

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
AQUICULTURA**

Camila Lisarb Velasquez Bastolla

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM BRÂNQUIAS DE
OSTRAS *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) EXPOSTAS A
DOIS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS**

Florianópolis
2017

Camila Lisarb Velasquez Bastolla

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM BRÂNQUIAS DE
OSTRAS *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) EXPOSTAS A
DOIS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Curso de Engenharia de Aquicultura, Departamento de Aquicultura, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Orientador: Afonso Celso Dias Bainy, Dr.

Co-orientadora: Biol. Marília Nardelli Siebert, M.Sc.

Florianópolis
2017

Camila Lisarb Velasquez Bastolla

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM BRÂNQUIAS DE
OSTRAS *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) EXPOSTAS A
DOIS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do grau de **Bacharel em Engenharia de Aquicultura**, e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, __ de junho de 2017.

Prof. Afonso Celso Dias Bainy, Dr.
Orientador

Banca Examinadora:

Eng.º de Aquicultura Flávia Lucena Zacchi, M. Sc.
Universidade Federal de Santa Catarina

Eng.º de Aquicultura Fabrício Flores Nunes, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado
aos meus maiores amores: Mara,
Jerônimo e Herculano.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu irmão por todo incentivo, carinho e apoio incondicional nos momentos difíceis. Vocês são a minha base!

Ao meu namorado, namorado, amigo e colega de profissão, Herculano Cella, por todo carinho, paciência e apoio nos momentos difíceis (E não foram poucos!). Pela constante confiança no meu potencial, quando nem eu mesma tinha. Pelos momentos de alegria que me proporcionas diariamente...que sorte a minha! Lovi u, babyinho!! ♥

Aos meus sogros, Karim e Paulo, pelo apoio e confiança.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Centro de Ciência Agrárias (CCA) e ao Departamento de Aquicultura (AQI) pela possibilidade de realização do Curso de Engenharia de Aquicultura.

Ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, onde tive a oportunidade de adquirir novas experiências e conhecimento, sendo fundamental para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Afonso Celso Dias Bainy, pela confiança e pela oportunidade de crescimento desde a iniciação científica, monitoria e até o TCC. Muito obrigada!

À minha co-orientadora, Marília Nardelli Siebert, pelo auxílio em todo desenvolvimento deste trabalho. Grata pela orientação, pela oportunidade em poder desenvolver este trabalho, pelo tempo dedicado nas correções, pela elucidação nos momentos de dúvida e pelos puxões de orelha sempre de forma amigável e doce. Muito obrigada!

Ao meu “co-orientador de bancada”, Jacó Joaquim Mattos, por todo suporte na realização das análises enzimáticas. Tua colaboração foi essencial para realização desse trabalho! (Em meio a todo caos que é a tua rotina!). Grata por todos os momentos de auxílio neste e em outros trabalhos!

À Vera, pelo auxílio na execução das análises enzimáticas e pela paciência, diante das intermináveis repetições e dos dias sem almoço. Grata!

A Jacó J. Mattos, Fabricio F. Nunes, Guilherme T. Silva, Isis dos Reis, Clei Piazza, Barbara Othero, Barbara Righetti, Juliana Tisca, Tomas Pessati pelo auxílio nas coletas dos experimentos.

A Dra. Marcia C. Bicego, a Dra. Satie Taniguchi e ao Silvio T. Sasaki, do Laboratório de Química Orgânica Marinha do IO-USP, pelas análises de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos tecidos das ostras.

A Rita de Cassia Rodrigues e ao Emilio K. Gottschalk, do Empório do Mar Sul, pelo fornecimento das ostras.

Aos membros da banca examinadora: Fabrício Flores-Nunes e Flávia Lucena Zacchi, pela disponibilidade em participar da minha banca de TCC e pelas contribuições.

Ao Professor Evoy Zaniboni Filho, pela oportunidade de realização iniciação científica e do estágio supervisionado final no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce.

A Samara Hermes-Filho pela orientação no período em que passei no LAPAD.

Aos colegas do LABCAI que direta ou indiretamente contribuíram na minha formação e na realização deste trabalho: Jacó Mattos, Marília Siebert, Clei Piazza, Flávia Zacchi, Fabrício F. Nunes, Isis Reis, Romi Piazza, Gabrielle Muller, Miguel Saldanha, Rafael Trevisan, Álvaro Cavaler e Bárbara Othero.

As “bitchucas” Flavinha, Lila, Dê, Romix, Barbarinha e Gabi, pela amizade, pelos momentos de alegria, pelas conversas desde sempre!

A Izabela Cleusa Vieira, pela amizade ao longo da graduação e também fora dela. Pelos momentos de alegria e de preocupação com as disciplinas compartilhados.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho! Muito obrigada!

“Agradeço todas as dificuldades que encontrei, pois se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

RESUMO

A alta densidade populacional nas regiões costeiras, somada à ocupação desordenada e ao saneamento precário, exerce pressão sobre os ecossistemas aquáticos, sendo um dos problemas, a constante entrada de contaminantes nesses ambientes. Entre os contaminantes que entram no ambiente aquático, estão o petróleo e seus derivados. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são moléculas orgânicas hidrofóbicas derivadas do petróleo utilizadas em combustíveis e intermediários das indústrias, e que entram no ambiente aquático através de esgoto sanitário e lixiviação urbana ou ainda através de eventos de derramamento de petróleo e derivados. Animais expostos a HPAs apresentam alterações na atividade de enzimas do sistema de biotransformação e antioxidantes. Dessa forma, o desenvolvimento de ferramentas sensíveis à poluição é necessário para o monitoramento da qualidade ambiental nas áreas de cultivo. Nesse contexto, a ostra *Crassostrea gigas*, além ser a espécie de ostra mais cultivada no mundo, é amplamente utilizada em análises de biomonitoramento ambiental como organismo sentinela. O sistema de biotransformação metaboliza compostos lipofílicos endógenos ou xenobióticos, convertendo-os em moléculas mais hidrofílicas e, assim, facilmente excretáveis pelas células. Há poucas informações sobre a resposta da atividade enzimática em moluscos quando expostos aos hidrocarbonetos isolados. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi analisar a atividade de enzimas de biotransformação GST e GSTm, e enzimas antioxidantes e auxiliares GPx, GR, CAT e G6PDH em brânquia de ostras do pacífico, *C. gigas*, expostas aos HPAs: pireno (50 e 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$) e fluoreno (100 e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$) por 96h. Houve maior bioacumulação de pireno nos tecidos (=49,66 e 93,34 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco nos animais expostos a 50 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$, respectivamente) em comparação ao fluoreno (= 29,53 e 39,07 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco nos animais expostos a 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$, respectivamente). Nos grupos controle e no tempo zero (T0), a concentração de pireno e fluoreno foi inferior a 1 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco em todos os tempos e tratamentos. Não foram observadas alterações significativas nas atividades enzimáticas entre os grupos, com exceção da atividade de GSTm, maior atividade nas

brânquias de ostras expostas a 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de pireno em relação ao grupo exposto a 50 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e ao grupo controle. A exposição aos HPAs pireno e fluoreno não alterou a atividade das enzimas antioxidantes e de biotransformação em brânquias de ostras *C. gigas* nas condições experimentais do presente estudo.

Palavras-chave: biotransformação. enzimas antioxidantes. fluoreno. pireno. poluição aquática. ostra do pacífico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Distribuição dos HPAs nos ecossistemas aquáticos via deposição seca ou úmida das partículas atmosféricas no meio aquático. (B) HPAs considerados como prioritários no monitoramento de poluentes orgânicos, de acordo (EPA, 1986). Detalhe para os HPAs utilizados no estudo.24

Figura 2. Lista dos 16 hidrocarbonetos prioritários no monitoramento de poluentes orgânicos, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2001). Destaque para os HPAs utilizados no presente estudo: Pireno e Fluoreno.....286

Figura 3. Classificação taxonômica das ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793).....28

Figura 4. Principais defesas antioxidantes celulares e auxiliares: Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glicose 6-Fosfato-Desidrogenase e Glutathione S-Transferase (GST). Na figura estão representadas as principais vias de produção de ERO, no caso, ânion superóxido. São elas: CYPs, via biotransformação de contaminantes na fase I; Xantina oxidase; Mitocôndria e NADPH oxidase.33

Figura 5. Localização do cultivo de ostras onde os animais foram coletados – Baía Sul de Florianópolis - Ribeirão da Ilha.....37

Figura 6. Delineamento do experimento de exposição de ostras *C. gigas* ao pireno.38

Figura 7. A. Aclimação de ostras *C. gigas* em sistema de recirculação de água. B. Aspecto geral do Laboratório de Bioensaios durante os experimentos com aquários em caixas fechadas. C. Triplicata dos aquários com ostras. D. Caixas de madeira com filtros para vapores orgânicos. O projeto das caixas de vedação, o sistema de troca de água das unidades experimentais e de tratamento do resíduo líquido foi desenvolvido e executado pelo engenheiro de aquicultura Dr. Fabrício Flores Nunes.....40

Figura 8. Desenho esquemático com as etapas de dissecação dos tecidos, preparação das amostras e ensaios enzimáticos em espectrofotômetro (A e B) Dissecação dos animais (C) Preparação das microplacas para posterior análise enzimática em Espectrofotômetro Spectramax M5, Molecular Devices D) Microplaca de polipropileno utilizada nos ensaios enzimáticos. 44

Figura 9. Quantificação de HPAs em tecidos de ostras *C. gigas* expostas por 96h a pireno nas concentrações de 50 (P50) e 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ (P100) ou a fluoreno nas concentrações de 100 (F100) e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$ (F200) e o respectivo grupo controle (CT). T0 representa as ostras coletadas no início dos experimentos. A análise foi realizada em um *pool* de seis ostras para cada grupo. 4746

Figura 10. Atividade das enzimas Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glutathione S-Transferase (GST), Glutathione S-Transferase Microsomal (GSTm), Glicose 6-Fosfato-Desidrogenase (G6PDH) e Catalase (CAT) em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a diferentes concentrações de HPAs pireno e fluoreno por 96 h. Os dados estão expressos em média desvio \pm padrão ($n=9$). As letras demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle..... 4948

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padrões de lançamento de efluentes para corpos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo, adaptado da Resolução CONAMA n° 357/05 de acordo com os 16 HPAs listados como importantes para o monitoramento de poluentes orgânicos prioritários (EPA, 1986)..... 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{g. L}^{-1}$: Micrograma por litro
°C: Graus Celsius
CAT: Catalase
CDNB: 2,4 Dicloronitrobenzeno
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
CUOOH: Hidroperóxido de Cumeno
CYP450: CitocromoP450
DCNB: 3,4 Dicloronitrobenzeno
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTT: ditioneitol
 ϵ : Coeficiente de extinção molar
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO: Espécies Reativas de Oxigênio
FAD: Fração de óleo diesel acomodada
g: Força da gravidade
g: Gramas
GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
G6PDH: Glicose 6-Fosfato-Desidrogenase
GPx: Glutaciona Peroxidase
GSH: Glutaciona Reduzida
GSSG: Glutaciona dissulfídica
GR: Glutaciona Redutase
GST: Glutaciona S-Transferase
GSTm: Glutaciona S-Transferase Microsomal
H: Horas
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
HPA: Hidrocarboneto policíclico aromático
L: Litro
mg: Miligrama
min: Minutos
mL: Mililitros
mM: Milimolar
M: molar
NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NRF2:Fator 2 relacionado ao Fator Nuclear E2 (*nuclear factor E2-related factor 2*)

p : Significância estatística

pH: Potencial hidrogeniônico

PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoreto

P_{ow} : Coeficiente de partição octanol-água

SIM: Monitoramento seletivo de íons

$SRC_{eco, water}$: Concentração que pode promover riscos a saúde dos ecossistemas e da qualidade de água

Tris-HCl: Tris(hidroximetil)aminometano-hidrocloreto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Poluição aquática por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).....	23
1.2 Pireno e Fluoreno	25
1.3 Aquicultura e a contaminação aquática	27
1.4 Biomarcadores Bioquímicos	30
1.5 Enzimas de defesa antioxidante	31
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos Específicos.....	35
3 METODOLOGIA	37
3.1 Obtenção e aclimação das ostras <i>C. gigas</i>	37
3.2 Exposição das ostras <i>C. gigas</i> ao pireno e fluoreno ...	38
3.3 Análises Químicas.....	41
3.4 Processamento das amostras	42
3.5 Determinação da concentração de proteínas	42
3.6 Ensaios de Atividade Enzimática	42
3.7 Análises Estatísticas	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Bioacumulação de HPAs nos tecidos.....	45
4.2 Biomarcadores Bioquímicos em ostras expostas aos HPAs pireno e fluoreno	47
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

*O delineamento experimental, dados de GST, GSTm e de bioacumulação de HPAs nos tecidos integram a tese da doutoranda Marília Nardelli Siebert, do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFSC, intitulada “Atividade 7-etoxi-resorufina *o*-deetilase em ostras *Crassostrea* sp. e níveis de transcritos e atividades de enzimas de biotransformação em ostras *Crassostrea gigas* expostas a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. ” (Capítulo IV: Níveis de transcritos e atividades de enzimas de biotransformação em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao pireno e fluoreno)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição aquática por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Historicamente, o desenvolvimento humano se manteve próximo a regiões costeiras e, associado à ocupação desordenada, tem sido o principal agente de degradação da qualidade ambiental. De acordo com o relatório “*World Population Prospects: The 2015 Revision*” publicado pela Organização das Nações Unidas (ONU), a população mundial atual é de 7,3 bilhões e, estima-se que deste total, mais da metade vive a menos de 100 km de distância do mar e exerce influência sobre o ambiente, contribuindo para a degradação dos ecossistemas, em especial os ecossistemas aquáticos (LARUELLE et al., 2012; ONU DESA, 2015).

Segundo Loureiro Filho (2014), a ocupação da zona costeira brasileira ocorreu por uma sucessão de eventos históricos, que possuem como objetivo utilizar os recursos naturais disponíveis em prol do desenvolvimento socioeconômico. Inicialmente, ainda no século XVI, ocorreu como consequência do processo de expansão marítima dos portugueses, seguido do desenvolvimento da indústria do turismo em meados do século XX e, atualmente, com o extrativismo de combustíveis fósseis, como o gás natural e o petróleo. O petróleo é responsável por uma parcela significativa da matriz energética brasileira e apresenta crescente demanda. Além disso, compostos derivados do petróleo são amplamente utilizados como intermediários em produtos farmacêuticos, agrícolas, produtos fotográficos, materiais lubrificantes e outras indústrias químicas (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015). Destacam-se entre os compostos derivados do petróleo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), devido ao seu potencial mutagênico e carcinogênico em sistemas biológicos (WHO, 1983).

Estudos relatam que em ecossistemas aquáticos, a distribuição de HPAs ocorre por meio do processo de deposição seca ou úmida das partículas atmosféricas emitidas sobre os

solos superficiais (Figura 1). Uma vez estabelecidos em solo, estas podem se movimentar e distribuir, via correntes, na superfície de lagos, córregos e oceanos. Além disso, lançamentos de efluentes de esgotos sanitário, escoamento rodoviário, emissões industriais e acidentes durante o transporte e produção de combustíveis fósseis contribuem com a carga de HPA disponível no ambiente aquático (DOUBEN, 2003; ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015).

Figura 1. (A) Distribuição dos HPAs nos ecossistemas aquáticos via deposição seca ou úmida das partículas atmosféricas no meio aquático. (B) HPAs considerados como prioritários no monitoramento de poluentes orgânicos, de acordo (EPA, 1986). Detalhe para os HPAs utilizados no estudo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os HPAs pertencem a uma classe de substâncias orgânicas que possuem dois ou mais anéis benzênicos e podem apresentar grupos substituintes ligados. Segundo Page e colaboradores (2000), diferentes condições físicas, como temperatura e pressão, conferem aos HPAs diferentes configurações e, conseqüentemente, graus de reatividade. HPAs derivados da combustão incompleta de matéria orgânica, sob condições de elevada temperatura e baixa pressão, em um curto tempo de formação, são considerados de origem pirogênica ou pirolítica. Enquanto, HPAs formados sob condições de baixa temperatura, em escala de tempo geológico ou decorrente da liberação de petróleo puro ou subprodutos petrolíferos são

considerados de origem petrogênica (NEFF, 1979; NEFF, 1984; DAHLE, 2003; BEYER, 2010).

Devido ao risco à saúde humana e do ambiente, os HPAs são amplamente estudados pelas áreas de saúde pública e a ecotoxicologia (WHO, 1983; NETTO et al., 2000; BEYER, 2010). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA – *Environmental Protection Agency*), também denominada EPA, estabeleceu em sua publicação *Quality Criteria for Water* (1986), 16 hidrocarbonetos prioritários no monitoramento de poluentes orgânicos (EPA, 2001) (Figura 2). Entre os HPAs listados como importantes para o monitoramento de poluentes orgânicos prioritários, fluoreno e pireno são alvos de estudos devido a sua limitada biodegradabilidade. Desta forma, a presença de pireno e fluoreno está associada a elevadas concentrações de HPAs em ambientes contaminados, o que pode colocar em risco a saúde dos ecossistemas aquáticos (TAO et al., 2010; LEVENGOOD; SCHAEFFER, 2011, ZHANG et al., 2012).

1.2 Pireno e Fluoreno

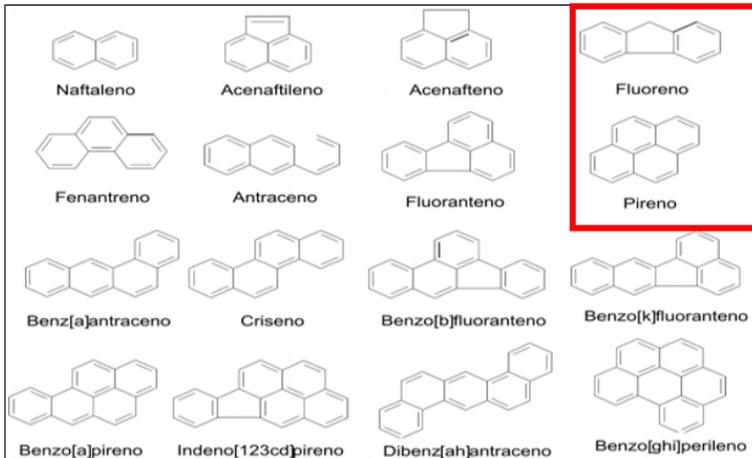
O pireno (Figura 2) é um HPA com origem pirolítica, composto por 4 anéis aromáticos, de peso molecular moderado e semi volátil. De acordo com a Agência Internacional de Estudos sobre o Câncer (WHO, 1983), o pireno não possui evidência carcinogênica determinada, entretanto, possui uma estrutura de baía, uma concavidade formada pelas ramificações na sequência do anel benzênico, que garante uma maior tendência a carcinogenicidade, decorrente do alto grau de reatividade bioquímica (JERINA et al., 1978; BAIRD, 2002). Segundo o Relatório “*Environmental risk limits for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)* ” publicado em 2012, a concentração de pireno que é passível de causar sérios riscos a qualidade dos ecossistemas ($SRC_{eco, water}$) é $4,2 \mu\text{g. L}^{-1}$ para água doce e salgada (VERBBRUGGEN, E., 2012)

O fluoreno (Figura 2) é um composto com origem petrogênica e possui 3 anéis aromáticos em sua composição. De acordo com Douben (2003), a disponibilidade de fluoreno no ambiente está relacionada com a produção de diferentes gêneros

comerciais, como a fabricação de produtos farmacêuticos, defensivos agrícolas, corantes, plástico termo-endurecido (do inglês, *thermoset plastic*). Ainda, de acordo com o Relatório “*Environmental risks limits for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)*” publicado em 2012, o $\text{SRC}_{\text{eco, water}}$ do fluoreno é estimado em $117 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ em água (VERBBRUGGEN, E., 2012).

Estudos ecotoxicológicos que avaliam o efeito de HPAs em organismos aquáticos são utilizados e apontam uma série de efeitos deletérios oriundos da exposição: alterações nas respostas bioquímicas, moleculares, histológicas, entre outras (MATTOS et al., 2010; RICHARDSON et al., 2008; LÜCHMANN et al., 2011; ZANETTE et al., 2011; XIE et al., 2017), entretanto, há uma carência na literatura de estudos que avaliem o efeito isolado dos HPAs sobre os organismos (REIS., 2014; PIAZZA et al., 2016; ZACCHI, 2017, SIEBERT, 2017).

Figura 2. Lista dos 16 hidrocarbonetos prioritários no monitoramento de poluentes orgânicos, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2001). Destaque para os HPAs utilizados no presente estudo: Pireno e Fluoreno.



Fonte: US. EPA (2001)

1.3 Aquicultura e a contaminação aquática

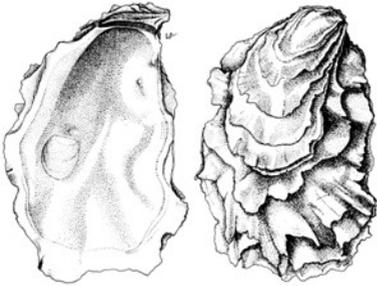
Uma das atividades afetadas pela contaminação do ambiente aquático é a aquicultura, pois depende fundamentalmente da saúde dos ecossistemas aos quais está inserida, e estes devem ser mantidos em equilíbrio para garantir a manutenção da atividade (VALENTI, 2002; IBAMA, 2003). A produção mundial de pescados oriundos do setor aquícola praticamente dobrou no período compreendido entre 2000-2013, chegando a 70 milhões de toneladas (FAO, 2014).

Considerando a expansão do setor, associado à extensão do território brasileiro, conclui-se que o país possui significativo potencial para produção de pescados através da aquicultura, quando comparado aos demais países do mundo. Desta forma, o desenvolvimento desse potencial contribuiria para o desenvolvimento do agronegócio no país (IBAMA, 2003; FAO, 2014).

De acordo com dados publicados pela EPAGRI (2014; 2015), Santa Catarina lidera o ranking nacional de produção de moluscos, representado em primeiro lugar pelo cultivo de mexilhão *Perna perna* com produção de 17.853, 1 toneladas na safra de 2015, e em segundo lugar o cultivo de ostras da espécie *Crassostrea gigas* (Figura 3) nas baías norte e sul da Grande Florianópolis, responsável por 96,87% da produção estadual de ostras cultivadas, chegando ao recorde de 3.670, 36 toneladas de ostras na safra de 2014.

Como consequência, a atividade atende, em alguns aspectos, aos três pilares da sustentabilidade: econômico, através da geração de empregos; social, ajuda a fixar as populações nativas litorâneas nessas regiões, além de complementar a renda; e ambiental, devido à manutenção dos estoques naturais e preservação dos locais onde os cultivos são implantados (FERREIRA; OLIVEIRA NETO, 2006; REIS, 2014). Entretanto, o potencial de desenvolvimento dessa atividade é susceptível a interferências negativas decorrentes do lançamento de contaminantes de origem antrópica nos ecossistemas costeiros.

Figura 3. Classificação taxonômica das ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)



Reino: Animalia
Filo: Mollusca
Classe: Bivalvia
Ordem: Ostreoida
Família: Ostreidae
Gênero: *Crassostrea*
Espécie: *Crassostrea gigas*
 (Thunberg, 1793)

Fonte: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2017). Disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en Acesso em 10/06/2017.

Segundo Sindermann (1996), bivalves respondem negativamente a contaminantes, com efeitos diretos sobre a produção, por meio da diminuição da taxa/potencial de crescimento e da resposta imune, o que favorece a baixa resistência a patógenos. Além disso, moluscos bivalves apresentam uma maior tendência em bioacumular contaminantes nos tecidos podendo representar riscos à saúde humana (PINTO, 2008).

Com o objetivo de monitorar a presença de contaminantes e a qualidade dos ambientes aquáticos, programas de biomonitoramento são amplamente utilizados. Nesses programas, a presença de contaminantes em organismos sentinelas é associada a alterações biológicas nesses organismos que possam representar algum efeito ou danos no ecossistema monitorado. Nesse contexto, moluscos bivalves são organismos utilizados como sentinelas, por serem sésseis e se alimentarem por filtração, características estas que permitem a bioconcentração de substâncias dispersas ao longo da coluna d'água, por exemplo, substâncias químicas (OLIVER et al., 2001; REIS, 2014).

No Brasil, a regulamentação quanto a concentrações limites máximas de HPAs disponíveis em corpos de água em áreas destinadas à prática da maricultura - Resolução CONAMA n° 357/05 (Tabela 1) ainda é incipiente e concentrações limites para sedimentos e a organismos aquáticos são inexistentes (CONAMA, 2005; PAVEI, 2007). Entretanto, existem regulamentações que indicam o monitoramento ambiental de HPAs em atividades potencialmente poluidoras. A Resolução n° 393/07 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, por exemplo, estabelece como dever das empresas operadoras de plataformas petrolíferas o monitoramento semestral da água produzida e descartada para fins de identificação da presença e concentração de HPA, e prevê avaliação de toxicidade crônica da água produzida em organismos aquáticos, através de métodos ecotoxicológicos padronizados com organismos marinhos (CONAMA, 2005).

Tabela 1. Padrões de lançamento de efluentes para corpos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo, adaptado da Resolução CONAMA n° 357/05 para os 16 HPAs listados como importantes para o monitoramento de poluentes orgânicos prioritários (EPA, 1986)

Parâmetros Orgânicos	Valor Máximo Permitido		
	Doce	Salobra	Salina
Benzo(a)antraceno			
Benzo(a)pireno			
Benzo(b)fluoranteno			
Benzo(k)fluoranteno		0,00018 gL ⁻¹	
Criseno			
Dibenzo (a,h)antraceno			
Indeno(1,2,3-cd)pireno			

1.4 Biomarcadores Bioquímicos

De acordo com a definição proposta por Walker e colaboradores (2016), biomarcador é qualquer resposta biológica, resultante da exposição a químicos ambientais, que demonstre alterações do estado normal ou basal do indivíduo ou organismo. Nesse contexto, os parâmetros bioquímicos, fisiológicos, morfológicos, histológicos e comportamentais podem ser utilizados como biomarcadores. Dentre os parâmetros bioquímicos, as enzimas antioxidantes são comumente propostas como biomarcadores de contaminação em invertebrados, pois atuam prevenindo o ataque pró-oxidante de espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas em uma taxa mais elevada durante a biotransformação de alguns compostos orgânicos (REGOLI et al., 2002; LEI et al., 2015).

ERO podem ser produzidas pelos organismos vivos tanto sob condições fisiológicas basais, como no transporte de elétrons, reações enzimáticas e reações de oxidação, ou ainda em situações de estresse, como na presença de químicos ambientais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). São classificadas em dois grupos: os radicais livres - aqueles que possuem um ou mais elétrons não pareados e apresentam maior reatividade, com potencial de causar danos celulares: radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila (OH^{\cdot}); e os não-radicais - quando dois radicais livres compartilham seus elétrons não pareados, com destaque para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; BIRBEN et al., 2012).

De acordo com a definição proposta por Sies (1993), estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, que podem provocar interrupção da sinalização e controle redox, incluindo danos a diferentes biomoléculas, como: DNA, lipídios, proteínas e carboidratos. Evolutivamente, os organismos vivos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, que podem atuar de três formas na proteção celular contra ERO: prevenção da formação, inativação das reações oxidativas ou reparo do dano causado (SIES, 1993; SIES, 2015). Diversos estudos indicam que o aumento na produção de ERO pode estar relacionado com a presença de determinados contaminantes ambientais, uma vez que o sistema de biotransformação de compostos orgânicos, como quinonas e

HPAs, pode promover um aumento na expressão e atividade das enzimas antioxidantes (REGOLI et al., 2002; AKCHA et al., 2003; PATRI; PADMINI; BABU, 2010).

Dificuldades na detecção da atividade das enzimas envolvidas na biotransformação, associadas a elevada capacidade de bioacumulação de contaminantes, em especial orgânicos, trouxeram incertezas a respeito da capacidade de metabolização de contaminantes em moluscos (LEE; SAUERHEBER; BENSON, 1972). Entretanto, alguns trabalhos sugerem que estes animais possuem um sistema de metabolização relativamente eficiente (McELROY; LEITCH; FAY, 2000), devido à bioconcentração de HPAs encontrada em tecidos de moluscos provenientes da exposição a locais poluídos (RAMDINE et al., 2012; GIRÓN-PÉREZ et al., 2013), e à detecção das atividades das enzimas de superfamília CYP e das enzimas UDPGT e GST e de enzimas antioxidantes (SCHLENK; BUHLER, 1989; LIVINGSTONE, 1998; ORBEA et al., 2002; SOLE; LIVINGSTONE, 2005; LUCHMANN et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2015), que indicam a existência de um sistema de biotransformação atuante nesses organismos.

1.5 Enzimas de defesa antioxidante

A análise da atividade de enzimas do sistema antioxidante (Figura 4) e de biotransformação tem sido amplamente utilizada em programas de monitoramento ambiental, com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes contaminantes nos organismos. Entre elas, destacam-se as enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR) e Glicose-6- Fosfato Desidrogenase (G6PDH) e também as enzimas de biotransformação da fase II, Glutaciona-S-Transferases (GST) (BRAY; LEVY, 2000).

Encontradas no citosol e na mitocôndria, a SOD pertence a um grupo de metaloenzimas que agem contra a ação de ânions superóxido, devido a conversão de O_2^- em H_2O_2 . A decomposição de H_2O_2 é catalisada por duas enzimas, CAT e GPx. A CAT, encontrada principalmente nos peroxissomos, realiza a conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular. GPx também possui atividade peroxidase, em especial sobre

peróxidos de hidrogênio e orgânicos. Entretanto, sua capacidade antioxidante é dependente da utilização de elétrons do tripeptídeo glutationa (GSH), devido ao grupamento tiol (SH) reativo presente na cisteína (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; REISCHL et al., 2007; TREVISAN, 2008).

A manutenção no balanço de glutationa no meio celular é realizada pela GR. Ao transformar glutationa dissulfídica (GSSG) em glutationa reduzida (GSH), ocorre oxidação de NADPH em NADP⁺ pela enzima (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Diretamente relacionado à manutenção da função antioxidante da glutationa, a G6PDH atua como uma enzima antioxidante coadjuvante, fornecendo intermediários redutores (NADPH) para regeneração de GSH a partir de GSSG pela GR, de forma que se houver um desbalanço de glutationa, o meio celular pode ser comprometido, provocando sérios danos ao metabolismo celular (SLEKAR, KOSMAN; CULOTTA, 1996; TREVISAN, 2008).

A conjugação de contaminantes eletrofilicos a GSH no sistema de biotransformação de fase II, realizada pela GST, confere menor toxicidade e caráter mais hidrofílico aos contaminantes, de forma que a eliminação do contaminante para o meio extracelular se torna facilitada (STEGEMAN; LECH, 1991). A diversidade de classes e polimorfismos das GSTs conferem diferentes formas de atuação durante o processo de biotransformação de contaminantes. Elas são subdivididas nas classes: citosólicas - isoformas: alfa, mu, pi, sigma, theta, zeta e ômega; mitocondriais: Kappa; ou ainda associadas a proteínas de membrana, as isoformas microsossomais: subgrupos I, II e IV. (HOARAU et al., 2001; HAYES, FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

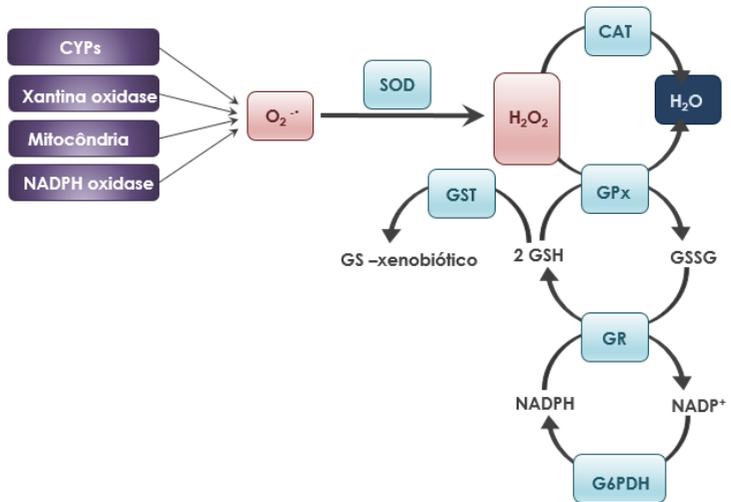
A regulação das enzimas antioxidantes e de biotransformação em animais está relacionada ao Fator 2 relacionado ao Fator Nuclear E2 (NRF2) que atua diretamente na regulação da transcrição de genes com o elemento de resposta antioxidante e o elemento de resposta eletrofílica, que podem promover um aumento ou redução na capacidade de biotransformação e antioxidante dos animais frente a ERO através da regulação nas taxas de transcrição de genes envolvidos nesses processos, como por exemplo a CAT, SOD mitocondrial e tiorredoxina redutase 1 (YIN et al., 2016; DANIELLI et al., 2017).

Estudos relatam que em moluscos bivalves a regulação das enzimas de biotransformação e de defesa antioxidantes estão

relacionadas ao NRF2 (TREVISAN et al., 2014; DANIELLI et al., 2017).

Nesse contexto, técnicas que evidenciam respostas em níveis mais simples de organização biológica podem ser mais preventivas em um contexto de monitoramento ambiental, pois podem indicar precocemente o estabelecimento de uma perturbação ambiental que poderá afetar níveis superiores de organização biológica, com o estabelecimento de respostas irreversíveis. (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Figura 4. Principais enzimas antioxidantes celulares e auxiliares: Catalase (CAT), Glutationa Peroxidase (GPx), Glutationa Redutase (GR), Glicose 6-Fosfato-Desidrogenase e Glutationa S-Transferase (GST). Na figura estão representadas as principais vias de produção de ERO, no caso, ânion superóxido. São elas: CYPs, via biotransformação de contaminantes na fase I; Xantina oxidase; Mitocôndria e NADPH oxidase.



Fonte: Elaborado pela autora

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas aos HPAs pireno e fluoreno.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar a atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx, GST, GSTm e enzimas auxiliares GR e G6PDH em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 50 e 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de pireno por 96h;
- b) Analisar a atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx, GST, GSTm e enzimas auxiliares GR e G6PDH em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 100 e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de fluoreno 96h;
- c) Avaliar a concentração dos HPAs pireno e fluoreno nos tecidos das ostras, a fim de verificar a bioconcentração.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção e aclimação das ostras *C. gigas*

Ostras da espécie *Crassostrea gigas* com comprimento total $10,0 \text{ cm} \pm 1,8 \text{ cm}$ foram obtidas em um cultivo de ostras (Figura 5) localizado no Ribeirão da Ilha – Florianópolis/SC, e transportadas até o Laboratório de Bioensaios do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI/UFSC).

No laboratório, os animais foram distribuídos em tanques de 150 L, em um sistema de recirculação de água com volume total de 1000 L e aclimatados durante 7 dias nas seguintes condições: salinidade inicial de 25, temperatura de 20° C , pH $7,8 \pm 0,1$, amônia de 0 a $0,25 \text{ mg/L}$, fotoperíodo 12:12. A alimentação foi realizada a cada 36 h com ração comercial Phyto B- Plus, em uma proporção de $200 \cdot 10^6$ células por ostra constituída por um mix de microalgas marinhas (*Nitzschia closterilum*, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella* sp.) com duração de 2 h. A manutenção da rotina de alimentação a cada 36 h permitiu que os animais permanecessem 24 h de jejum antes da dissecação.

Figura 5. Localização do cultivo de ostras onde os animais foram coletados – Baía Sul de Florianópolis - Ribeirão da Ilha.

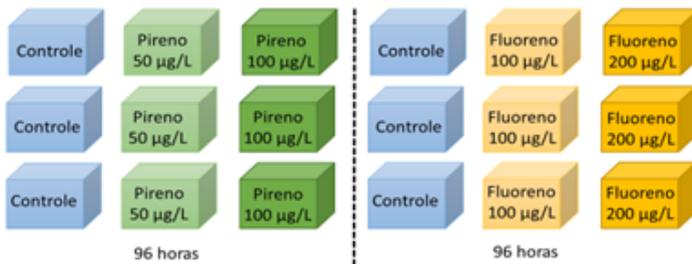


3.2 Exposição das ostras *C. gigas* ao pireno e fluoreno

O experimento de exposição de *C. gigas* aos HPAs pireno e fluoreno integra a tese de doutorado da MSc Marília Nardelli Siebert, do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina (SIEBERT, 2017) e foi realizado na sala de Bioensaios do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (Cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA: BIO067).

Ao final do período de aclimatação, os animais foram expostos ao pireno (Aldrich 185515, 98% de pureza) ou ao fluoreno (Aldrich 128333, 98% de pureza). Os animais foram distribuídos em 9 aquários de vidro com volume total de 18 L (Figura 6), com 6 animais por aquário (3 L/ostra) expostas por 96 horas a pireno, nas concentrações de 50 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e fluoreno a 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$, ambos utilizando Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma D4540, >99,5% de pureza) como solvente. Cada tratamento foi realizado em triplicata, e utilizou como grupo controle a mesma concentração do solvente (DMSO 0,002%).

Figura 6. Delineamento do experimento de exposição de ostras *C. gigas* ao pireno e fluoreno.



Fonte: SIEBERT, M. N. (2017)

Foi adotada a renovação total da água dos aquários (água do mar (3 L/ostra), sem adição de contaminantes para alimentação dos animais. Após o período de alimentação (2 h), a água contendo ração comercial foi removida e uma nova renovação total de água foi realizada em cada aquário, adicionando as respectivas concentrações dos contaminantes.

Os aquários referentes a cada tratamento foram mantidos dentro de caixas de madeira hermeticamente fechadas contendo filtros para vapores orgânicos a fim de diminuir a possibilidade de contaminação cruzada entre diferentes tratamentos e a contaminação do ar (Figura 7). A aeração foi mantida constante durante o período de exposição, com fonte de ar externa ao local de exposição.

Ao final de 96 h de exposição, os animais tiveram suas brânquias e glândula digestiva dissecadas, aproximadamente 400 mg de tecido, e imediatamente processados para as análises enzimáticas (Figura 8). Ao final do período de experimento, os resíduos líquidos resultantes foram submetidos a filtração passando por carvão ativado para posterior descarte.

Figura 7. **A.** Aclimação de ostras *C. gigas* em sistema de recirculação de água. **B.** Aspecto geral do Laboratório de Bioensaios durante os experimentos com aquários em caixas fechadas. **C.** Triplicata dos aquários com ostras. **D.** Caixas de madeira com filtros para vapores orgânicos. O projeto das caixas de vedação, o sistema de troca de água das unidades experimentais e de tratamento do resíduo líquido foi desenvolvido e executado pelo Engenheiro de Aquicultura Dr. Fabrício Flores Nunes.



Fonte: SIEBERT, M. N. (2017)

3.3 Análises Químicas

A quantificação dos HPAs foi realizada em *pool* de tecidos moles de seis animais de cada tratamento após 24 h e 96 h de exposição e em um *pool* de seis animais coletados imediatamente antes do início de cada experimento.

As ostras foram homogeneizadas e processadas segundo MacLeod et al. (1986), com pequenas modificações. As amostras foram extraídas a partir de um grama de tecidos de ostras liofilizados (liofilizador Thermo Savant, Módulo D, Waltham) com n-hexano e diclorometano 50% (v/v) utilizando o aparelho Soxhlet durante 8 h. Antes da extração, foram adicionados os padrões internos: naftaleno-d₈, acenaftaleno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂ (5 ng μ. L⁻¹) a todas as amostras, brancos e referência (SRM 2974a – Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue – *Mytilus edulis*).

O extrato evaporado foi purificado em coluna de cromatografia de sílica (contendo 8 g de sílica gel sobre 16 g de alumina) e eluído em uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). O eluato foi concentrado e o padrão p-terfenil (5 ng.μ.L⁻¹) foi adicionado. A determinação dos HPAs dos tecidos das ostras foi efetuada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com modo de aquisição SIM (monitoramento seletivo de íons). A identificação de fluoreno e pireno foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard (New Haven, EUA) e Fluka (St Louis, EUA).

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 padrões internos e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 5 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

A quantificação de HPAs foi realizada no Laboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, sob a coordenação da Profa. Dra. Márcia Caruso Bicego.

3.4 Processamento das amostras

As amostras de brânquias de ostras expostas aos HPAs foram pesadas (100 mg de tecido) e homogeneizadas em cinco vezes o volume de tampão de homogeneização (TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,4, contendo sacarose 0,5 M; KCl 0,15 M; DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM). Após, foram submetidas à centrifugação a 9.000 g a 4°C por 30 min. O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi removido e submetido a uma nova centrifugação a 100.000 g a 4°C por 90 min. O sobrenadante resultante, correspondente à fração citosólica, foi separado em alíquotas e congelado a -80°C para ensaios das atividades enzimáticas. A fração microsomal resultante foi lavada em tampão de homogeneização sem DTT e PMSF e submetida à ultracentrifugação a 100.000 g por 20 min a 4°C. A fração microsomal resultante foi ressuspendida em tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,4, contendo KCl 0,15 M e Glicerol 20%, congelada a -80°C e utilizada para a análise da atividade da GST microsomal (GSTm).

3.5 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas totais presentes na fração citosólica e microsomal foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976) baseada na absorção do reagente Comassie Brilliant Blue G-250, utilizando albumina de soro bovino como padrão. O ensaio foi realizado em microplaca e os dados gerados nessa análise foram utilizados para o cálculo de atividade específica de cada enzima.

3.6 Ensaios de Atividade Enzimática

A atividade da CAT foi verificada de acordo com a metodologia proposta por Beutler (1975), com base na degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ($\epsilon = 0,0436 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) em água e oxigênio molecular. O ensaio foi realizado em microplaca da marca Greiner, modelo UV-Star e medido a 240 nm por 90 segundos a 25 °C. O ensaio utilizou meio de reação composto por tampão para CAT (Tris 1M e EDTA 5 mM), H_2O_2 10,4 mM.

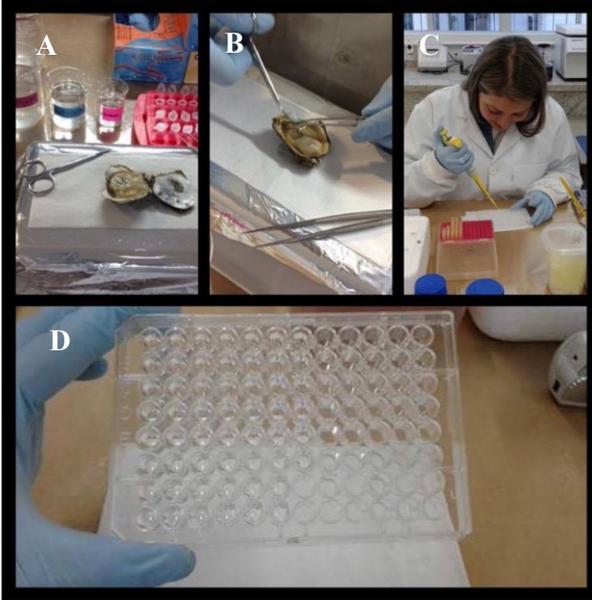
A metodologia descrita por Glock e McClean (1953) para detecção da atividade da G6PDH foi utilizada neste trabalho, em que a atividade é expressa em função do aumento na absorbância de 340 nm, decorrente da redução de NADP^+ a NADPH ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O ensaio utilizou meio de reação composto por tampão Tris HCl 0,1 M pH 7,4, MgCl_2 0,2 M, NADP^+ 0,2 mM, G6P registrado durante 5 minutos a 25 °C.

De acordo com Keen (1976), as atividades de GST total e microsomal (GSTm) foram detectadas através da reação de conjugação promovida pelo substrato CDNB (1-cloro-2,4 dinitrobenzeno, 10 mM) que promove um aumento na absorbância de 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) registrado por 5 minutos, a 25 °C. O meio de reação continha tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, EDTA 1 mM e GSH 0,1 mM.

Ao reduzir glutatona dissulfídica, é possível detectar a atividade da GR pelo decréscimo na absorbância de NADPH, a 340 nm por 5 min a 25 °C, conforme a metodologia descrita por Calberg e Mannervik (1985). O meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, EDTA 5 mM pH 7,0, GSSG 2 mM, GSH 0,15 mM e NADPH 0,1 mM.

A atividade da GPx foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Wendel (1981), onde a oxidação do NADPH ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), decorrente da redução do substrato Hidroperóxido de cumeno (Cu-OOH), foi monitorada a 340 nm por 5 min, a 25 °C. O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, EDTA 5mM pH 7,0, NADPH 0,2mM, GR 0,2 U. ml^{-1} e GSH 0,1 M.

Figura 8. Procedimentos de laboratório. **A e B.** Dissecção dos animais. **C.** Preparação das microplacas para posterior análise enzimática em Espectrofotômetro Spectramax M5, Molecular Devices. **D.** Microplaca de polipropileno utilizada nos ensaios enzimáticos.



Fonte: Imagens cedidas por Flávia Lucena Zacchi em 2014. Acervo pessoal.

3.7 Análises Estatísticas

Os dados de atividade enzimática foram analisados estatisticamente quanto à presença de outliers, normalidade e homocedasticidade (Teste de Grubbs, D'Agostini e Bartlett, respectivamente). Foi utilizado o teste paramétrico One-Way ANOVA (5%), seguido de pós-teste de Tukey (5%). Para apresentação dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0*. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão

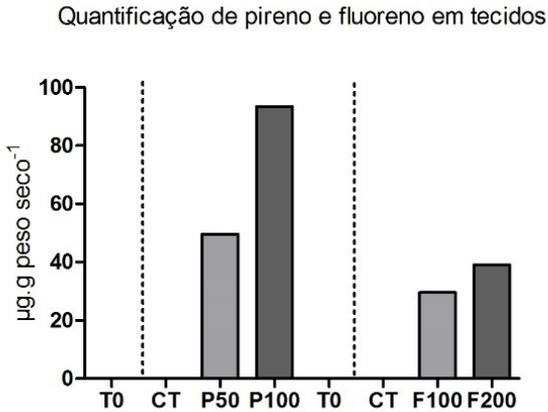
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bioacumulação de HPAs nos tecidos

De acordo com Zanette (2009), a natureza lipofílica dos compostos químicos de origem orgânica, por exemplo, compostos derivados do petróleo, favorece a absorção destes via membranas lipídicas dos tecidos expostos e a metabolização destes compostos será dependente da sua estrutura e interação com proteínas sinalizadoras ou enzimas dos sistemas de biotransformação. Moluscos bivalves apresentam uma tendência à bioacumulação de contaminantes decorrente de características intrínsecas ao grupo: sésseis e alimentação via filtração (LIVINGSTONE, 1998; GOSLING, 2003; BUSTAMANTE et al., 2012).

Ostras da espécie *C. gigas* foram expostas a pireno nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e de fluoreno, nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$ por 96 h com o objetivo de analisar a atividade das enzimas antioxidantes e de biotransformação frente a exposição nesses organismos. A concentração de pireno nos tecidos foi 49,66 e 93,34 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de tecido seco nos animais expostos a 50 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$, respectivamente (Figura 9), enquanto que a concentração de fluoreno nos tecidos foi de 29,53 e 39,07 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de tecido seco nos animais expostos a 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$, respectivamente (Figura 9). Nos grupos controle e no tempo zero (T0) a concentração de pireno e fluoreno foi inferior a 1 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de tecido seco nos animais dos diferentes períodos de exposição e tratamento.

Figura 9. Quantificação de HPAs em tecidos de ostras *C. gigas* expostas por 96h a pireno nas concentrações de 50 (P50) e 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ (P100) ou e a fluoreno nas concentrações de 100 (F100) e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$ (F200) e o respectivos grupos controles (CT). T0 representa as ostras coletadas no início dos experimentos. A análise foi realizada em um *pool* de seis ostras para cada grupo.



Fonte: SIEBERT, M. N. (2017).

De acordo com Librando, Sarpietro e Castelli (2003), a interação entre os HPAs e as membranas é favorecida quando estes contaminantes são dissolvidos em solventes orgânicos, ou seja, permite a interação desses com as membranas biológicas através de difusão passiva, e conseqüentemente possibilita uma maior bioconcentração. Nesse contexto, parâmetros que quantifiquem a permeabilidade das membranas biológicas quando expostas aos HPAs permite uma avaliação do potencial de bioacumulação do contaminante e, desta forma, estabelecer uma relação destes dados com as respostas bioquímicas apresentadas.

A permeabilidade das membranas pode ser mensurada através das suas propriedades físicas químicas, como a lipofilicidade (SCHNEIDER, 2011). A lipofilicidade pode ser

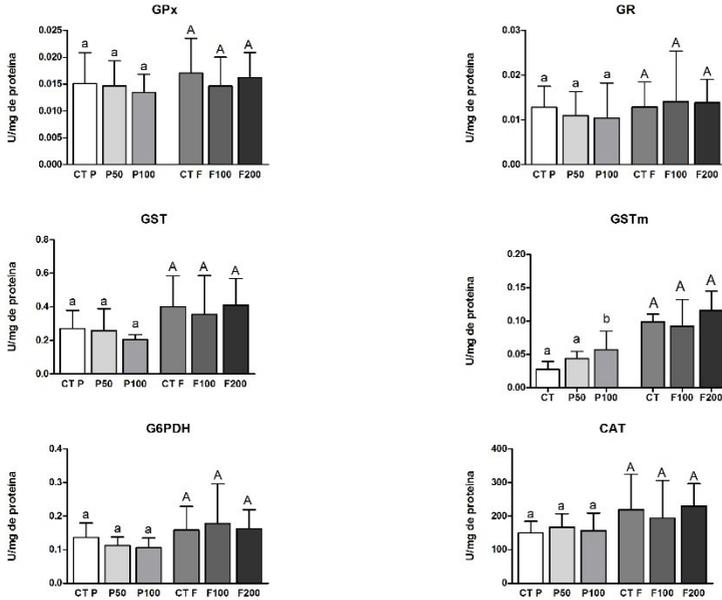
quantificada pelo coeficiente de partição octanol-água, que pode ser definido como a relação de solubilidade de um composto nos meios hidrofóbicos, como as membranas celulares e aquosas ($\text{Log partição} = \text{Log soluto}_{\text{octanol}} - \text{Log soluto}_{\text{água}}$). Nesse contexto, o pireno apresenta uma maior tendência em interagir com as membranas biológicas dos tecidos expostos, devido ao maior coeficiente de partição octanol-água ($P_{ow} = 5,22$) e, conseqüentemente, em bioconcentrar mais intensamente, em relação ao fluoreno ($P_{ow} = 4,18$) (BRUGGEMAN; VAN DER STEEN; HUTZINGER, 1982).

Além disso, a diferença constitutiva e funcional entre tecidos pode interferir na avaliação dos parâmetros bioquímicos. Na presença de contaminantes ambientais, a brânquia é o primeiro órgão afetado, o que justifica a escolha do tecido para o presente estudo. Desta forma, é possível que tenha uma relação entre a bioconcentração de HPAs nas respostas bioquímicas.

4.2 Biomarcadores Bioquímicos em ostras expostas aos HPAs pireno e fluoreno

Ostras da espécie *C. gigas* foram expostas a duas concentrações de pireno (50 e 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$) e fluoreno (100 e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$) por 96 h. A atividade das enzimas CAT, GPx, GR, GST e G6PDH não diferiu entre os grupos de ostras expostas ao pireno e ao fluoreno. A atividade da enzima GSTm foi a única que apresentou diferença significativa entre os grupos. O grupo de ostras expostas a pireno na concentração de 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ apresentou uma atividade GSTm maior do que o grupo exposto a 50 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e o grupo controle.

Figura 10. Atividade das enzimas GPx, GR, GST, GSTm, G6PDH e CAT em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a diferentes concentrações de HPAs pireno e fluoreno por 96 h. Os dados estão expressos em média desvio \pm padrão ($n=9$). Letras diferentes demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).



De acordo com Ahmad et al., (2005), e considerando que existe uma relação entre a bioconcentração de compostos resistentes a biotransformação e a atividade das enzimas de biotransformação e antioxidantes, sugere-se que a utilização de outros tecidos, como a glândula digestiva em ostras, seja mais adequada para a avaliação da atividade de enzimas antioxidantes no organismo exposto.

Para Holmstrom e Filkel (2014), ERO representam o equivalente científico do anti-herói, quando comparados ao mundo literário, de forma que apresentam uma série de aspectos benéficos e maléficos aos sistemas biológicos. Sob o ponto de vista positivo, a produção de radicais livres atua como mediador para o cumprimento de funções biológicas importantes: geração de ATP, por meio da cadeia transportadora de elétrons, ativação de genes e

a sinalização intracelular frente a processos inflamatórios. Em contraste, a exposição a condições ambientais adversas pode conduzir à produção excessiva de ERO, e, desta forma, conduzir a um desbalanço entre oxidantes e pró-oxidantes, de forma a gerar efeitos deletérios ao organismo, denominado estresse oxidativo.

No sistema de biotransformação de fase I, os HPAs sofrem ação de enzimas, principalmente aquelas da superfamília dos CYP450, de forma a se tornarem substratos mais adequados para as reações de conjugação que compõem o sistema de biotransformação de fase II, catalisadas, em parte, pelas GSTs. Entretanto, este processo gera uma série de intermediários reativos, passíveis de causar estresse oxidativo, danos ao DNA e peroxidação lipídica. (BUSTAMANTE et al., 2012; CAPPELO et al., 2013, D'AGATA, 2014).

As defesas antioxidantes protegem as células contra os efeitos deletérios das ERO gerados pelo contaminante ou no processo de biotransformação citado anteriormente (Fase I e II). As enzimas antioxidantes CAT e GPx são peroxidases, presentes na maioria das células eucarióticas, que possuem como objetivo a proteção contra peroxidação lipídica decorrente da ação de ERO, no caso do peróxido de hidrogênio (RICHARDSON et al., 2008; LÜCHMANN et al., 2011). No presente estudo, as enzimas antioxidantes CAT e GPx não sofreram alterações significativas pela exposição aos HPAs pireno e fluoreno, entretanto, a ausência de alterações significativas de CAT e GPx em brânquias de moluscos foi relatada também em *Crassostrea brasiliana* expostas por 96 h a fração de óleo diesel acomodada em água (FAD) (LÜCHMANN et al., 2011), *Mytilus galloprovincialis* exposto a B[a]P por 72 h (BANNI et al., 2010) e em *Anomalocardia brasiliana* expostas a derramamento de óleo por diferentes períodos de tempos e concentrações (SANDRINI-NETO et al., 2016). Em contraste, variações nas atividades da CAT e GPx foram relatadas em *Crassostrea corteziensis* (GIRÓN-PÉREZ et al., 2013) e *Crassostrea rhizophorae* (RAMDINE et al., 2012) mantidas em locais contaminados com metais e HPAs e em *Crassostrea gigas* exposta a óleo quimicamente disperso por 48 h (LUNA-ACOSTA et al., 2011).

As defesas antioxidantes contam também com o sistema não enzimático composto pelo tripeptídeo GSH, que atua na decomposição do radical peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Desta forma, as concentrações de GSH

disponíveis no meio celular desempenham papel fundamental na atividade das enzimas dependentes desse tripeptídeo: GR, GPx e GST. Xie et al. (2017) relata que em ostras *Pinctada martensii* expostas a pireno por 7 dias ocorre uma diminuição significativa de GSH total, e assim sua capacidade antioxidante pode ser sobrecarregada resultando em um desbalanço na relação GSH: GSSG. A depleção de GSH pode comprometer o sistema dependente de glutathione GPx/GSH/GR, e assim interferir na defesa antioxidante do organismo exposto (MELLO et al., 2015).

A manutenção dos níveis de GSH intracelular é catalisada pela enzima GR, em um processo dependente de NADPH (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Nesse contexto, a G6PDH atua como enzima antioxidante auxiliar (BAINY et al., 1996), pois fornece NADPH, produzido na via das pentoses fosfato, de forma a viabilizar a regeneração de GSSG. Neste experimento, a atividade de G6PDH não sofreu alterações significativas com os tratamentos.

Apesar de não terem sido observadas alterações significativas na atividade de GR, estudos em glândula digestiva e fígado de moluscos e peixes, respectivamente, expostos a FAD s apontam a atividade dessa enzima quando avaliada em conjunto com GST, pode ser considerada um bom indicador de exposição a HPAs, de acordo com relatos de estudos, respectivamente (MATTOS, 2010; LÜCHMANN et al., 2011).

No sistema de biotransformação de fase II, as enzimas da família GST ganham destaque no processo de detoxificação de contaminantes devido à ligação do tripeptídeo glutathione (GSH) aos substratos que possuem centros eletrofilicos, o que os torna mais hidrossolúveis, e mais facilmente excretáveis pela célula (MATTOS, 2010). Estudos anteriores associaram alterações significativas à exposição ao HPAs em bivalves (HOARAU et al., 2001; LIMA et al., 2007; BEBBIANO et al, 2009; BANNI et al., 2010). No presente estudo, não houve alteração significativa na atividade de GST total, entretanto, na atividade GSTm houve um aumento no grupo de animais expostos a pireno na concentração de 100 µg. L⁻¹ em relação ao grupo controle.

A distribuição das isoformas de GST entre e dentro dos tecidos pode influenciar na resposta enzimática de acordo com a toxicocinética do contaminante e disponibilidade de GSH como co-substrato. O aumento na atividade da GSTm observado na brânquia das ostras expostas ao pireno pode estar indicando uma

maior capacidade de conjugação deste sistema na membrana do retículo endoplasmático em comparação às GSTs encontradas na fração citosólica (GAUTHIER et al., 2014). Estudos indicam a biotransformação de HPAs, catalisada pelo citocromo P450, atividade quantificada por meio da atividade de 7-etóxi-resorufina O-deetilase (EROD), como um marcador clássico de exposição a HPAs em vertebrados e potencial em invertebrados (SIEBERT et al., 2017). Desta forma, o aumento na atividade de GSTm pode estar relacionado com uma maior taxa de biotransformação catalisada pelo sistema microsomal Citocromo P450, localizado principalmente nesta membrana. Então, os conjugados formados estariam mais aptos à rápida eliminação da célula pelos sistemas de fluxo celular, o que corrobora com o aumento da atividade de EROD relatada em *Crassostrea brasiliana* expostas a pireno (ZACCHI, 2017).

De acordo com Regoli et al. (2011), alterações nos níveis de antioxidantes são de difícil previsibilidade e vários estudos apontam resultados diferentes para os mesmos parâmetros, com indução, inibição, mudanças bifásicas ou temporárias de acordo com as condições experimentais como: intensidade e duração de exposição, espécies, tecidos, estado metabólico ou fatores biológicos e ambientais ainda desconhecidos.

Além disso, a ausência de alterações significativas nos parâmetros bioquímicos analisados pode estar relacionada com a carcinogenicidade dos HPAs estudados. Pireno e fluoreno não apresentam evidências carcinogênicas, de acordo com a Agência Internacional de Estudos sobre o Câncer (WHO, 1983). Nesse contexto, é possível que os HPAs estudados não apresentem toxicidade suficiente para causar alterações em nível bioquímico nos animais expostos nestes tempos e concentrações quando comparado a outros compostos como benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno e benzo[a]fluoranteno, por exemplo, que apresentam maior grau de reatividade, e consequentemente mutagenicidade e carcinogenicidade, em função da sua estrutura química.

5 CONCLUSÕES

- Exposição ao pireno nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ não alterou a atividade das enzimas antioxidantes e auxiliares em brânquias de *ostras C. gigas*;
- A maior atividade das GSTm observada nas ostras expostas ao pireno na concentração de 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ pode estar associada a um aumento na atividade do sistema de biotransformação de Fase I localizados nesta membrana.
- As ostras *C. gigas* expostas a fluoreno nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$ não apresentaram alterações significativas na atividade das enzimas antioxidantes e daquelas envolvidas no processo de biotransformação;
- Os níveis de pireno nos tecidos das ostras após 96 h e exposição foram maiores do que do fluoreno, sugerindo que o pireno apresenta maior capacidade de interagir com as membranas biológicas em comparação ao fluoreno.

6 PERSPECTIVAS

- Estudos que avaliem parâmetros como GSH total, reduzida, dissulfídica, tióis proteicos e não proteicos devem ser conduzidos para verificar se as ostras encontravam-se em um estado pró-oxidante quando expostas a pireno e fluoreno.
- Estudos que avaliem a atividade das enzimas antioxidantes e de biotransformação em outros tecidos deverão ser conduzidos para verificar se existe relação entre a bioacumulação dos HPAs em diferentes tecidos na resposta bioquímica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107-123, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.

AKCHA, F. et al. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 269-287, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-445x\(99\)00082-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-445x(99)00082-x).

AKCHA, F. et al. Role of DNA adduct formation in induced carcinogenesis. In: DOUBEN, P.E.T. (Ed.). **PAHs: AN ecotoxicological perspective**. West Sussex: John Wiley & Sons Ltda, p. 65-79, 2003.

AHMAD, I. et al. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without β -naphthoflavone pre-exposure. **Chemosphere**, v. 61, n. 2, p. 267-275, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.069>.

BAINY, A. C. D. et al. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 151-162, 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-445x\(95\)00036-4](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445x(95)00036-4).

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BANNI, M., NEGRI, A., DAGNINO, A., JEBALI, J., AMEUR, S., BOUSSETTA, H., 2010. Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 73, 842–848.

BEBIANNI, M. J.; BARREIRA, L. 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.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.016>.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, p. 160, 1975.

BEYER, J. et al. Analytical Methods for Determining Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Pollutants in Fish Bile: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 224-244, 2010.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAY, T. M.; LEVY, M. A. Assessment of oxidative stress: Concepts and approaches. In: BRAY, T. M.; SCHOENE, N. W. **Models and methods in cell signaling and gene expression: Applications to oxidative stress research**. London: OICA International, p. 1-14, 2000.

BUSTAMANTE, P. et al. Bioaccumulation and metabolisation of 14C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. **Chemosphere**, v. 87, n. 8, p. 938-944, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.049>.

BRUGGEMAN, W.A.; VAN DER STEEN, J.; HUTZINGER, O. Reversed-phase thin-layer chromatography of polynuclear aromatic hydrocarbons and chlorinated biphenyls: Relationship with hydrophobicity as measured by aqueous solubility and octanol-water partition coefficient. **Journal of Chromatography A**, v. 238, p. 335-346, 1982.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B., 1985. Glutathione reductase. **Meth. Enzymol.** 113, 484–490.

CAPPELLO, T. et al. Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 52-60, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.12.010>.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). 2005. Resolução N^o 357, 17 mar 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em 16/05/2017.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). 2007. Resolução N^o 393, 09 ago 2007. Dispõe sobre o descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo e gás natural, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=541>. Acesso em 16/05/2017.

D'AGATA, A. et al. Cellular biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) from Lake Faro (Sicily, Italy). **Italian Journal of Zoology**, v. 81, n. 1, p. 43-54, 2014. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/11250003.2013.878400>.

DAHLE, S.; SAVINOV, V. M.; MATISHOV, G. G.; EVENSET, A.; NAES, K. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bottom sediments of the Kara Sea shelf, Gulf of Ob and Yenisei Bay. **The Science of the Total Environment**, v. 306, p. 57-71, 2003.

DANIELLI, N. M. et al. Upregulating Nrf2-dependent antioxidant defenses in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Investigating the Nrf2/Keap1 pathway in bivalves. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology &**

Pharmacology, v. 195, p. 16-26, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.02.004>.

DOUBEN, P. E. T. et al (Ed.). **PAH: An Ecotoxicological Perspective**. Bedford: Wiley, 2003.

EPA, United States Environmental Protection Agency. **Guidance for Reporting Toxic Chemicals: Polycyclic Aromatic Compounds Category**, EPA 260-B-01-03, Washington, DC, 2001.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). 2014. **Síntese informativa da Maricultura 2014**, Disponível em http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Sintese_informativa_da_maricultura_2014.pdf Acesso em 07/07/2017.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). 2015. **Síntese informativa da Maricultura 2015**. Disponível em <http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Sintese-informativa-da-maricultura-2015.pdf>. Acesso em 07/07/2017.

FERREIRA, J. F.; NETO, F. M. O. Cultivo de Moluscos em Santa Catarina. **INFOFISH**, v. 4, 2006.

FILHO, L. S. L. **A competência do município na zona costeira urbana**. 225 f. Tese (Doutorado) - Curso de Direito, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
 Disponível em:
 <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/2/2134/tde-11022015-075759/pt-br.php>>. Acesso em: 04 abr. 2017.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). **THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE: Opportunities and challenges**. Rome, Italy, p. 243, 2014.

GAUTHIER, P. T. et al. Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. **Aquatic Toxicology**, v. 154, n. 1, p.

253-269, 2014. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.026>.

GIRÓN-PÉREZ, M. I. et al. Evaluation of pollution in Camichin estuary (Mexico): Pro-oxidant and antioxidant response in oyster (*Crassostrea corteziensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 165, n. 4, p. 476-482, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.008>.

GOSLING, E. **Morphology of Bivalves**. In: Gosling, E., Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Oxford: Fishing News Books, p. 443, 2003.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, L. P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemistry Journal**, v. 55, p. 400-408, 1953.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, Jack U.; JOWSEY, I. R. GLUTATHIONE TRANSFERASES. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 51-88. 2005.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.

HOARAU, P. et al. Differential induction of glutathione S-transferases in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. **Environmental Toxicology And Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 523-529, 2001. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620200310>.

HOLMSTRÖM, Kira M.; FINKEL, Toren. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.411-421, 23 maio 2014. Springer Nature.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3801>.

IBAMA. (2003) - **Perspectivas do meio ambiente para o Brasil**. Disponível em: Acesso em 16/03/2017

JERINA, D. M. et al. Carcinogenicity of benzo[a]pyrene derivatives: the bay region theory. **Pure and Applied Chemistry**, v. 50, n. 9-10, p. 1033-1044, 1978.
<http://dx.doi.org/10.1351/pac197850091033>.

KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

LARUELLE, G. G. et al. Global multi-scale segmentation of continental and coastal waters from the watersheds to the continental margins. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v. 9, n. 10, p. 11319–11361, 2012.

LEE, R.F; SAUERHEBER, R.; BENSON, A. A. Petroleum Hydrocarbons: Uptake and Discharge by the Marine Mussel *Mytilus edulis*. **Science**, v. 177, p. 344-346, 1972.

LEI, X. G. et al. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 307-364, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00010.2014>.

LEVENGOD, J. M.; SCHAEFFER, D. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and crayfish from the Calumet region of southwestern Lake Michigan. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1411-1421, 2011.

LIBRANDO, V.; SARPIETRO, M.G.; CASTELLI, F. Role of lipophilic medium in the absorption of polycyclic aromatic compounds by biomembranes. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 14, n. 1-2, p. 25-32, 2003.
[http://dx.doi.org/10.1016/s1382-6689\(03\)00007-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1382-6689(03)00007-3).

LIMA, I. et al. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. **Chemosphere**, v. 66, n. 7, p. 1230-1242, 2007.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.057>.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 120, n. 1, p. 43-49, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/s1095-6433\(98\)10008-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1095-6433(98)10008-9).

LÜCHMANN, K. H. et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3-4, p. 652-660, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.003>. >

LUNA-ACOSTA, A. et al. Enhanced immunological and detoxification responses in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to chemically dispersed oil. **Water Research**, v. 45, n. 14, p. 4103-4118, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.011>.

MACLEOD, W.D. et al. Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986. **Extractable Toxic Organic Components**. 2. ed., U. S. Department of Commerce, NOAA/NMFS. NOAA Tech. Memo. NMFS F/NWC-92, p. 121, 1986.

MATTOS, J. J. **Respostas bioquímicas e moleculares no peixe *Poecilia vivipara* exposto à fração de óleo diesel acomodada em água**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010. Disponível em: <<http://ppgbqa.ufsc.br/files/2010/06/Jaco-Mattos-Dissertação.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2017.

McELROY, A.; LEITCH, K.; FAY, A. A Survey of in Vivo Benzo[A]Pyrene Metabolism in Small Benthic Marine Invertebrates. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 33-38, 2000.

MELLO, D.F. et al. How important are glutathione and thiol reductases to oyster hemocyte function? **Fish & Shellfish**

Immunology, v. 46, n. 2, p. 566-572, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.017>.

NEFF, J. M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment Sources, fate, and biological effects. **Applied Science Publishers**, London, 1979.

NEFF, J. M. Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 319 p. 132-136, 1984.

NETTO, A. D. P.; DIAS, J. C. M.; ARBILLA, G.; OLIVEIRA, L. F.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica, **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

NOGUEIRA, L. et al. Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5. **Chemosphere**, v. 134, p. 210-216, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.034>

OLIVER, L. M. et al., Relationship between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. **Aquatic Toxicology**, v. 55, p. 222, 2011.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP.241.

ORBEA, A. et al. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). **Aquatic Toxicology**, v. 58, n. 1-2, p. 75-98, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-445x\(01\)00226-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-445x(01)00226-0).

PAGE, D. S.; BOEHM, P. D.; DOUGLAS, G. S.; BENCE, A. E. B., W. A.; MANKIEWICZ, P. J. Pyrogenic Polycyclic Aromatic

Hydrocarbons in sediments record past human activity: A case study in Prince William Sound, Alaska. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38: p. 247-266, 1999.

PATRI, M.; PADMINI, A.; BABU, P. P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in air and their neurotoxic potency in association with oxidative stress: A brief perspective. **Annals of Neurosciences**, v. 16, n. 1, p. 22-30, 2009.
<http://dx.doi.org/10.5214/ans.0972.7531.2009.160109>

PAVEI, P. T. **Caracterização e estudo do comportamento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em ecossistemas aquáticos contaminados pelas atividades de mineração de carvão**. 2007. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Criciúma, 2007.

PIAZZA, R. S. et al. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 146-155, 2016.

PINTO, J. I. A. **Estudo dos níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em *nodipecten nodosus* (Coquilles Saint Jacques) de fazendas marinhas da Baía de Ilha Grande, RJ**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

RAMDINE, G. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from mangrove of Guadeloupe: Levels, bioavailability, and effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 80-89, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.12.005>.

REGOLI, F. et al. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 912-922, 2002.

REGOLI, F. et al. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3-4, p. 56-66, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.014>.

REIS, I. M. M. **Histopatologia e Hibridização in situ de Citocromo P450 (CYP2A1) em ostras *Crassostrea brasiliana* expostas ao fenantreno**. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/129691/332350.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 07 mar. 2017.

REISCHL, E.; DAFRE, A. L.; FRANCO, J. L.; FILHO, D. W. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol**, v. 146, n. 1-2, p. 22-53, 2007.

RICHARDSON, B. 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. 6-12, p. 503-514, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.02.032>.

SANDRINI-NETO, L. et al. Antioxidant responses in estuarine invertebrates exposed to repeated oil spills: Effects of frequency and dosage in a field manipulative experiment. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 237-249, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.028>.

SCHLENK, D.; BUHLER, D. Xenobiotic Biotransformation in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 94, p. 469 -475, 1989.

SCHNEIDER, N. F. Z. **Padronização do ensaio pampa (Parallel Artificial Membrane Permeation Assay) e avaliação in vitro da permeabilidade intestinal e cutânea de compostos de origem natural e sintética**. 2011. 131 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

Disponível em:

<<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/94809/289039.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

SIEBERT, M.N. **Atividade 7-etoxi-resorufina o-deetilase em ostras *Crassostrea* sp. e Níveis de Transcritos e Atividades de Enzimas de Biotransformação em ostras *Crassostrea gigas* expostas a Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.** 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.

SINDERMAN, C.J. Effects of Living Resources and Humans. **Ocean Pollution**. CRC Press, Boca Raton, 1996.

SLEKAR, K. H.; KOSMAN, D. J.; CULOTTA, V. C. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. **J BiolChem**, v. 271, n. 46, p. 28831-28836, 1996.

SOLE, M.; LIVINGSTONE, D. R. Components of the Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase System and NADPH-Independent Benzo[A]Pyrene Hydroxylase Activity in a Wide Range of Marine Invertebrate Species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 141, p. 20-31, 2005.

STEGEMAN, J. J.; LECH, J. J. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environ Health Perspect**, v. 90, p. 101-109, 1991.

TAO, Y. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from drinking water sources of Taihu Lake, China:

sources, partitioning and toxicological risk. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, n. 12, p. 2282-2289, 2010. <http://dx.doi.org/10.1039/c0em00144a>.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses**. 2008. 70 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/132883/20081-RafaelTrevisan.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

TREVISAN, R. et al. Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 159, p. 22-30, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.09.007>

TRISCIANI, A. et al. Phase I and II biotransformation enzymes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) collected in front of an oil refinery. **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 29-36, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.006>.

VALENTI, W. C. Aquicultura Sustentável. In: **Congresso de Zootecnia**, 12, Vila Real, Portugal, 2002.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 571-49, 2003.

VERBRUGGEN, E. (Ed.). Environmental risk limits for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): For direct aquatic, benthic, and terrestrial toxicity. **National Institute for Public Health and the Environment**, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/314299603_Environm

ental_risk_limits_for_polycyclic_aromatic_hydrocarbons_PAHs_for_direct_aquatic_benthic_and_terrestrial_toxicity>. Acesso em: 16 abr. 2017.

XIE, J. et al. Effects of pyrene exposure on immune response and oxidative stress in the pearl oyster, *Pinctada martensii*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 63, p. 237-244, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.02.032>.

WALKER, C. H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, p. 321, 2016. Disponível em <<<https://books.google.com.br/books?id=sk3OBQAAQBAJ&hl=pt-BR>>>. Acesso em 16/05/2017.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymology**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, chemical environmental and experimental data, 32. **International Agency for Research on Cancer**, World Health Organization, p. 477, 1983.

YIN, Q, et al. Molecular Evolution of the Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 Gene *Nrf2* in Old World Fruit Bats (Chiroptera: Pteropodidae). **PLoS ONE**, p. 1-17, 2016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146274>

ZACCHI, F.L. **Respostas moleculares e de enzimas de biotransformação em ostras *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) expostas a Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e diferentes salinidades**. 2017. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Curso de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. São Paulo: Editora Rima, p. 464, 2006.

ZANETTE, J. **Identificação e caracterização de marcadores moleculares para estudos ecotoxicológicos em moluscos bivalves e peixes**. 2009. 180 f. Tese (Doutorado em

Biotecnologia) – Curso de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

ZANETTE, J. et al. Salinity influences Glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 1976-1983, 2011.

ZHANG, Z. et al. Investigation into the causes for the changed biodegradation process of dissolved pyrene after addition of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD). **Journal of Hazardous Materials**, v. 243, p. 139-145, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.011>.