. **PLoS one**, v. 7, n. 8, p. e43653, 2012.

RENZONI, A. The influence of some detergents on the larval life of marine bivalve larvae. In: **Proceedings of the 5 th International Colloquium of Medical Oceanography**. 1973. p. 101-104.

ROBINSON, E. C.; NAIR, R. S. The genotoxic potential of linear alkylbenzene mixtures in a short-term test battery. **Toxicological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 540-548, 1992.

RODRÍGUEZ-ORTEGA, Manuel J. et al. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. **Proteomics**, v. 3, n. 8, p. 1535-1543, 2003.

SCHMIDT, Éder Carlos et al. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, v. 40, n. 8, p. 860-869, 2009.

SERPENTINI, A. et al. Collagen study and regulation of the de novo synthesis by IGF?I in hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 287, n. 4, p. 275-284, 2000.

SERRANO, Miguel AS et al. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2015.

SHIMADA, Tsutomu et al. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 9, p. 1176-1182, 2001.

SIM, C. H. et al. Management and treatment of landfill leachate by a system of constructed wetlands and ponds in Singapore. **Water Science & Technology**, v. 68, n. 5, p. 1114-1122, 2013.

- SONG, Xiaorui et al. Identification two novel nacrein-like proteins involved in the shell formation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 7, p. 4273-4278, 2014.
- SOUZA, D. S. M. et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 2, p. 153-161, 2012.
- STRATHMANN, Richard R. Feeding and nonfeeding larval development and life-history evolution in marine invertebrates. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 339-361, 1985.
- SUN, Yan et al. Identification of two secreted ferritin subunits involved in immune defense of Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 37, n. 1, p. 53-59, 2014.
- TAKADA, Hideshige; EGANHOUSE, Robert P. Molecular markers of anthropogenic waste. **Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation**, v. 5, p. 2883-2940, 1998.
- TAYLOR, Daisy A. et al. Dose-dependent effects of metals on gene expression in the sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. **Environmental Toxicology**. V. 30, p. 989-998, 2015.
- THAIN, J. E. **Biological effects of contaminants: oyster (*Crassostrea gigas*) embryo bioassay**. Copenhagen (DK): International Council for the Exploration of the Sea, 1991.
- TIRAPÉ, Ana et al. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 31, n. 9, p. 859-873, 2007.
- TORREIRO-MELO, Anny Gabrielle AG et al. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**, v. 132, p. 17-23, 2015.
- TSENG, Hua-Pin et al. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 205, n. 3, p. 247-258, 2005.

VAROTTO, Laura et al. DNA damage and transcriptional changes in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to nanomolar doses of combined metal salts (Cd, Cu, Hg). **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54602, 2013.

VÉLEZ, A.; MARTÍNEZ, R. Reproducción y desarrollo larval experimental del mejillón comestible de Venezuela *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Boletín del Instituto Oceanográfico Universidad de Oriente**, v. 6, p. 266-285, 1967.

VISVADER, Jane E.; FUJIWARA, Yuko; ORKIN, Stuart H. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. **Genes & Development**, v. 12, n. 4, p. 473-479, 1998.

WANG, Qing et al. Toxic effects of benzo [a] pyrene (Bap) and Aroclor1254 on embryogenesis, larval growth, survival and metamorphosis of the bivalve *Meretrix meretrix*. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 6, p. 1617-1624, 2012.

WANG, Shaolin et al. Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 6, p. 921-929, 2010.

WANG, Xiaomei; LIU, Baozhong; XIANG, Jianhai. Cloning, characterization and expression of ferritin subunit from clam *Meretrix meretrix* in different larval stages. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 154, n. 1, p. 12-16, 2009.

WEINER, Steve; DOVE, Patricia M. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 54, n. 1, p. 1-29, 2003.

WEISS, Ingrid Maria et al. Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, n. 5, p. 478-491, 2002.

WESSEL, Nathalie et al. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 $\alpha$ -

ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 85, n. 2, p. 133-142, 2007.

YAN, Zhenguang et al. Biomineralization: functions of calmodulin-like protein in the shell formation of pearl oyster. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1770, n. 9, p. 1338-1344, 2007.

YIN, Ying et al. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 288-293, 2007.

ZANETTE, Juliano et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196-198, 2008.

ZENG, Eddy Y. et al. Validity of using linear alkylbenzenes as markers of sewage contamination with interference from tetrapropylene-based of alkylbenzenes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 394-397, 1998.

ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49-54, 2012.

ZHANG, Yueyue et al. Identification and characterization of four ferritin subunits involved in immune defense of the Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 5, p. 1178-1187, 2013.

ZHOU, Qing et al. Toxicological responses of the hard clam *Meretrix meretrix* exposed to excess dissolved iron or challenged by *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquatic Toxicology**, v. 156, p. 240-247, 2014.

ZOCCOLA, Didier et al. Specific expression of BMP2/4 ortholog in biomineralizing tissues of corals and action on mouse BMP receptor. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 260-269, 2009.

## 19 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (INTRODUÇÃO GERAL)

ABESSA, Denis MS et al. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 875-885, 2005.

ANDREWS, J. D. Pelecypoda: Ostreidae. In: GIESE, A. C.; PEARSE, J. S. *Reproduction of Marine Invertebrates*. New York Academic Press, p. 293-341, 1979.

ANYAKORA, Chimezie et al. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, n. 1, p. 323-330, 2005.

ARFSTEN, Darryl P.; SCHAEFFER, David J.; MULVENY, Daniel C. The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 33, n. 1, p. 1-24, 1996.

BAINY, A. C. D. et al. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine environmental research**, v. 50, n. 1, p. 411-416, 2000.

BEBIANNI, Maria J.; BARREIRA, Luísa A. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussatus* transplanted in the Ria Formosa lagoon. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 7, p. 1849-1860, 2009.

BIHARI, Nevenka; FAFANDEL, Maja; PIŠKUR, Vanda. Polycyclic aromatic hydrocarbons and ecotoxicological characterization of seawater, sediment, and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Rijeka, the Adriatic Sea, Croatia. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 3, p. 379-387, 2007.

BISPO, A.; JOURDAIN, M. Jauzein; JAUZEIN, M. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Organic Geochemistry**, v. 30, n. 8, p. 947-952, 1999.

BLEEKER, E. A. J.; VERBRUGGEN, E. M. J. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. **RIVM rapport 601779002**, 2010.

BRULLE, Franck et al. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, p. 1441-1453, 2008.

CAJARAVILLE, Miren P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2, p. 295-311, 2000.

CAVRET, Séverine; FEIDT, Cyril. Intestinal metabolism of PAH: in vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. **Environmental Research**, v. 98, n. 1, p. 22-32, 2005.

CEPIS - Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. 1997. "Repindex 53: Uso de Aguas Residuales". OPAS - Organización Panamericana de la Salud (OMS - Organización Mundial de la Salud). < <http://cepis.org.pe> > (acessado: 29.09.15).

CHAPMAN, Peter M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7-15, 2002.

CHAPMAN, Robert W. et al. The transcriptomic responses of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to environmental conditions. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 7, p. 1431-1449, 2011.

CONNON, Richard et al. Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 6, p. 2181-2188, 2008.

CRAIG, R. K. Marine biodiversity, Climate change, and governance of the oceans. **Diversity**, v. 4, n. 2, p. 224-238, 2012.

DE ALMEIDA, J. L. G. et al. Linear alkylbenzene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 7, p. 675-694, 1994.

DESLOUS-PAOLI, Jean-Marc; HÉRAL, Maurice. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. **Aquatic Living Resources**, v. 1, n. 04, p. 239-249, 1988.

DELGADO, Bárbara et al. Nonionic surfactant mixtures: a new cloud-point extraction approach for the determination of PAHs in seawater using HPLC with fluorimetric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, n. 1, p. 165-172, 2004.

DIATCHENKO, Luda et al. [20] Suppression subtractive hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes. **Methods in enzymology**, v. 303, p. 349-380, 1999.

DOS REIS, Isis MM et al. Histological responses and localization of the cytochrome P450 (CYP2A1) in *Crassostrea brasiliensis* exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 79-89, 2015.

EGANHOUSE, R. P.; SHERBLUM, P. M. Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston Harbor. **Marine Environmental Research**, v. 51, n. 1, p. 51-74, 2001.

EGANHOUSE, Robert P.; BLUMFIELD, Dara L.; KAPLAN, Isaac R. Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. **Environmental Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 523-530, 1983.

EGANHOUSE, Robert P.; PONTOLILLO, James; LEIKER, T. J. Diagenetic fate of organic contaminants on the Palos Verdes Shelf, California. **Marine Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 289-315, 2000.

EISLER, Ronald et al. Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. US Fish and Wildlife Service Biological Report 85: 90. In: **US Fish and Wildlife Service, Biol. Rep.** 1987.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2012-2013. Florianópolis, 2013. 315 p. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br>>. Acesso em: 23 set. 2015

FABBRI, Rita et al. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**, v. 99, p. 1-8, 2014.

FAO. The State of the World Fisheries and Aquaculture 2012.

FAO YEARBOOK, F. A. O. Fishery and Aquaculture Statistics. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome**, v. 219, 2014.

FERREIRA, Jaime Fernando; DE OLIVEIRA NETO, Francisco Manoel; DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, Empresa. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. **Série livros 26**, p. 87, 2006.

FLORES-NUNES, Fabrício et al. Changes in protein expression of pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed in situ to urban sewage. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-13, 2014.

FLORES-NUNES, Fabrício et al. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2015.

FREIRE, Marina Moreira et al. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 2, 2008.

GIBSON, R. et al. Analysis of 4-nonylphenols, phthalates and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. **Chemosphere**, v. 61, p. 1336-1344, 2005.

GOLDBURG, R.J.; ELLIOTT, M.S.; NAYLOR, R.L. *In: Marine Aquaculture in the United States: Environmental Impacts and Policy Options*. PEW Oceans Commission: Arlington, Virginia. 2001. 44 p.

GREGG, J. C.; FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R. Effects of suspended, diesel-contaminated sediment on feeding rate in the darter

goby, *Gobionellus boleosoma* (Teleostei: Gobiidae). **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 4, p. 269-275, 1997.

HAIGH, S D, A, Review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil, **Science of the Total Environment**, v. 185, n. 1-3, p. 161–170, 1996.

HANNAM, Marie L. et al. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 779-784, 2010.

HÉRAL, M.; DESLOUS-PAOLI, J. M. Oyster culture in European countries. **Estuarine and Marine bivalve mollusk culture**, p. 154-190, 1991.

HARTMANN, Paul C. et al. Intercalibration of LABs in marine sediment SRM1941a and their application as a molecular marker in Narragansett Bay sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 5, p. 900-906, 2000.

HEIM, S. et al. Geochronology of anthropogenic pollutants in riparian wetland sediments of the Lippe River (Germany). **Organic Geochemistry**, v. 35, n. 11, p. 1409-1425, 2004.

HERKOVITS, Jorge et al. Susceptibility of early life stages of *Xenopus laevis* to cadmium. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 312-316, 1997.

HIS, E.; SEAMAN, M. N. L.; BEIRAS, R. A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. **Water Research**, v. 31, n. 2, p. 351-355, 1997.

HUTCHINSON, Thomas H.; SOLBE, John; KLOEPPER-SAMS, Pamela J. Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database III—comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 36, n. 1, p. 129-142, 1998.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Municipalities with Sewage disposal and treatment, considering Major Regions and Federation Units – 2008

<[http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/condicaoodevida/pnsb2008/defaulttabpdf\\_esgot\\_san.shtm](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/condicaoodevida/pnsb2008/defaulttabpdf_esgot_san.shtm)> (accessed 29.09.15).

ICMBIO-Unidades de Conservação. Disponível em:  
<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/unidade-deconservacao/biomas-brasileiros.html>. (Acessado: 29.09.15).

INCARDONA, John P.; COLLIER, Tracy K.; SCHOLZ, Nathaniel L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, n. 2, p. 191-205, 2004.

ISOBE, Kei O. et al. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) in riverine and coastal environments in South and Southeast Asia. **Water Research**, v. 38, n. 9, p. 2449-2459, 2004.

JEE, Jung-Hoon; KIM, Seong-Gil; KANG, Ju-Chan. Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 304, n. 1, p. 123-136, 2004.

JU, Zhenlin et al. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 1, p. 134-144, 2007.

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. London: CRC Press, 494 p, 1991.

KOIKE, Tatsuya et al. Distribution, source identification, and historical trends of organic micropollutants in coastal sediment in Jakarta Bay, Indonesia. **Journal of Hazardous Materials**, v. 217, p. 208-216, 2012.

LIANG, Peng; PARDEE, Arthur B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, n. 5072, p. 967-971, 1992.

LIBRALATO, Giovanni et al. Ecotoxicological evaluation of industrial port of Venice (Italy) sediment samples after a decontamination treatment. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 644-650, 2008.

LIMA, Ana Lúcia C.; EGLINTON, Timothy I.; REDDY, Christopher M. High-resolution record of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbon deposition during the 20th century. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 1, p. 53-61, 2003.

LINS, J. A. P. N. et al. Uso de peixes Como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Academia: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 469-484, 2010.

LISITSYN, Nikolai; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, v. 259, n. 5097, p. 946-951, 1993.

LUCHMANN, Karim H. et al. A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 324-334, 2014.

LÜCHMANN, Karim Hahn et al. Suppressive subtractive hybridization libraries prepared from the digestive gland of the oyster *Crassostrea brasiliiana* exposed to a diesel fuel water-accommodated fraction. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1249-1253, 2012.

LOTUFO, Guilherme R.; FLEEGER, John W. Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. **Marine Ecology Progress Series**, v. 151, n. 1, p. 91-102, 1997.

MARTINS, Cesar C. et al. Depositional history of sedimentary linear alkylbenzenes (LABs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil). **Environmental Pollution**, v. 158, n. 11, p. 3355-3364, 2010.

MARTINS, César C. et al. Sewage organic markers in surface sediments around the Brazilian Antarctic station: results from the 2009/10 austral summer and historical tendencies. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 12, p. 2867-2870, 2012.

MCCONKEY, Brendan J. et al. Toxicity of a PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: Effects of phenanthrene and its primary photoproduct,

phenanthrenequinone. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 892-899, 1997.

MEADOR, J. P. et al. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. In: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Springer New York, p. 79-165, 1995.

MEDEIROS, Igor Dias et al. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 156-157, 2008.

MEDEIROS, Patrícia Matheus; BICEGO, Márcia Caruso. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP-Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 9, p. 761-769, 2004.

MELO, Cláudio MR et al. *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. **Biological Invasions**, v. 12, n. 3, p. 441-449, 2010.

MOHAMMED, Azad; HALFHIDE, Trina; ELIAS-SAMLALSINGH, Najila. Comparative sensitivity of three life stages of the tropical mysid, *Metamysidopsis insularis* to six toxicants. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 91, n. 7, p. 1331-1337, 2009.

MOORE, M. N. et al. Responses of the mussel *Mytilus edulis* to copper and phenanthrene: interactive effects. **Marine Environmental Research**, v. 14, n. 1, p. 167-183, 1984.

MORAES, Antonio Carlos Robert. **Contribuições para a gestão da zona costeira do Brasil: elementos para uma geografia do litoral brasileiro**. Annablume, 2007.

MOTTIER, Antoine et al. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquatic toxicology**, v. 128, p. 67-78, 2013.

MPA, 2010. Boletim estatístico da pesca e aquicultura.

MUNGRAY, Arvind Kumar; KUMAR, Pradeep. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 981-987, 2009.

NEFF, Jerry M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. In: **Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects**. Applied Science, 1979.

NISBET, Ian CT; LAGOY, Peter K. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 16, n. 3, p. 290-300, 1992.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C A et al, Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides PAH and heavy metals in the Ecl (*Anguilla Anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France, **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 53 – 69, 2005.

O'CONNOR, T. P. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. **Marine Environmental Research**, v. 53, n. 2, p. 117-143, 2002.

PENG, X. et al. Tracing anthropogenic contamination in the Pearl River estuarine and marine environment of South China Sea using sterols and other organic molecular markers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 856-865, 2005.

PENTEADO, José Carlos P.; EL SEOUD, Omar A.; CARVALHO, Lilian RF. Linear alkylbenzene sulfonates: chemistry, environmental impact and analysis. **Quimica Nova**, v. 29, n. 5, p. 1038-1046, 2006.

PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145-1154, 2007.

POIRIER, Laurence et al. Toxicity assessment of peptaibols and contaminated sediments on *Crassostrea gigas* embryos. **Aquatic toxicology**, v. 83, n. 4, p. 254-262, 2007.

PRIETO-ÁLAMO, María-José et al. Omics methodologies: new tools in aquaculture studies. **Aquaculture. Rijeka, Croatia, InTech**, 2012.

PRÓSPERI, V.A.; NASCIMENTO, I.A. Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos e estuarinos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI,

E. **Ecotoxicologia Aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. p. 269–292.

PUC – RIO. Os hidrocarbonetos e a importância de seu estudo no ambiente. Disponível em: <[http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/9916756\\_03\\_cap\\_03.pdf](http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/9916756_03_cap_03.pdf)>. Acesso em: 09 set. 2015.

RICHARDSON, Bruce J. et al. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): do mussels “integrate” biomarker responses? **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, n. 6, p. 503-514, 2008.

SAAVEDRA, Carlos; BACHÈRE, Evelyne. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v. 256, n. 1, p. 1-14, 2006.

SAMUEL, P. R. S. Município e Esgotamento Sanitário. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL, 4., FÓRUM REGIONAL DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1. Anais... Ijuí, Ed. da Unijuí, 2004.

SCANES, Peter. ‘Oyster watch’: Monitoring trace metal and organochlorine concentrations in Sydney’s coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 33, n. 7, p. 226-238, 1996.

SCHNITZLER, J. G. et al. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and trace elements in wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) off European estuaries. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 19, p. 3680-3686, 2011.

SERRANO, Miguel AS et al. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2015.

SOLÉ, Montserrat et al. Bioaccumulation and biochemical responses in mussels exposed to the water-accommodated fraction of the Prestige fuel oil. **Scientia Marina**, v. 71, n. 2, p. 373-394, 2007.

SOUZA, D S M et al, Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 153-161, 2012.

SOUZA, Doris Sobral Marques et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 153-161, 2012.

TAKADA, H; EGANHOUSE, RP, **Molecular Markers of Anthropogenis**. Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation, New York. p. 2883 – 2940, 1998.

TAKADA, Hideshige; ISHIWATARI, Ryoshi. Linear alkylbenzenes in urban riverine environments in Tokyo: distribution, source, and behavior. **Environmental Science & Technology**, v. 21, n. 9, p. 875-883, 1987.

TAKADA, Hideshige; ISHIWATARI, Ryoshi; OGURA, Norio. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) and linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in Tokyo Bay sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 35, n. 2, p. 141-156, 1992.

TELLI-KARAKOÇ, Fatma et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) distributions in the Bay of Marmara sea: Izmit Bay. **Environmental Pollution**, v. 119, n. 3, p. 383-397, 2002.

TREMBLAY, Luc et al. Effects of lipids on the sorption of hydrophobic organic compounds on geosorbents: a case study using phenanthrene. **Chemosphere**, v. 58, n. 11, p. 1609-1620, 2005.

TSUTSUMI, Shinobu et al. Alkylbenzenes in mussels from South and South East Asian coasts as a molecular tool to assess sewage impact. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1, p. 325-331, 2002.

TUVIKENE, Arvo et al. Oil shale processing as a source of aquatic pollution: monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 9, p. 745, 1999.

- VALAVANIDIS, A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface seawater and in indigenous mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from coastal areas of the Saronikos Gulf (Greece). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 79, n. 4, p. 733-739, 2008.
- VENKATESAN, M. I. et al. Trace organic contaminants and their sources in surface sediments of Santa Monica Bay, California, USA. **Marine Environmental Research**, v. 69, n. 5, p. 350-362, 2010.
- VERBRUGGEN, Eric MJ et al. Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2436-2448, 2008.
- VIEIRA, L. R. et al. Acute effects of Benzo [a] pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Science of the Total Environment**, v. 395, n. 2, p. 87-100, 2008.
- VIKAS, M.; DWARAKISH, G. S. Coastal Pollution: A Review. **Aquatic Procedia**, v. 4, p. 381-388, 2015.
- VITOUSEK, Peter M. et al. Human domination of Earth's ecosystems. **Science**, v. 277, n. 5325, p. 494-499, 1997.
- VIVES, Ingrid et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the food web of a high mountain lake, Pyrenees, Catalonia, Spain. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 1344-1352, 2005.
- VRANA, B.; PASCHKEA, A.; POPP, P. Polyaromatic hydrocarbon concentrations and patterns in sediments and surface water of the Mansfield region, Saxony-Anhalt, Germany. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 3, p. 602-609, 2001.
- WALKER, C.H. et al. Principles of Ecotoxicology. **Taylor & Francis**, 2a ed, Londres, p.309, 2001.
- WARNE, M S; SCHIFKO, A D, Toxicity of laundry detergent components to a fresh water cladoceran and their contribution to

detergent toxicity. **Ecotoxicol Environmental Safety**, v. 44, n. 2, p. 196–206, 1999.

WHO, W. H. O. **Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation**. Geneva, 2001.

WU, Yu-Ling et al. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater from the Western Taiwan Strait, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 63, n. 5, p. 459-463, 2011.

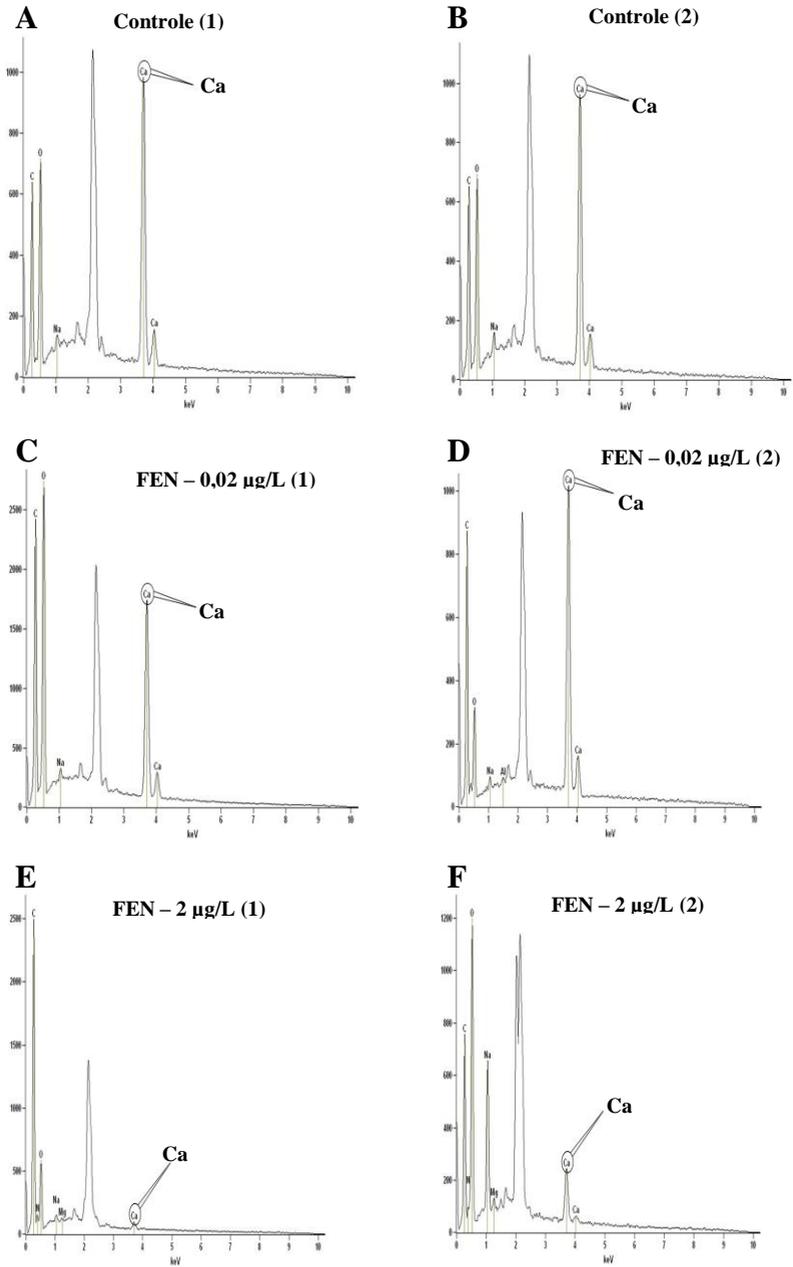
ZANETTE, Juliano et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196-198, 2008.

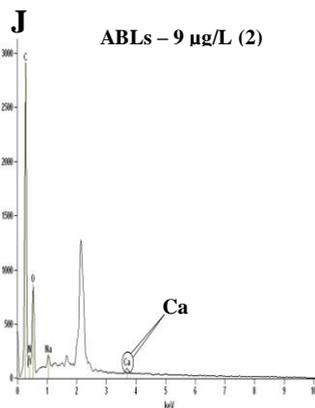
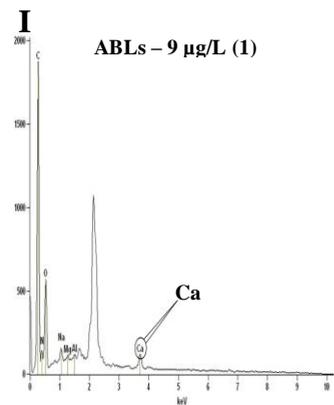
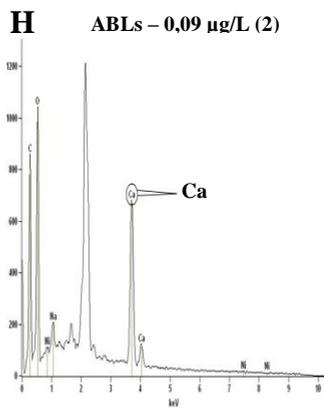
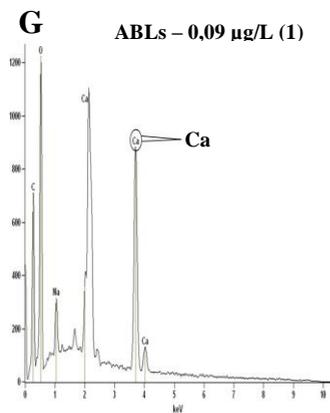
ZANETTE, Juliano et al. Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: first approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. **Marine Environmental Research**, v. 69, p. S1-S3, 2010.

ZECHMEISTER, L.; KOE, B. K. The isolation of carcinogenic and other polycyclic aromatic hydrocarbons from barnacles. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 35, n. 1, p. 1-11, 1952.

ZHANG, Guofan et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49-54, 2012.

## 20 ANEXO 1





**Anexo 1** - Espectros EDS de duas diferentes conchas de *C. gigas*. (Seta indica pico do Cálcio).