

Camila Lisarb Velasquez Bastolla

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS EM TRÊS ESPÉCIES DE OSTRAS
DO GÊNERO *Crassostrea* (Sacco, 1897) EXPOSTAS A CRISENO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Afonso Celso Dias Bainy
Co-orientadora: Dra. Flávia Lucena Zacchi

Florianópolis
2019

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

Bastolla, Camila Lisarb Velasquez

Respostas bioquímicas em três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* (SACCO, 1897) expostas a criseno / Camila Lisarb Velasquez Bastolla ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy, coorientadora, Flávia Lucena Zacchi, 2019.
91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. HPA. 3. Bivalve. 4. Enzimas antioxidantes. 5. Biotransformação. I. Bainy, Afonso Celso Dias . II. Zacchi, Flávia Lucena . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Respostas bioquímicas em três espécies de ostras do gênero
Crassostrea (SACCO, 1897) expostas a crisenol**

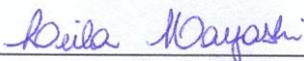
Por

CAMILA LISARB VELASQUEZ BASTOLLA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

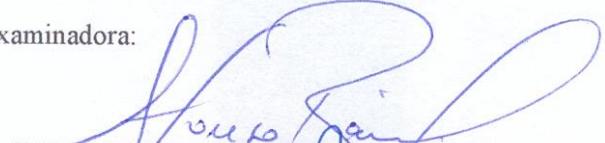
MESTRE EM AQUICULTURA

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

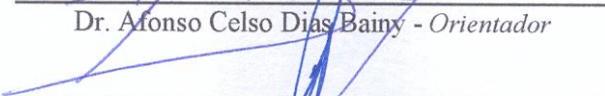


Profª. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura

Banca Examinadora:



Dr. Afonso Celso Dias Bainy - *Orientador*



Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo - UFSC



Dr. Eduardo Alves de Almeida - FURB

Dedico esta dissertação:
Aos meus amores: Mara, Jerônimo e Herculano.

AGRADECIMENTOS

Os aprendizados vivenciados ao longo destes dois anos de mestrado me permitiram evoluir tanto em âmbito profissional, como pessoal. Dessa maneira, seria impossível não agradecer a todos que contribuíram, direta e indiretamente, nesse processo:

À minha mãe e meu irmão, por todo incentivo e carinho. Vocês são a minha base!

Ao meu namorado Herculano Cella, pelo apoio incondicional em todas as etapas do mestrado. Pela confiança, paciência, apoio e carinho nos momentos difíceis. Essa vitória também é tua! Contigo esse período foi mais leve e alegre! Que possamos compartilhar outros tantos momentos de alegrias e desafios... sempre juntos! Te amo! <3

Ao meu orientador Afonso Celso Dias Bainy, pela oportunidade de fazer parte do LABCAI. Por ter me acolhido desde a monitoria, iniciação científica, TCC e por fim no mestrado. Pela confiança que tiveste em mim ao longo desse processo! Meu muito obrigada!

À minha co-orientadora e amiga Dra. Flávia Lucena Zacchi, por todo o auxílio no desenvolvimento desse trabalho. Grata pela orientação e pela elucidação nos momentos de dúvida.

Aos meus co-orientadores de bancada: Jacó Joaquim Mattos e Daína de Lima. Sinto que vocês foram fundamentais para a superação de todas as etapas que estabelecemos (e das outras que surgiram, também!) nesse desafio e resultantes no meu desenvolvimento profissional e pessoal, durante esse período! Grata pelos diversos momentos de planejamento, trabalho de bancada e discussões acerca deste projeto que vivenciamos juntos. Grata por todos os puxões de orelha, pelo incentivo ao aprendizado com vistas à tão necessária independência no laboratório, pelo carinho e confiança nos momentos de desespero. Muito obrigada!

Ao Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM-UFSC), em especial ao Carlos Henrique A. M. Gomes, a quem carinhosamente também é chamado de “Tatu”, pela desova, manutenção e fornecimento das ostras utilizadas nesse trabalho. Além disso, por todo o auxílio prestado durante o período experimental. Muito obrigada pela parceria!

À Dra. Márcia C. Bicego e Dra. Satie Taniguchi, do Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da USP (IO-USP) pelas análises químicas nos tecidos das ostras. Em especial a Satie, pela disponibilidade em participar do projeto, pela prontidão no esclarecimento das dúvidas.

Aos colegas do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica que trabalharam comigo durante esse período e que contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento desse trabalho: Bárbara Pacheco Harrison Righetti, Clei Endrigo Piazza, Daína de Lima, Flávia Lucena Zacchi, Giulia Brocardo, Isis Mayna Martins dos Reis, Lígia Sampaio Lanzarin, Luiz Otávio De Barros Vilas Bôas, Miguel Angel Saldana Serrano, Vanessa Schadeck Deconto, Vera Helena Dias Vidal, Luiza Manaut Rodrigues e Raphaella Christine Paiva Regis.

Aos amigos do grupo “Minuto da Oração”: Jacobs, Lila, Dai, Fla, Vé, Clei, Isis, Migs, Lígia, Luiza, Vanessão, Louis, Bá, Ju e Rafinha, pelos momentos de alegria e de balbúrdia, as conversas jogadas fora e cafés “3 Molar” (antes, durante e pós almoço) que tornaram o processo muito mais alegre e leve.

Ao Juliano Valério Luiz, pelo auxílio essencial nas atividades dos Bioensaios antes, durante e após o período experimental. Grata também pelo auxílio na diária organização dos laboratórios e do NEPAQ.

À Dra. Leila Hayashi e Dra. Karim Hahn Lüchmann pelas contribuições no trabalho durante a defesa do projeto de dissertação.

Aos membros que compõem a banca avaliadora dessa dissertação: Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo e Dr. Eduardo Alves de Almeida pela disponibilidade e pelo tempo destinado para revisão e correção deste documento. Também aos membros suplentes: Dr. Camillo Dias Seabra e Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, professores e servidores, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Em especial ao Carlito Klunk, pelo auxílio nas questões administrativas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), respectivamente, pela bolsa de estudo.

RESUMO

A maricultura pode ser diretamente afetada pela contaminação do ambiente aquático, pois utiliza desses recursos para desenvolver a atividade. Ostras do gênero *Crassostrea*, incluindo aqui a ostra do Pacífico *C. gigas*, e as ostras do mangue *C. gasar* e *C. rhizophorae*, apresentam potencial zootécnico e relevância econômica para a maricultura brasileira. O criseno (CHR) é considerado um HPA prioritário para o monitoramento de poluentes orgânicos, pois apresenta significativo potencial carcinogênico, mutagênico, genotóxico e de desregulação endócrina em sistemas biológicos. Nesse sentido, objetivo do presente estudo foi analisar comparativamente a atividade das enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos e no sistema de defesa antioxidante: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona S-Transferase (GST), Glutaciona Redutase (GR) e Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em brânquias e glândulas digestivas (n=10) nas três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* expostas a CHR (10µg/L) por 96 h. Ostras expostas foram comparadas aos respectivos grupos controle (água do mar, salinidade 30, solvente DMSO 0,002%). As três espécies de ostras avaliadas demonstraram consumo de CHR na água dos aquários e bioconcentração nos tecidos moles. Em relação às respostas bioquímicas, em brânquias de ostras *C. gigas* foi observado significativo decréscimo na atividade GR e em glândulas digestivas foi observada diminuição da atividade SOD e aumento na atividade CAT. Em *C. gasar* houve significativo decréscimo na atividade SOD e GR e aumento na atividade CAT nas brânquias. Não foram observadas alterações nas atividades enzimáticas em glândulas digestivas das ostras *C. gasar* expostas à CHR. Nas brânquias de ostras *C. rhizophorae* expostas ao CHR foi observado aumento na atividade SOD e decréscimo na atividade G6PDH. Em uma visão global das respostas bioquímicas, as espécies *C. gigas* e *C. gasar* foram mais responsivas ao CHR, em relação à espécie nativa *C. rhizophorae*, sugerindo que as primeiras apresentaram maior sensibilidade à exposição ao CHR. As ostras *C. rhizophorae* apresentaram menor número de alterações nas respostas bioquímicas resultantes à exposição, o que sugere uma maior capacidade antioxidante da espécie e adaptação às situações pró-oxidantes, em relação à *C. gigas* e *C. gasar*. Comparativamente, as distintas respostas na biotransformação e defesa antioxidante observadas pelas espécies expostas ao CHR podem estar relacionadas com a plasticidade fenotípica associada aos respectivos nichos ecológicos que ocupam e a adaptação às respectivas condições ambientais.

Palavras-chave: Aquicultura; HPA; Bivalve; Enzimas antioxidantes; Biotransformação.

ABSTRACT

Mariculture can be directly affected by contamination of the aquatic environment, as it uses these resources to develop the activity. Oysters of the genus *Crassostrea*, including the Pacific oyster *C. gigas*, and the mangrove oysters *C. gasar* and *C. rhizophorae*, present zootechnical potential and economic relevance for Brazilian mariculture. Chrysene (CHR) is considered a priority HPA for monitoring organic pollutants, since it has a significant carcinogenic, mutagenic, genotoxic and endocrine disrupting potential in biological systems. Studies report changes in the xenobiotic biotransformation and the antioxidant defense system and oxidative damage to macromolecules in fish and molluscs exposed to CHR. Therefore, the aim of the present study was to analyze comparatively the activity of the enzymes involved in the xenobiotic biotransformation and the antioxidant defense system: Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione S-Transferase (GST), Glutathione Reductase (GR) and Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) in gills and digestive glands (n = 10) in the three species of *Crassostrea* oysters exposed for 96 h to CHR (10 µg/L). Exposed oysters were compared to the respective control groups (seawater, salinity 30, solvent DMSO 0.002%). The three species of oysters evaluated showed consumption of CHR in aquaria water and bioconcentration in soft tissues. Regarding the biochemical responses, a significant decrease in GR activity and in digestive glands was observed in *C. gigas* oyster gills. There was a decrease in SOD activity and an increase in CAT activity. In *C. gasar* there was a significant decrease in SOD and GR activity and an increase in CAT activity in the gills. No alterations were observed in the enzymatic activities in the digestive glands of *C. gasar* oysters exposed to CHR. In the gills of *C. rhizophorae* oysters exposed to CHR an increase in SOD activity and a decrease in G6PDH activity was observed. In overview of the biochemical responses, *C. gigas* and *C. gasar* species were more responsive to CHR than native species *C. rhizophorae*, suggesting that they are more sensitive to exposure to CHR. Oysters *C. rhizophorae* showed few biochemical responses after CHR exposure, suggesting higher antioxidant capacity and defense against reactive oxygen species production than *C. gigas* and *C. gasar*. Comparatively, the different responses in the biotransformation and antioxidant defense observed by the species may be related to the phenotypic plasticity associated to their respective ecological niches and the adaptation to environmental conditions.

Keywords: Aquaculture; PAH; Bivalve; Antioxidant enzymes; Biotransformation;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos 17 objetivos propostos pela ONU visando o desenvolvimento sustentável mundial, descritos na Agenda: 2030.	22
Figura 2. Espécies de ostras do gênero <i>Crassostrea</i> avaliadas no presente estudo	25
Figura 3. 16 HPAs considerados prioritários para o monitoramento de poluentes orgânicos, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos com os valores referência para concentrações aguda e crônica (EPA, 2010; EPA, 2015), valores máximos permitidos em áreas destinadas à maricultura (CONAMA nº 357/05) e estrutura química.....	30
Figura 4. Estrutura molecular do criseno (C ₁₈ H ₁₂)	32
Figura 5. Metabolismo de biotransformação de HPAs em organismos aquáticos.....	37
Figura 6. Vias de produção das espécies reativas de oxigênio e atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante e de biotransformação.....	40
Figura 7. Esquema das etapas metodológicas utilizadas neste estudo para avaliação das respostas bioquímicas em três espécies de ostras do gênero <i>Crassostrea</i> expostas à 10 µg/L de criseno durante 96 h.	44
Figura 8. Delineamento experimental do presente estudo adotado para a exposição em 24 h e 96 h.	50
Figura 9. Imagem do gel de eletroforese em agarose 3% do produto da PCR após digestão com a enzima de restrição Anza 68 BsuRI.....	54
Figura 10. Representação gráfica do consumo médio de CHR realizado pelas ostras do gênero <i>Crassostrea</i> expostas à 10 µg/L de criseno.	56
Figura 11. Quantificação de CHR nos tecidos das ostras <i>C. gigas</i> , <i>C. gasar</i> e <i>C. rhizophorae</i> expostas à 10 µg/L de CHR durante 24 h e 96 h, e respectivos grupos controle (CT).	59
Figura 12. Representação gráfica da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona-S-Transferase (GST) Glutaciona Redutase (GR) e	

Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em brânquias e glândulas digestiva de ostras *C.gigas*, *C.gasar* e *C.rhizophorae* expostas à 10 µg/L de criseno por 96h 63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Levantamento bibliográfico acerca dos trabalhos realizados nos últimos 10 anos envolvendo organismos aquáticos de interesse para aquicultura expostos à crise no..... 33
- Tabela 2.** Representação comparativa da atividade das enzimas antioxidantes e de biotransformação Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione-S-Transferase (GST) Glutathione Redutase (GR) e Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em brânquias e glândulas digestivas das três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* avaliadas no presente estudo nos grupos controle. 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/L}$: Micrograma por litro
 $^{\circ}\text{C}$: Graus Celsius
CHR: Criseno, do inglês chrysene
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
gDNA: DNA genômico
GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
G6PDH: Glicose 6-Fosfato-Desidrogenase
GPx: Glutaciona Peroxidase
GSH: Glutaciona Reduzida
GSSG: Glutaciona dissulfidica
GR: Glutaciona Redutase
GST: Glutaciona S-Transferase
h: Horas
 H_2O_2 : Peróxido de Hidrogênio
HPA: Hidrocarboneto policíclico aromático
Kow: Coeficiente de partição octanol-água
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

PCB: bifenilos policlorados

pH: Potencial hidrogeniônico

PMSF: fenil-metil-sulfunil-fluoreto

SIM: Monitoramento seletivo de íons

SOD: Superóxido Dismutase

t: Tonelada

Tris-HCl: Tris(hidroximetil)aminometano-hidrocloro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 PANORAMA DA AQUICULTURA MUNDIAL: PRODUÇÃO, MOVIMENTAÇÃO FINANCEIRA E SEU POTENCIAL PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL MUNDIAL.....	21
1.2 O CULTIVO DE MOLUSCOS NO BRASIL.....	23
1.2.1 Ostras do gênero <i>Crassostrea</i> cultivadas no Brasil	24
1.2.2 Ostra do Pacífico: <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)	26
1.2.3 Ostras do mangue: <i>Crassostrea gasar</i> (Adanson, 1757) e <i>Crassostrea rhizophorae</i> (Guilding, 1828)	27
1.3 POLUIÇÃO AQUÁTICA.....	28
1.4 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs).....	29
1.5 CRISENO E SEUS EFEITOS SOB OS ORGANISMOS AQUÁTICOS.....	31
1.6 METABOLISMO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS.....	35
1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	37
1.8 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA.....	41
1.9 OBJETIVO GERAL.....	43
1.9.1 Objetivos específicos	43
1.10 ETAPAS METODOLÓGICAS.....	44
2 ARTIGO CIENTÍFICO	45
2.1 INTRODUÇÃO.....	47
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.2.1 Delineamento experimental	49
2.2.2 Extração e quantificação do CHR na água dos aquários	50
2.2.3 Concentração de CHR nos tecidos moles das ostras	51

2.2.4	Confirmação molecular das espécies.....	52
2.2.5	Ensaio enzimático.....	52
2.2.6	Análises estatísticas.....	53
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
2.3.1	Confirmação molecular das espécies via PCR-RFLP.....	54
2.3.2	Concentração do CHR na água dos aquários e nos tecidos moles das ostras.....	55
2.3.3	Atividade das enzimas antioxidantes e de biotransformação	60
2.3.3.1	Distinções constitutivas: comparação entre os grupos controles das três espécies.....	60
2.3.3.2	Alterações enzimáticas em decorrência da exposição ao CHR: Comparação dos grupos controle e expostos em cada espécie.....	62
2.4	CONCLUSÃO.....	71
2.5	AGRADECIMENTOS.....	71
2.6	REFERÊNCIAS.....	72
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 PANORAMA DA AQUICULTURA MUNDIAL: PRODUÇÃO, MOVIMENTAÇÃO FINANCEIRA E SEU POTENCIAL PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL MUNDIAL

De acordo com Vinatea (2004), a aquicultura pode ser definida como a tecnologia de cultivo de organismos aquáticos com valor econômico, cujo objetivo é aumentar a segurança alimentar do planeta em todas as camadas socioeconômicas da população, com vistas à conservação ambiental.

Nesse contexto, a atividade possui papel fundamental como agente transformador para as metas estabelecidas pela Organização das Nações Unidas (ONU) em “*Transforming our world: The 2030 Agenda for Sustainable Development*”. Foram estabelecidos 17 objetivos para o desenvolvimento sustentável (ODS) que visam erradicar a pobreza e a fome, nas suas diferentes formas e dimensões, além de promover o desenvolvimento socioeconômico igualitário entre as sociedades e a preservação dos recursos naturais (ONU, 2015). Entre os 17 ODSs existentes (Figura 1), a atividade possui relação com 10 ODSs (FAO, 2018).

O último levantamento realizado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) denominado “*The State of World Fisheries and Aquaculture*” estima que a produção aquícola mundial de pescados atingiu 80 milhões de toneladas (t), e movimentou o mercado financeiro em USD 231,6 bilhões de dólares no ano de 2016. Os valores supracitados evidenciam o significativo crescimento da atividade (5,8% ao ano) em relação aos demais setores de produção de alimentos (FAO, 2018).

De maneira geral, a aquicultura mundial está dividida em quatro grandes segmentos de produção: piscicultura (marinha e continental) estimada em 54,1 milhões de toneladas (67,5%); seguido pelo cultivo de moluscos estimado em 17,1 milhões de toneladas (21,4%); 7,9 milhões de toneladas em cultivo de crustáceos (9,9%) e 938.500 toneladas (1%) de outros organismos aquáticos comestíveis como anfíbios, tartarugas de água doce, estrelas do mar, pepinos do mar, ascídias e medusas comestíveis (FAO, 2018). Entre os segmentos aquícolas citados, destacamos a produção de moluscos, que no ano de 2016 movimentou USD 29,2 bilhões de dólares.

Entre os moluscos, os bivalves do gênero *Crassostrea* spp. e da espécie *Ruditapes philipinarum* atingem 53% da produção mundial, seguido por: pectinídeos (11%), mitilídeos (6%) e outros moluscos marinhos (7%). Especificamente em relação à ostreicultura, a produção mundial de *Crassostrea* spp. foi estimada em 4.864 milhões de toneladas no ano de 2016, dos quais 574 milhões de toneladas correspondem ao cultivo da ostra do pacífico *Crassostrea gigas* (FAO, 2018).

Figura 1. Representação esquemática dos 17 objetivos propostos pela ONU visando o desenvolvimento sustentável mundial, descritos na Agenda: 2030.



Fonte: BASTOLLA (2019). Adaptado de ONU (2015).

Nota: Os objetivos destacados em colorido representam aqueles que possuem relação direta ou indireta com a aquicultura (FAO, 2018).

No ranking aquícola mundial, a Ásia ocupa a liderança em relação aos demais continentes há duas décadas, atingindo 89% do volume total de produção. Neste continente destaca-se a China, com 61,5% e produção correspondente a 49.244 milhões de toneladas (FAO, 2018). O Brasil ocupa a 13ª posição neste ranking, com produção correspondente a 561.803 toneladas em 2014 (FAO, 2016).

O censo agropecuário realizado pelo IBGE no ano de 2017 aponta movimentação financeira de aproximadamente 4,4 bilhões de reais relativo à produção aquícola no País. Este montante é representado, em escala de produção pela piscicultura continental (86,75%) e a maricultura, esta subdivida pela carcinicultura (9,49%) e o cultivo de moluscos (3,76%) (IBGE, 2017). Com destaque para a última atividade, a produção de moluscos brasileira é realizada majoritariamente nos estados de São

Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Santa Catarina, sendo o último o principal produtor nacional do segmento (IBGE, 2017).

1.2 O CULTIVO DE MOLUSCOS NO BRASIL

Em Santa Catarina, a produção de moluscos compreende o cultivo de três espécies: o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e vieiras *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (SANTA CATARINA, 2017).

Em retrospectiva, as primeiras tentativas para cultivo de ostras no Brasil iniciaram-se em 1972 com a espécie nativa *C. rhizophorae*. Devido ao baixo desempenho zootécnico apresentado pela espécie, a introdução da espécie exótica *C. gigas* no País, realizada pelo Instituto de Pesca em Cabo Frio/RJ, abriu possibilidades para a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico da espécie exótica no estado. Assim, o desenvolvimento da atividade em Santa Catarina se estabeleceu nas cinco décadas subsequentes, caracterizadas em 5 etapas: investigação, desenvolvimento, crescimento, aprimoração e qualificação. Atualmente, o estado visa a mecanização e a certificação dos processos e produtos a fim de atingir o mercado externo (ANDRADE, 2016).

De acordo com a última Síntese Informativa da Maricultura realizada pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), no ano de 2017 a produção de moluscos comercializados no estado foi de 13.699 toneladas (t). Deste total, aproximadamente 80,7% (11.056 t) corresponde ao mexilhão *P. perna*, 18,5% (2.529 t) corresponde às ostras *C. gigas* e 0,8% (114 t) às vieiras *N. nodosus*. Neste sentido, é evidente o potencial gerador de renda e emprego decorrente desta atividade que, neste ano, movimentou aproximadamente R\$67.348.739,69 e teve o envolvimento direto de 1.935 trabalhadores (SANTA CATARINA, 2017).

Fatores-chave como condições oceanográficas favoráveis ao cultivo, qualidade de água e temperatura foram essenciais para adaptação e desenvolvimento de *C. gigas* nas áreas de cultivo de Santa Catarina (SOUZA FILHO, J., 2003). As Baías Norte e Sul da Grande Florianópolis são responsáveis por 97,6% (2.412 t) da produção estadual de ostras cultivadas (SANTA CATARINA, 2017).

Entretanto, a reprodução e a sobrevivência das larvas no ambiente são dificuldades encontradas na atividade e põe em risco o sucesso do cultivo. Assim, a produção de sementes em laboratório (*hatchery*) tornou-se uma alternativa necessária e efetiva para o fornecimento de sementes e a manutenção do setor produtivo catarinense (FERREIRA et al., 2011).

O Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM/UFSC) desempenha papel fundamental como principal fornecedor de sementes da ostra *C. gigas* atendendo toda a cadeia de produção do estado. A parceria firmada com a EPAGRI, tem como objetivo desenvolver a tecnologia de cultivo, além de fortalecer a cadeia produtiva. (ANDRADE, 2016).

Assim, o cultivo de ostras *C. gigas*, ganhou destaque no cenário nacional e internacional. Não obstante, o desenvolvimento de cultivo com espécies nativas e a potencial formação de linhagens com alto rendimento e elevada sobrevivência são alternativas para diversificação de produto e, consequente, ampliação do mercado para outras regiões do País. Projetos como a Rede Nacional de Pesquisas em Ostras Nativas, que integra 9 universidades e 3 instituições de pesquisa e extensão, visa desenvolver conhecimento e viabilizar a produção das espécies nativas que apresentem potencial para a maricultura.

Atualmente, as ostras nativas *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae* são mais cultivadas nas regiões sudeste, norte e nordeste do Brasil e, diferentemente do cultivo de *C. gigas*, possuem perfil familiar, restrito a participação da população ribeirinha e pescadores. A produção das espécies nativas baseia-se, majoritariamente, na obtenção de sementes do assentamento das larvas em ambiente natural, com o auxílio de coletores artificiais, ou da extração de juvenis para posterior engorda no mar (IBAMA, 2007).

1.2.1 Ostras do gênero *Crassostrea* cultivadas no Brasil

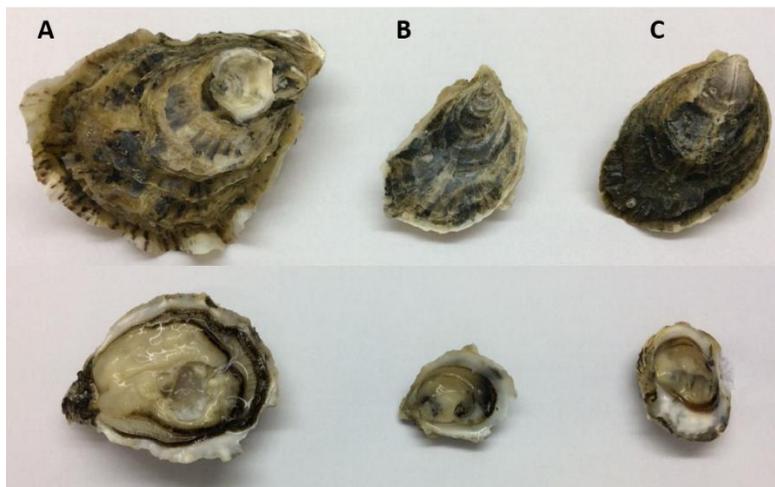
As ostras do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) são moluscos bivalves caracterizados por apresentarem corpo mole, recoberto por duas valvas calcárias levemente assimétricas, alongadas na direção dorsoventral e unidas por um ligamento articular no ápice da concha denominado umbo (FERREIRA et al., 2011). Além disso, não apresentam dentículos na borda interna da concha, e possuem marca de fixação na válvula esquerda, decorrente do assentamento em raízes de mangue, mar aberto ou costões (AMARAL; SIMONE, 2014).

No Brasil, são cultivadas três espécies deste gênero: *C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae*. Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, as três espécies apresentam diferenças significativas, intrínsecas e extrínsecas, que se refletem no cultivo e, consequentemente, na sua respectiva produtividade. A seguir consta a classificação taxonômica das três espécies, de acordo com o sistema integrado de informação taxonômica

(ITIS) e na figura 2 uma representação gráfica das ostras do gênero *Crassostrea* avaliadas no presente estudo:

Filo: Mollusca;
Classe: Bivalvia (Linnaeus, 1758);
Subclasse: Pteriomorphia;
Ordem: Ostreoida;
Família: Ostreidae (Rafinesque, 1815);
Gênero: *Crassostrea* (Sacco, 1897);
Espécie: *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793)
Crassostrea rhizophorae (Guilding, 1828)
Crassostrea gasar (Andanson, 1757)

Figura 2. Espécies de ostras do gênero *Crassostrea* avaliadas no presente estudo



Fonte: BASTOLLA (2019)

Nota: (A) Espécie exótica *C. gigas*, Espécies consideradas nativas: (B) *C. rhizophorae* e (C) *C. gasar*. A representação acima evidencia as características fenotípicas como tamanho, coloração e formato da concha entre as diferentes espécies.

No passado foram relatadas controvérsias sobre a presença de duas espécies nativas na costa brasileira: *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea brasiliiana*. A identificação em nível de espécie dos animais no ambiente natural ocorre pela observação das características fenotípicas presentes no indivíduo: tamanho, coloração e formato da concha e a presença de dentes na borda da concha. Entretanto, essa abordagem demonstra-se ineficaz, uma vez que as condições ambientais podem exercer influência sob as características fenotípicas (AMARAL; SIMONE, 2014).

Dessa maneira, a evolução de técnicas bioquímicas e moleculares permitiu maior acurácia na confirmação das espécies de ostras. Inicialmente, estudos com uso de aloenzimas identificaram duas espécies nativas distintas: *Crassostrea brasiliiana* e *Crassostrea rhizophorae* (IGNACIO et al., 2000). Após dois anos, Lapègue et al. (2002) relataram a ocorrência de uma terceira espécie originária da costa africana: *C. gasar* (Andanson, 1757), a partir do marcador molecular rDNA16S através da técnica PCR-RFLP. Por fim, Pie et al. (2006) sugerem que *C. brasiliiana* seria sinonímia de *C. gasar*. A análise molecular filogenética da família Ostreidae realizada por Salvi, Macali e Mariottini (2014) corroboraram os resultados apresentados por Pie et al. (2006), e sugeriram uma distância genética muito baixa entre *C. gasar* e *C. brasiliiana*, insuficientes para fins de diferenciação entre as espécies.

Nesse contexto, foi adotada a nomenclatura *C. gasar* (= *C. brasiliiana*) para a “ostra do mangue” para fins de comparação entre espécies de ostras avaliadas no presente estudo e outras publicações realizadas pelo grupo LABCAI/UFSC.

1.2.2 Ostra do Pacífico: *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

A ostra do Pacífico, recebe este nome devido à sua ocorrência natural no leste asiático, com maior predominância no Japão, Coreia e China (FERREIRA et al., 2011). É a espécie mais cultivada no mundo, introduzida para fins de maricultura em diversos países, entre eles: Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, França, Nova Zelândia, Austrália, e países da América do Sul (MIOSSEC, 2009).

As primeiras tentativas de cultivo no Brasil iniciaram-se em meados dos anos 70 pelo Instituto de Pesquisas da Marinha (ANDRADE, 2016). Esta espécie se distribui nas zonas intertidal inferior (até 40 m de profundidade) e apresenta capacidade de adaptação à diversas condições ambientais e flutuações de temperatura (11-25 °C) e salinidade (14 - 35‰) (MIOSSEC, 2009; AMARAL; SIMONE, 2014).

As características supracitadas, associadas ao rápido crescimento (20-30 cm de tamanho médio de concha) lhe conferem maior potencial para maricultura em relação às espécies nativas. Santa Catarina destaca-se por atingir tamanho comercial em aproximadamente 8 meses de cultivo. Em outros locais no mundo, por exemplo na França, são necessários, no mínimo, 2 anos para atingir o mesmo tamanho (GOSLING, 2003; ANDRADE, 2016).

1.2.3 Ostras do mangue: *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828)

Conhecidas popularmente como “ostras do mangue”, *C. gasar* e *C. rhizophorae* são consideradas espécies nativas adaptadas às regiões estuarinas da costa brasileira, onde ocorrem constantes variações nas condições ambientais como salinidade, temperatura e disponibilidade de oxigênio (BALDAN; BENDHACK, 2009).

A espécie *C. gasar* é originária da costa africana e apresenta ampla distribuição ao longo da costa brasileira, encontrada normalmente em regiões de estuários e manguezais. Ocorre na região infralitoral, é considerada eurihalina (0-40‰) e euri térmica (23-31 °C). A espécie é considerada nativa e apresenta potencial para a maricultura, com crescimento muito superior em relação à *C. rhizophorae*, atingindo mais de 20 cm de tamanho médio de concha na fase adulta (CHRISTO, 2003, GOSLING, 2003).

Por fim, a espécie *C. rhizophorae* recebe este nome devido sua ocorrência, predominantemente associada as raízes aéreas do mangue vermelho *Rhizophora mangle*. Também é encontrada fixada ao mangue branco *Laguncularia racemosa* ou fixadas aos costões rochosos (NASCIMENTO, 1983). Ocorre na região intertidal e apresenta distribuição geográfica desde o Caribe até a costa sul do Brasil (CARRIKER; GAFFNEY, 1996, GOSLING, 2003). Desenvolve-se com sucesso em águas com oscilações de temperatura entre 23 e 31 °C e, assim como *C. gasar*, apresenta ampla tolerância às variações de salinidade (0-40‰), com faixa ideal para crescimento entre 7,2 e 28,8‰ (NASCIMENTO, 1991).

Em relação às demais espécies, *C. rhizophorae* apresenta o menor potencial para maricultura, devido ao baixo crescimento e rendimento em carne, podendo atingir até 5,5 cm de tamanho médio de concha na fase adulta (NASCIMENTO, 1983). Entretanto, a espécie possui relevância socioeconômica nas comunidades ribeirinhas envolvidas com a atividade da produção de ostras (BALDEN; BENDHACK, 2009).

1.3 POLUIÇÃO AQUÁTICA

A degradação dos ecossistemas, em especial os aquáticos, põe em risco a saúde e o bem-estar humano, além do equilíbrio ecológico. Nesse contexto, a maricultura pode ser considerada uma das atividades afetadas pela poluição aquática, uma vez que seu desenvolvimento depende diretamente da saúde dos ecossistemas aos quais está inserida (CONAMA, 2005; VALENTI, 2002). Nesse sentido, a problemática da poluição aquática integra as metas (ODS 6: Água limpa e Saneamento; ODS 14: Vida embaixo d'água) estabelecidas na Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável, e demanda abordagem multidisciplinar que viabilize a gestão, o saneamento e a promoção da segurança hídrica para todos (ONU, 2015).

Regularmente, toneladas de esgoto bruto são liberados nos ecossistemas aquáticos e se dispersam nos oceanos exercendo pressão sobre os ecossistemas aquáticos, especialmente quando associado ao crescimento populacional desordenado e progressivo nas regiões costeiras (VIKAS; DWARAKISH, 2015). No Brasil, apenas 45% do efluente doméstico produzido recebe tratamento adequado antes de seu descarte nos recursos hídricos (IBGE, 2011). O esgoto é composto por uma mistura complexa de substâncias orgânicas e metálicas que apresentam potencial oxidante como: produtos de uso pessoal, plásticos, fármacos, pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, organoclorados, bifenilas policlorados, esteróides, surfactantes e derivados do petróleo (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005).

Estes xenobióticos podem causar injúrias aos organismos expostos em diferentes níveis: molecular, celular, tecidual, sistêmico, podendo inclusive oferecer risco à estabilidade da população, comunidade ou ecossistema (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Fatores intrínsecos (idade, sexo, estado nutricional e fisiológico) e extrínsecos (dose, período de exposição, via de exposição e interação com outros contaminantes) podem influenciar diretamente os efeitos tóxicos. Entre os contaminantes supracitados, destacamos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), devido seu potencial carcinogênico, mutagênico e de bioacumulação em sistemas biológicos (WHO, 1983).

1.4 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)

De maneira geral, os HPAs são classificados em dois grandes grupos: pirogênicos/pirolíticos e petrogênicos. Pirogênicos ou pirolíticos resultam da combustão incompleta de matéria orgânica, realizada sob condições de elevada temperatura e pressão. Aqueles de origem petrogênica são formados em escala de tempo geológica ou decorrente da liberação de petróleo puro ou seus subprodutos (DOUBEN, 2003).

Os HPAs de origem petrogênica podem ser produzidos a partir de subprodutos petrolíferos que estão presentes em diversos produtos de uso humano: combustíveis fósseis, produtos farmacêuticos, agrícolas, fotográficos, materiais lubrificantes, entre outros (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015). Além destes, outras atividades resultantes da intervenção humana contribuem para a disponibilidade de HPAs no ambiente como: lançamento de esgoto doméstico, óleo de embarcações, escoamento rodoviário, emissões industriais e acidentes durante o transporte e produção de combustíveis fósseis. Assim, sua distribuição no ambiente aquático ocorre pela movimentação das correntes, superfícies de lagos, córregos e oceanos (DOUBEN, 2003; ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015).

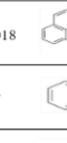
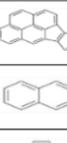
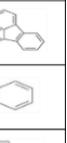
Os HPAs podem ser degradados via fotodegradação ou biodegradação. A biodegradação pode levar a formação de metabólitos tóxicos aos organismos expostos que tendem a se bioacumular devido a maior afinidade que apresentam pelas fases orgânicas presentes em sedimentos, solo e na biota em relação à água, resultante do coeficiente de partição entre solventes orgânicos e água (Ex: octanol) (DOUBEN, 2003). Além de apresentarem potencial de bioacumulação, o potencial mutagênico, carcinogênico, genotóxico e de desregulação endócrina de alguns HPAs são bem descritos na literatura (BAIRD; HOOVEN; MAHADEVAN, 2005, REYNAUD; DESCHAUX, 2006). Portanto, a inclusão desta classe de contaminantes em programas de biomonitoramento ambiental é importante para avaliar a qualidade ambiental em áreas aquícolas (NEFF, 1979; DOUBEN, 2003).

No Brasil, o monitoramento de HPAs nos recursos aquáticos é citado em duas resoluções: CONAMA nº 357/2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água, com destaque para áreas destinadas à maricultura (CONAMA, 2005), e CONAMA nº 393/2007, que prevê o monitoramento semestral realizado por atividades potencialmente poluidoras, tais como segmentos relacionados à indústria petrolífera (CONAMA, 2007). Além destas, o monitoramento desses compostos

também é previsto na resolução CONAMA nº 420/2009 que dispõe sobre os critérios e valores orientadores sobre a qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas (CONAMA, 2009), e na resolução CONAMA nº 454/2012 que estabelece diretrizes gerais e procedimentos para o gerenciamento do sedimento oriundo de dragagem portuária (CONAMA, 2012).

Entretanto, a legislação brasileira é incipiente e carece de informações mais robustas quanto às concentrações limites permitidos em áreas destinadas à maricultura, e os possíveis efeitos sob a biota aquática. A U.S EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos estabelece 16 hidrocarbonetos prioritários (Figura 3) para o monitoramento de poluentes orgânicos (EPA, 1986), sendo o criseno, HPA utilizado no presente estudo, um deles.

Figura 3. 16 HPAs considerados prioritários para o monitoramento de poluentes orgânicos, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos com os valores referência para concentrações aguda e crônica (EPA, 2010; EPA, 2015), valores máximos permitidos em áreas destinadas à maricultura (CONAMA nº 357/05) e estrutura química.

HPA	Aguda (µg/L)	Crônica (µg/L)	CONAMA 357/05 (µg/L)	Estrutura química	HPA	Aguda (µg/L)	Crônica (µg/L)	CONAMA 357/05 (µg/L)	Estrutura química
Acenafteno	232	55,8	-		Dibenzo[a,h] antraceno	1,17	0,282	0,018	
Acenaftileno	1,280	307	-		Fenantreno	79,7	19,1	-	
Antraceno	86,1	20,7	-		Criseno	8,49	2,04	0,018	
Benzo[a] antraceno	9,28	2,23	0,018		Fluoranteno	29,6	7,11	-	
Benzo[b] fluoranteno	2,82	0,677	0,018		Fluoreno	164	39,3	-	
Benzo[k] fluoranteno	2,67	0,642	0,018		Indeno [1,2,3-cd] pireno	1,14	0,275	0,018	
Benzo[g, h, i] perileno	1,83	0,439	-		Naftaleno	803	193	-	
Benzo[a] pireno	3,98	0,957	0,018		Pireno	42	10,1	-	

Fonte: BASTOLLA (2019)

Nota: Os traços (-) indicam HPAs que não apresentam concentrações limites determinadas pela respectiva legislação.

1.5 CRISENO E SEUS EFEITOS SOB OS ORGANISMOS AQUÁTICOS

O criseno (CHR) é um HPA de origem petrogênica e de alto peso molecular, constituído de quatro anéis aromáticos condensados (Figura 4). Além disso, apresenta duas regiões de baía, característica que confere maior carcinogenicidade e reatividade em contato com as biomoléculas. (DOUBEN, 2003). Portanto, CHR é um dos HPAs listados como prioritários no monitoramento de poluentes orgânicos de acordo com a U.S EPA-Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.

De acordo com a U.S EPA, os valores de referência para a concentração de criseno na coluna d'água em caso de contaminação aguda é de 8,49 µg/L (U.S EPA, 2015) e em caso de contaminação crônica de 2,04 µg/L (U.S EPA, 2010). No Brasil, os valores referência para concentrações limite permitidas em áreas destinadas a prática da maricultura é de 0,018 µg/L (CONAMA, 2007).

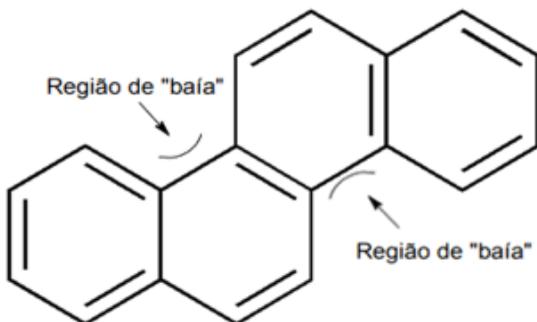
As características supracitadas conferem ao CHR potencial recalcitrante em relação à biodegradação e possibilita maior tempo de retenção do contaminante no ambiente, de forma que pode colocar em risco a saúde dos ecossistemas aquáticos (NAYAK et al., 2011). Segundo Tansel et al., (2011), CHR foi o HPA mais persistente na coluna d'água após o derramamento de óleo da *Deepwater Horizon* (DHW) no golfo do México, em relação a outros 3 HPAs avaliados (antraceno, fluoranteno e pireno). Estima-se que sua meia vida em águas rasas (100 a 150 m) seja de 2,5 anos e de quase 5 anos em água profundas (1000 m).

Além disso, CHR apresenta uma maior tendência em interagir com as membranas biológicas dos organismos aquáticos expostos, em comparação a outros HPAs como pireno e fenantreno, por exemplo. Essa característica, sob a ótica da ecotoxicologia aquática, e associada às demais citadas, evidencia o seu potencial de bioacumulação (BRUGGEMAN; VAN DER STEEN; HUTZINGER, 1982).

Uma vez presente no ambiente aquático, os organismos expostos ao CHR podem induzir a ativação do sistema citocromo P450, através da atuação de enzimas de fase I, e formar metabólitos potencialmente mais tóxicos que os compostos parentais e, conseqüentemente, com maior potencial de gerar estresse oxidativo nos indivíduos expostos, como criseno-1,2-dihydrodiol ou 1,4 crisenoquinona (SANTANA et al., 2018; FRANCO; LAVADO, 2019). Assim, estudos que avaliem potenciais efeitos decorrentes da exposição a CHR tornam-se necessários em diferentes espécies de organismos aquáticos. Abaixo, na tabela 1 consta

um levantamento bibliográfico com os trabalhos realizados nos últimos 10 anos envolvendo organismos aquáticos cultiváveis expostos a CHR.

Figura 4. Estrutura molecular do criseno (C₁₈H₁₂).



Fonte: Adaptado de U.S EPA (2015)

Estudos com vieiras *Chlamys farreri* (Johnes e Preston, 1904) expostas a CHR apontam alterações na atividade das enzimas de biotransformação, danos ao DNA, peroxidação lipídica e interferências no ciclo reprodutivo dos animais (XIU et al., 2015; GUO et al., 2017).

Além disso, Yao et al. (2017) observaram um aumento nos níveis de transcritos, em relação ao grupo controle, de 9 isoformas de GST em 7 tecidos analisados, com destaque para as glândulas digestivas em *C. farreri* expostas a duas concentrações de CHR durante 15 dias. Nesse sentido, tais resultados sugerem uma sinalização molecular relacionada ao processo de biotransformação deste HPA.

Em camarões *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) expostos a diferentes concentrações de CHR também foi relatado um decréscimo na capacidade antioxidante, associado a um aumento nas enzimas de biotransformação e na bioconcentração nos tecidos moles (REN; PAN; WANG, 2015).

Tabela 1. Levantamento bibliográfico acerca dos trabalhos realizados nos últimos 10 anos envolvendo organismos aquáticos de interesse para aquicultura expostos à criseno.

Espécie	Tecido	Dose	Duração (dias)	Biomarcadores	Referência
<i>Chlamys farreri</i>	Brânquias,	0,1 e 1 µg/L	21	Biotransformação,	Xiu; Pan; Jin-,
	glândula				
	músculo adutor,	0,2; 0,8; 3,2	15	estresse oxidativo	2015; Xiu; Pan;
	hemócitos	µg/L			Jun., 2016, Guo et al., 2017; Yao et al., 2017
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Brânquias,	0,3; 3,1; 14,7	21	Biotransformação,	Ren; Pan; Wang,
	músculo,	µg/L		estresse oxidativo	2015
	hepatopâncreas				

Espécie	Tecido	Dose	Duração (dias)	Biomarcadores	Referência
<i>Gadus morhua</i>	Fígado, bile, gônadas e sangue	0,5; 2,5 mg/kg	7	Biotransformação, antioxidantes, estresse oxidativo, índices de condição	Pampanin et al., 2016; Enerstvedt, Sydes, Pampanin, 2017; Enerstvedt et al., 2018
<i>Danio rerio</i>	pool	0,5-10µM	3	Desenvolvimento	Diamante et al., 2017
<i>Cyprinus carpio</i>	gônadas	IC50 µM	-	Síntese de hormônios esteróides	Fernandes, Porte, 2013

1.6 BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

A sobrevivência e a permanência de alguns organismos no ambiente natural estão diretamente relacionadas com o seu potencial de recuperação frente à diversas condições, como ameaças tóxicas e biológicas, especialmente em animais sésseis, que por vezes podem resultar na necessidade de regulações metabólicas (SANTOLINI et al., 2019). Sob a ótica da ecotoxicologia aquática, a resiliência dos organismos frente à presença de diferentes classes e cargas de xenobióticos é resultante da capacidade e eficiência em metabolizá-los. Esse processo caracterizado pela transformação de compostos complexos, em sua maioria com características lipofílicas, em subprodutos com maior hidrossolubilidade e mais facilmente excretáveis é denominado biotransformação de xenobióticos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Há uma relação direta entre o número de anéis aromáticos dos HPAs, lipofilicidade e seu respectivo grau de carcinogenicidade. Via de regra, HPAs com 3 ou mais anéis aromáticos apresentam maior toxicidade e lipossolubilidade, de forma que se faz necessário uma biotransformação mais eficiente em relação àquela necessária para HPAs menos complexos (ZHANG et al., 2016a, ZHANG et al., 2016b).

Na presença de HPAs, a indução de genes envolvidos na biotransformação, em animais aquáticos, ocorre através da ativação do receptor de hidrocarboneto aromático (*Aryl-hydrocarbon Receptor AhR*) que se desloca para o núcleo celular através do translocador nuclear de AhR (ARNT) e se liga à elementos responsivos presentes no DNA, como DRE (*dioxin-responsive-element*) e XRE (*xenobiotic-responsive-element*) (HAHN; STEGEMANN, 1994; GU; HOGENESCH; BRADFIELD, 2000). Esse processo é responsável pela modulação da transcrição de diferentes classes de genes, envolvidos na biotransformação de xenobióticos, como o citocromo P450 (CYP1A e CYP1B), a UDP-glucuronosil-transferase (UDPGT), a Glutathione-S-transferase (GST) e a NADPH-quinona redutase 1 (NQO1) (REWITZ et al., 2000; REGOLI et al., 2011; DENISON et al., 2011).

Paralelamente, a regulação das enzimas antioxidantes e de biotransformação está associada ao fator de transcrição (NRF2 - *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) que atua diretamente na transcrição de genes com o ARE (*antioxidant-response-element*) e o EpRE (*element-response-eletrophilic*) que podem promover aumento ou redução na capacidade de biotransformação e antioxidante dos animais frente a espécies reativas de oxigênio (EROs) através modulação de transcritos

envolvidos nesses processos (Ex: CAT, SOD mitocondrial e tioredoxina redutase 1 (YIN et al., 2016; DANIELLI et al., 2017). Estudos recentes sugerem que o mecanismo regulatório NRF2 também está presente em moluscos bivalves (TREVISAN et al., 2014; DANIELLI et al., 2017).

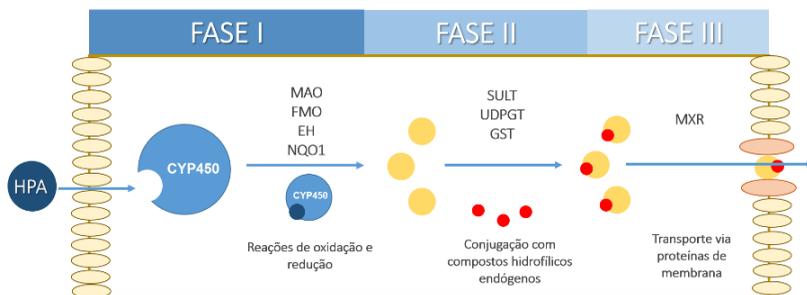
A fase I de biotransformação de xenobióticos conta com a atuação de enzimas da família do citocromo P450 (CYP450), as flavina monooxigenases (FAO), as NADPH quinona-redutases (NQO) e epóxido hidrolase (EH) que catalisam reações de oxidação, redução e de hidrólise. Essas alterações químicas nos grupos funcionais dos xenobióticos (Ex: –OH, –COOH, NO₂, entre outros) visam a geração de metabólitos com maior potencial de excretabilidade ou de interação em reações de conjugação à moléculas eletrofílicas endógenas, através de reações catalisadas pelas enzimas de fase II de biotransformação (REWITZ et al., 2006; OMIECINSKI et al., 2011). A atividade da enzima 7-etóxi-resorufina (EROD) é considerada um clássico biomarcador da primeira fase de biotransformação em vertebrados, e potencial em invertebrados, pois representa a atuação do CYP450 (CYP1A1 e CYP1B1) e pode ser correlacionada com a presença de contaminantes orgânicos como HPA e bifenilos policlorados (PCB) (CAJARAVILLE, 2000; DOUBEN, 2003; CHANG; WAXMAN, 2006; SIEBERT, 2017).

A fase II de biotransformação envolve a conjugação de um composto parental ou metabólito resultante da fase I com moléculas eletrofílicas endógenas, portanto, desempenham papel fundamental na desintoxicação e eliminação de xenobióticos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Esse processo é mediado por enzimas de conjugação, em sua maioria transferases, que catalisam reações de glucorunidação, sulfatação, metilação, acetilação, conjugação com aminoácidos e glutatona (OMIECINSKI et al., 2011). A preferência pela via de conjugação ocorre, em parte, em função da origem dos compostos ou metabólitos. Em compostos nucleofílicos, a rota de conjugação via glucorunidação é destacada. Em concentrações abundantes, a sulfatação pode competir com esta anterior, pelos metabólitos de HPAs. Via de regra, a principal via para compostos eletrofílicos e metabólitos é a conjugação com glutatona (GSH), que possui significativo papel no sistema de defesa antioxidante (enzimático e não enzimático), com destaque para superfamília das GST (abordada mais detalhadamente no tópico 1.7 deste documento) (GEORGE, 1994; OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Os produtos resultantes da fase I e II de biotransformação, com maior hidrossolubilidade, podem ser transportados para o meio extracelular através de proteínas de membrana que compõem o sistema

de resistência à múltiplos xenobióticos (MXR, do inglês *multixenobiotic resistance*). Em organismos aquáticos é bem descrita a presença da proteína transmembrana P-glicoproteína (P-gp), ainda que seus mecanismos regulatórios sejam pouco conhecidos (BARD, 2000).

Figura 5. Metabolismo de biotransformação de HPAs em organismos aquáticos.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

Nota: As fases de biotransformação estão representadas em escala decrescente de coloração azul e indicam o aumento da hidrossolubilidade resultante da desintoxicação. Nas extremidades, as formas ovais em amarelo claro representam a membrana fosfolipídica das células, local de entrada e saída dos HPAs. Os metabólitos e subprodutos resultantes da fase I de biotransformação estão representados pelos círculos amarelos. Os compostos eletrofílicos endógenos que serão conjugados durante a fase II estão representados pelos círculos vermelhos. Por fim, as proteínas de membrana envolvidas na fase III de biotransformação estão representadas pelas formas ovais em rosa-claro na extremidade direita

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros, provocam interrupção da sinalização e controle redox, podendo resultar em diferentes injúrias às biomoléculas como: danos ao DNA, peroxidação lipídica, carbonilação e formação de adutos de proteínas (SIES, 1993; SIES, 2015). Estudos evidenciam o potencial de estresse oxidativo em organismos aquáticos resultantes da exposição à diferentes HPAs (LÜCHMANN et al., 2014; DOS REIS et al., 2014; PIAZZA et al., 2016; ZACCHI et al., 2017; SIEBERT et al., 2017; LIMA et al., 2018).

Em condições fisiológicas basais pode ocorrer uma produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como no transporte de elétrons mitocondrial, microsomal ou outras reações oxidativas intracelulares. Entretanto, durante a fase I de biotransformação EROs podem ser produzidas em níveis mais elevados que aqueles considerados basais (LEI et al., 2015). As EROs podem ser classificadas em dois grandes grupos: radicais livres e espécies não-radicalares. Os radicais livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados, o que lhes confere maior grau de reatividade e maior potencial de danos celulares, por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-). As espécies não-radicalares, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apresentam menor grau de reatividade em relação aos radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Como medida de compensação das reações oxidativas realizadas pelas EROs e a fim de prevenir seus potenciais danos as macromoléculas, os organismos desenvolveram evolutivamente sistemas de defesa antioxidantes enzimático e não enzimático (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Antioxidantes podem ser definidos como “qualquer molécula que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato pró-oxidante, retarda significativamente ou previne os danos oxidativos”. O termo pró-oxidante está relacionado com as moléculas orgânicas e inorgânicas de natureza endógena ou exógena, como substâncias químicas presentes no ambiente, por exemplo, capazes de gerar EROs e/ou inibir as defesas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015, HALLIWELL, 2011).

O sistema de defesa antioxidante não-enzimático compreende compostos provenientes da dieta como: L-ácido ascórbico (Vitamina C), retinol (Vitamina A), α -tocoferol (Vitamina E) e carotenoides, e outros compostos endógenos como: glutathiona (GSH) ácido úrico e albumina (LIVINGSTONE, 2001, LESSER, 2006). Em destaque, a glutathiona é um tripeptídeo (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicine) presente nas células eucarióticas e desempenha papel fundamental no sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. Possíveis desequilíbrios entre a produção e utilização desta molécula pode resultar em estresse oxidativo e, a longo prazo, seus efeitos incluem alterações fisiológicas, desregulação endócrina, carcinogenicidade e morte (LESSER, 2006, HELLOU; ROSS; MOON, 2012). Em sua forma reduzida (GSH) atua como agente radioprotetor, e por vezes, pode estar envolvida no fornecimento de cobre para isoforma CuZn-SOD. Glutathiona também é cofator para a atuação de outras enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015, HELLOU; ROSS; MOON, 2012).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é composto por enzimas que atuam na minimização do potencial oxidativo de EROs (Figura 5). Entre elas, destacam-se: a Superóxido dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a Glutaciona Peroxidase (GPx), a Glutaciona Redutase (GR), a Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH). Paralelamente, as enzimas de biotransformação de fase II, como a Glutaciona-S-Transferase (GST), podem atuar em conjunto às enzimas antioxidantes.

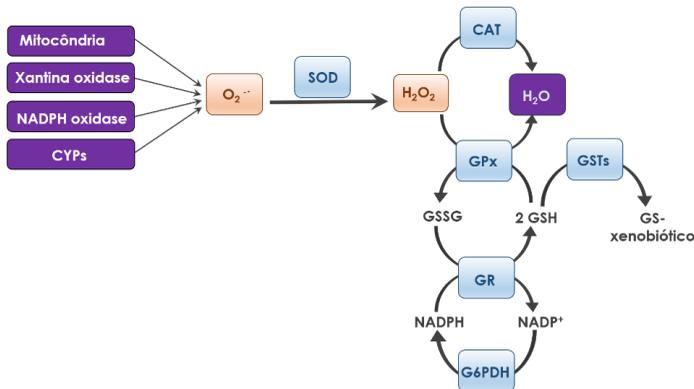
Considerada a primeira linha de defesa antioxidante, as SOD (EC 1.15.1.11) pertencem ao grupo de metaloenzimas que apresentam diferentes distribuições no meio celular (MILLER, 2012). A isoforma CuZn-SOD é a principal enzima citosólica presente em eucariotos, também encontrada nos cloroplastos, bactérias, peroxissomos e no meio extracelular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; MILLER, 2012). Atuam neutralizando ânions superóxido, através da sua dismutação e conversão em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A CAT (EC 1.11.1.6) é uma enzima clássica marcadora de peroxissomos e apresenta um grupo heme-funcional no seu sítio ativo. Atuam em conjunto com a SOD na eliminação de EROs geradas durante a biotransformação, através da degradação de H_2O_2 resultante em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; BIRBEN et al., 2012).

A GPx (EC 1.11.1.9), assim como a catalase apresenta atividade peroxidase. É encontrada nas formas selênio dependente (Se-GPx) ou não, no citosol e nas mitocôndrias de todos os animais. Catalisa a degradação de peróxidos através da reação dependente da doação de elétrons do tripeptídeo de GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Por sua vez, a manutenção da glutaciona no seu estado reduzido no meio celular é realizada pela GR (EC 1.8.1.7) que catalisa a reação de oxidação de NADPH em $NADP^+$ resultante da transformação de glutaciona dissulfídica (GSSG) em sua forma reduzida (GSH). Os intermediários redutores (NADPH) necessários para a manutenção do equilíbrio celular de glutaciona são fornecidos, entre outras, pela enzima G6PDH (EC 1.1.1.49), envolvida na via das pentoses, que atua como enzima auxiliar na regulação da relação GSH/GSSG celular (BAINY et al., 1996; BIRBEN, 2012).

De acordo com Hellou, Ross e Moon (2012), o mecanismo de desintoxicação envolvendo GSH pode ocorrer através de três vias distintas: 1) Formação de dímeros de GSSG através da doação do hidrogênio a molécula receptora, 2) Formação de conjugados, através da reação catalisada pela GST (EC 2.5.1.18) e 3) Ligação direta no caso de alguns metais e compostos reativos. A conjugação de xenobióticos eletrofílicos a glutaciona confere menor toxicidade e maior

hidrossolubilidade a estes, de forma que sua eliminação para o meio extracelular é facilitada (STEGEMAN; LECH, 1991). As superfamílias das GST apresentam ampla variedade de classes e polimorfismos e são encontradas nas frações: citosólica (*alfa, mu, pi, sigma, theta, zeta* e *ômega*), mitocondrial (*kappa*) ou microsossomais (MAPEG: *Proteínas associadas à membrana e envolvidas no metabolismo de eicosanoides e glutathiona - I, II e IV*) (HAYES, FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Assim, essa superfamília é muito usada como biomarcador de contaminação aquática em programas de biomonitoramento. Em ostras *C. gigas*, foi relatada a indução nos transcritos referentes as classes *mu* e *pi* na glândula digestiva em animais expostos a HPAs (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004).

Figura 6. Principais vias de produção das espécies reativas de oxigênio e atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante e de biotransformação.



Fonte: BASTOLLA (2017)

Nota: Destacado em roxo escuro as principais vias de produção de EROs celular: CYPs, Complexo Xantina e NADPH oxidase, além do metabolismo mitocondrial. Como exemplo, o ânion superóxido exemplifica a presença de EROs nos organismos aquáticos e a atuação das enzimas de defesa antioxidante e auxiliares: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathiona Peroxidase (GPx), Glutathiona Redutase (GR), Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) e Glutathiona S-transferase (GST).

1.8 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

Os biomarcadores podem ser compreendidos como alterações bioquímicas, moleculares ou celulares que refletem as respostas biológicas resultantes da exposição a diversos contaminantes presentes no ambiente aquático, e demonstram alterações em relação ao estado normal ou basal dos indivíduos (WALKER, 2016).

A presença de alguns contaminantes pode ser correlacionada com biomarcadores considerados clássicos em programas de monitoramento ambiental. Nesse contexto, a atividade de enzimas da fase I de biotransformação, como a atividade EROD, sugerem a ativação ou inibição do sistema de biotransformação em vertebrados e potencial em moluscos bivalves expostos a HPAs (SIEBERT et al., 2017). Enzimas da fase II de biotransformação, como as GSTs, também são frequentemente utilizadas como biomarcadores bioquímicos de exposição a HPAs e indicam a conjugação de moléculas endógenas com o xenobiótico, a fim de aumentar a hidrossolubilidade do composto e facilitar sua excreção (LÜCHMANN et al., 2011).

Conforme discutido no tópico 1.7 deste documento, as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR e G6PDH) também podem ser utilizadas como biomarcadores de exposição à diferentes classes de contaminantes, inclusive HPAs, pois refletem o estado do sistema de defesa frente às EROs geradas no processo de biotransformação. Além disso, quando analisadas em conjunto com outros biomarcadores como peroxidação lipídica e danos ao DNA, podem auxiliar na representação de um quadro de estresse oxidativo nos indivíduos expostos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; MONSERRAT et al., 2007).

No Brasil, ostras do gênero *Crassostrea* têm sido empregadas como organismos sentinela em programas de monitoramento ambiental, em especial as espécies *C. gigas* e *C. gasar* (ZANETTE et al., 2008; FLORES-NUNES, 2015; PESSATI et al., 2015; ZACCHI et al., 2017; LIMA et al., 2018). Entretanto, *C. rhizophorae* também se destaca como uma espécie comumente encontrada nos costões rochosos e responsiva frente à químicos ambientais (SILVA et al., 2005; ZANETTE; MONSERRAT; BIANCHINI, 2006; REBELO et al., 2010; PEREIRA et al., 2014; AGUIRRE-RUBÍ et al., 2017).

Andrade (2016) traduz muito bem o papel ecológico dos moluscos bivalves ao compará-los à “pequenas unidades filtradoras de água”. Estes animais possuem a capacidade de filtrar partículas de diferentes tamanhos que se encontram em suspensão na coluna d’água, inclusive contaminantes, através da respiração e alimentação. Também são

organismos sésseis, ou seja, vivem condicionados à fixação em um substrato (GOSLING, 2003). Além disso, são organismos que apresentam ampla distribuição geográfica na costa brasileira (vide tópico 1.3 deste documento).

O grupo de pesquisa LABCAI/UFSC estuda há mais de 20 anos os efeitos de diferentes classes de xenobióticos presentes no ambiente aquático sobre os biomarcadores de contaminação em organismos aquáticos, em especial peixes, moluscos bivalves e camarões. Estudos comparativos entre espécies de ostras exóticas e nativas (*C. gigas* e *C. rhizophorae*) iniciaram a partir de animais coletados em diferentes locais potencialmente poluídos por esgoto doméstico na Grande Florianópolis (ZANETTE et al., 2008).

Com a evolução da linha de pesquisa no grupo, surgiu o interesse em avaliar o efeito isolado de diferentes classes de xenobióticos presentes no esgoto, em organismos sentinela. Foram realizados os primeiros estudos com HPAs, utilizando ostras *C. brasiliana* expostas à fenantreno (LÜCHMANN et al., 2011; ZACCHI et al., 2017; LIMA et al., 2018). Os resultados gerados evidenciaram alterações significativas no metabolismo de biotransformação e de defesa antioxidante, em nível molecular e bioquímico, e demonstraram o potencial destes organismos como sentinelas da contaminação por compostos persistentes. Assim, novos trabalhos comparativos realizados entre *C. gigas* e *C. brasiliana* expostas a pireno (50 µg/L e 100 µg/L) e fluoreno (100 µg/L e 200 µg/L) durante 24 h e 96 h evidenciaram respostas distintas no sistema de defesa antioxidante e de biotransformação entre as espécies cultivadas na costa brasileira frente à HPAs (ZACCHI et al., 2017; SIEBERT et al., 2017).

Estudos comparativos sobre a biotransformação de HPAs e o sistema de defesa antioxidante em ostras do gênero *Crassostrea* expostas ao criseno podem auxiliar na elucidação dos efeitos destes contaminantes entre estas espécies que apresentam importância econômica, social e ecológica. Além disso, podem auxiliar na tomada de decisão em programas de monitoramento ambiental quanto a escolha de organismos sentinela responsivos a contaminação ambiental.

1.9 OBJETIVO GERAL

Avaliar comparativamente as respostas bioquímicas envolvidas na biotransformação e defesa antioxidante em três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* expostas a 10 µg/L de criseno durante 96 h.

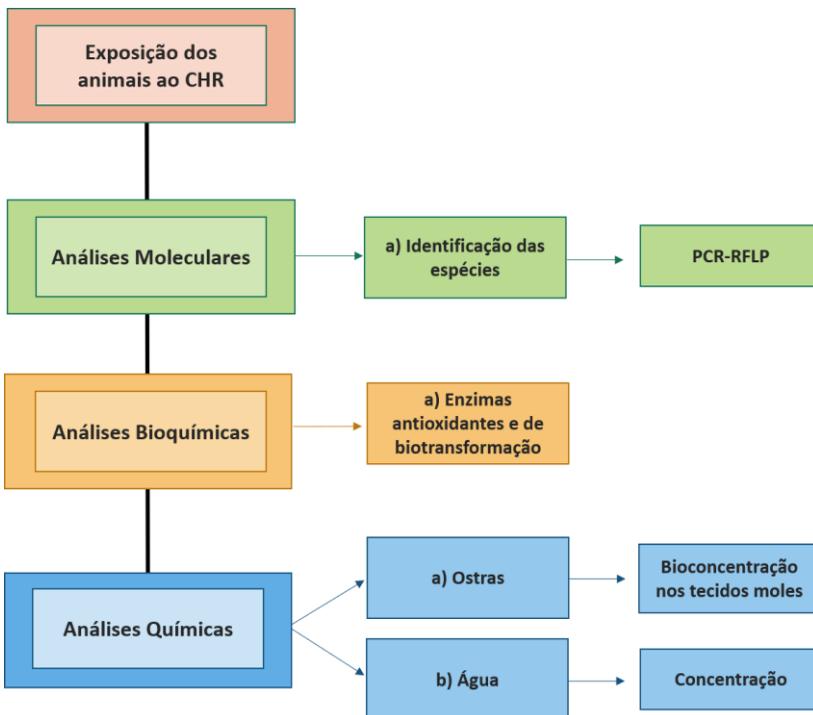
1.9.1 Objetivos específicos

- I. Analisar a atividade das enzimas antioxidantes e de biotransformação SOD, CAT, GPX, GST, GR e G6PDH em ostras *C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae* expostas 10 µg/L de criseno após 96 h;
- II. Quantificar os níveis de criseno na água dos aquários contendo as ostras *C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae* nos quatro períodos de exposição: T0, 24 h, 72 h e 96 h;
- III. Avaliar a concentração de criseno nos tecidos das ostras antes e após a exposição, a fim de verificar a bioconcentração (T0, T24 e T96).

1.10 ETAPAS METODOLÓGICAS

As principais etapas metodológicas realizadas no presente estudo estão representadas pela Figura 7 e o artigo resultante será submetido para publicação à revista *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology and Pharmacology* (ISSN: 1532-0456, IF: 2,426, Qualis B1-Área Zootecnia e Recursos Pesqueiros).

Figura 7. Esquema das etapas metodológicas utilizadas neste estudo para avaliação das respostas bioquímicas em três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* expostas à 10 µg/L de criseno durante 96 h.



2 ARTIGO CIENTÍFICO

Respostas bioquímicas em três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) expostas a criseno

Camila L. V. Bastolla¹; Daína Lima¹; Jacó J. Mattos²; Vera H.V. Dias¹; Bárbara P.H. Righetti¹; Carlos H.A.M. Gomes⁴; Guilherme de Toledo-Silva¹; Isis M. Martins dos Reis¹; Herculano Cella¹; Márcia C. Bícigo³; Satie Taniguchi³; Flávia L. Zacchi¹; Afonso C.D. Bainy¹

¹Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica - LABCAI, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

²Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola - NEPAq, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

³Laboratório de Química Orgânica Marinha - LABQOM, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Laboratório de Moluscos Marinhos - LMM, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar comparativamente a atividade das enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos (fase II) e no sistema de defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx, GR, G6PDH e GST) em brânquias e glândulas digestivas (n=10) nas três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* expostas a 10µg/L de CHR durante 96 h. Ostras expostas foram comparadas aos respectivos grupos controle (água do mar, salinidade 30, solvente DMSO 0,002%). As três espécies de ostras expostas ao CHR apresentaram consumiram o CHR na água dos aquários e apresentaram bioconcentração deste nos tecidos moles após 24 h e 96 h de exposição. Em brânquias de ostras *C. gigas* foi observado significativo decréscimo na atividade GR. A glândula digestiva das ostras expostas apresentou uma diminuição da atividade da SOD e aumento na atividade da CAT. Nas brânquias de *C. gasar* houve significativo decréscimo na atividade SOD e GR e aumento na atividade CAT. Nas brânquias de ostras *C. rhizophorae* expostas ao CHR foi observado aumento na atividade SOD e decréscimo na atividade G6PDH. Esta última enzima também apresentou diminuição da atividade nas glândulas digestivas em *C. rhizophorae*. Em uma visão global das respostas bioquímicas, as espécies *C. gigas* e *C. gasar* foram mais responsivas ao CHR, em comparação à espécie *C. rhizophorae*, sugerindo que as primeiras apresentaram maior sensibilidade à exposição ao CHR. Comparativamente, as distintas respostas à exposição ao CHR podem estar relacionadas com a plasticidade fenotípica apresentada pelas espécies em função dos respectivos nichos ecológicos que ocupam e a adaptação às respectivas condições ambientais.

Palavras-chave: Poluição aquática. HPA. Bioconcentração. Bivalve. Biomarcador. Enzimas antioxidantes. Biotransformação.

2.1 INTRODUÇÃO

A degradação dos ecossistemas aquáticos põe em risco a saúde dos ecossistemas e consequentemente do bem-estar humano. Neste contexto, uma das atividades que é afetada diretamente é a aquicultura, uma vez que depende diretamente da qualidade ambiental (Conama, 2005; Valenti, 2002). Esta susceptibilidade é relevante se considerarmos que esta atividade está relacionada à erradicação da fome e da pobreza, bem como ao saneamento básico e à segurança hídrica. Assim, a Organização das Nações Unidas (ONU) evidencia a aquicultura como parte vital no desenvolvimento das metas estabelecidas na Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável (Onu, 2015; Fao, 2018).

A aquicultura apresenta grande importância socioeconômica. Em 2016, a produção mundial de moluscos movimentou USD 29,2 bilhões de dólares (Fao, 2018), com destaque para a ostra mais cultivada no mundo, *C. gigas* (Thunberg, 1793). No Brasil, particularmente em Santa Catarina, esta espécie compreende 96,87% da produção nacional de ostras (EPAGRI, 2015; IBGE, 2017). Entretanto, as ostras do mangue *C. gasar* (Andanson, 1757) e *C. rhizophorae* (Guilding, 1828), consideradas espécies nativas, também apresentam potencial para maricultura em diferentes regiões da costa brasileira, além de apresentar relevância sócio-econômica nas comunidades ribeirinhas envolvidas nesta atividade (Balden; Bendhack, 2009).

Entre os diversos compostos químicos presentes no ambiente aquático, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são utilizados ou produzidos em diferentes setores químicos, como: combustíveis fósseis, produtos farmacêuticos, agrícolas, fotográficos, materiais librificantes, entre outros. Os HPAs podem ser disponibilizados no ambiente aquático por diversas vias, tais como lançamento de esgoto doméstico, descarte ou derrame de óleo de embarcações, escoamento rodoviário, emissões industriais e acidentes durante o transporte e produção de combustíveis fósseis (Douben, 2003; Abdel-Shafy; Mansour, 2015).

O potencial de bioacumulação, mutagênico, carcinogênico, genotóxico e de desregulação endócrina dos HPAs é bem descrito na literatura (Baird; Hooven; Mahadevan, 2005; Reynaud; Deschaux, 2006). Portanto, a inclusão dessa classe de contaminantes em programas de biomonitoramento ambiental se faz necessária para a avaliação da qualidade ambiental nas áreas aquícolas.

O criseno (CHR) é um HPA de origem petrogênica de alto peso molecular, constituído de quatro anéis aromáticos condensados. CHR é

um dos 16 HPAs listados como prioritários no monitoramento de poluentes orgânicos de acordo com a Agência de Proteção dos Estados Unidos (U.S EPA). Apresenta duas regiões de baía, característica que conferem maior carcinogenicidade e reatividade quando sofre biotransformação (Douben, 2003). Além disso, CHR é mais persistente em coluna d'água (Tansel et al., 2011) em relação aos demais HPAs, e apresenta alta capacidade de interação com as membranas biológicas e elevado potencial de bioconcentração em organismos expostos, (Bruggeman; Van der Steen; Hutzinger, 1982). As características supracitadas conferem ao CHR menor susceptibilidade à biodegradação e maior tempo de retenção do contaminante no ambiente, colocando em risco a saúde dos ecossistemas aquáticos.

Uma vez em contato com o organismo aquático, CHR pode induzir a ativação do complexo citocromo P450, a fim de aumentar sua polaridade para ser mais facilmente excretável pelas células diretamente ou conjugado à moléculas eletrofílicas endógenas, através de reações catalisadas pelas enzimas de fase II de biotransformação (Rewitz et al., 2006; Oost; Beyer; Vermeulen, 2003; Omiecinski et al., 2011). Entretanto, a biotransformação do CHR pode formar metabólitos potencialmente mais tóxicos que os compostos parentais e, conseqüentemente, com maior potencial de gerar estresse oxidativo nos indivíduos expostos, como crisenol-1,2-dihidrodiol ou 1,4 crisenolquinona (Lei et al., 2015; Santana et al., 2018; Franco; Lavado, 2019).

Estudos anteriores mostraram alterações na atividade de enzimas antioxidantes e de biotransformação, danos ao DNA, peroxidação lipídica e interferências no ciclo reprodutivo em organismos aquáticos (Xiu; Pan; Jin, 2014, Xiu et al., 2015; Xiu; Pan; Jin, 2015, Ren;Pan;Wang, 2015; Guo et al., 2017; Yao et al., 2017; Pampanin et al., 2018).

As enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR) Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e de biotransformação Glutathione S-transferase (GST) são frequentemente utilizadas como biomarcadores de exposição à diferentes contaminantes, inclusive HPAs, pois fornecem um panorama do sistema de defesa frente às EROs geradas no processo de biotransformação. Além disso, quando analisadas em conjunto com outros biomarcadores como peroxidação lipídica e danos ao DNA, podem indicar um quadro de estresse oxidativo nos indivíduos expostos (Oost; Beyer; Vermeulen, 2003).

Ostras do gênero *Crassostrea* têm sido empregadas como organismos sentinela em programas de monitoramento ambiental, em

especial as espécies *C. gigas* e *C. gasar* (Zanette et al., 2008; Flores-Nunes, 2015; Pessati et al., 2015; Zacchi et al., 2017; Lima et al., 2018). Entretanto, *C. rhizophorae* também é uma espécie comumente encontrada nos costões rochosos e responsiva à exposição a contaminantes ambientais (Silva et al., 2005; Zanette; Monserrat; Bianchini, 2006; Rebelo et al., 2010; Pereira et al., 2014; Aguirre-Rubí et al., 2017).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar comparativamente as respostas bioquímicas associadas aos sistemas de biotransformação (fase II) e de defesa antioxidante em três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* (*C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae*) expostas à criseno na concentração nominal de 10 µg/L durante 96 h. Através de estudos comparativos será possível avaliar a sensibilidade particular de cada espécie à presença de determinados contaminantes, o que poderá auxiliar na definição dos organismos sentinela mais adequados para a realização de programas de biomonitoramento ambiental e o estabelecimento de condições mais adequadas para o desenvolvimento da ostreicultura.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Delineamento experimental

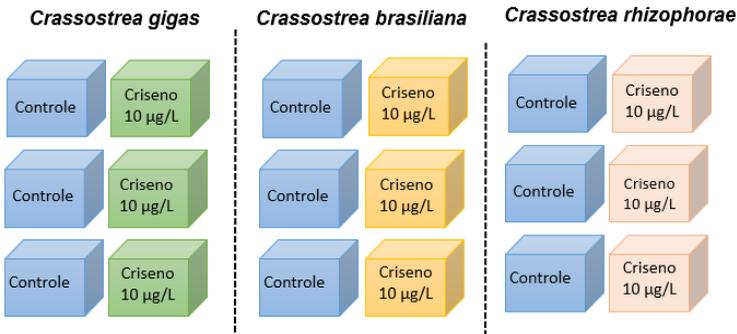
Os animais utilizados no presente estudo foram obtidos a partir do banco de reprodutores do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil), com desova realizada simultaneamente. Após 6 meses da desova e larvicultura, as ostras *C. gigas* ($7,51 \pm 0,54$ cm), *C. gasar* ($4,41 \pm 0,45$ cm) e *C. rhizophorae* ($2,76 \pm 0,24$ cm), foram transportadas até a sala de Bioensaios do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI/UFSC).

No laboratório, os grupos experimentais foram realizados em triplicata para controle e exposto de cada espécie, separadamente. As ostras foram distribuídas em aquários de 20 L (3 L de água por ostra) e mantidas nas seguintes condições: salinidade 30‰, temperatura de 23°C, pH $7,8 \pm 0,1$, amônia de 0 a 0,25 mg/L, fotoperíodo 12 h. O criseno (Sigma-Aldrich, 98% de pureza) foi dissolvido em dimetil sulfoxido (DMSO) e adicionado aos aquários de exposição nos respectivos tratamentos (*C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae*) para atingir a concentração nominal de 10 µg/L de CHR à concentração final de DMSO de 0,002% (v/v) (Figura 8). A concentração de CHR utilizada foi definida de acordo com os valores críticos para contaminação aguda estabelecidas pela EPA (2015) definida como passível de oferecer risco aos organismos

expostos. Os grupos controles também foram mantidos com 0,002% (v/v) de DMSO. A aeração foi mantida constante durante o período de exposição, com fonte de ar externa ao local de exposição.

Os animais foram alimentados a cada 36 h com dieta constituída pelas microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana* na proporção 2:1, respectivamente, e concentração total entre 20 e 25 ($\times 10^4$ cel/mL) com duração de 2 h, em água do mar limpa. Foi adotado o regime de alimentação a cada 36 h, de forma que os animais permaneceram 24 h de jejum antes da dissecação. Após a alimentação, foi realizada a renovação total da água dos aquários e a adição de CHR nas condições supracitadas. Ao final do período de exposição, de cada aquário, foram coletadas 4 ostras para análises biológicas ($n = 12$) e 2 ostras para análises químicas (*pool* de 6 ostras). Os animais tiveram suas brânquias e glândulas digestivas dissecadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para as análises enzimáticas.

Figura 8. Delineamento experimental do presente estudo adotado para a exposição em 96 h.



Fonte: Elaborado pela autora.

2.2.2 Extração e quantificação do CHR na água dos aquários

A concentração de criseno na água dos aquários foi monitorada durante 4 tempos: t_0 , t_{24} , t_{72} e t_{96} . Foram coletados 100 mL de água de cada tratamento, acondicionados em frascos âmbar de 100 mL com batoque, e então foi adicionado 5 mL de n-hexano padrão analítico (P.A) como solvente extrator do CHR.

Após, o volume total (água coletada com n-hexano) foi transferido para um funil de separação em vidro (125 ml, tipo pêra) e agitado para separação de fases. O sobrenadante resultante foi submetido a duas novas extrações com n-hexano (3 ml e 2 ml, respectivamente). Por fim, o volume coletado foi amostrado e quantificado por fluorimetria utilizando-se espectrofluorímetro Spectramax M5, Molecular Devices (Sunnyvale, EUA), com excitação a 267 nm e emissão a 376 nm, no módulo de leitura de cubeta, com intervalo de leitura de 1 min.

As unidades de RFU obtidas foram convertidas em $\mu\text{g/L}$ por regressão linear de uma curva padrão de criseno, com concentrações de 0,1 a 10 $\mu\text{g/L}$ realizadas nas mesmas condições experimentais (salinidade 30 ‰, temperatura 23 °C, DMSO 0,002%).

2.2.3 Concentração de CHR nos tecidos moles das ostras

A quantificação dos CHR foi realizada em *pool* de tecidos moles (n=6 animais) de cada tratamento em 24 h e 96 h de exposição e em um *pool* de seis animais coletados imediatamente antes do início de cada experimento (t_0). 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- d_8 , acenaftaleno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} (5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 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 $\text{ng}/\mu\text{L}$) foi adicionado. A determinação de CHR nos tecidos das ostras foi efetuada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GS-MS) com modo de aquisição SIM (monitoramento seletivo de íons). A quantificação de CHR foi realizada por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard (New Haven, EUA) e Fluka (St Louis, EUA).

O composto analisado no GC-MS também foi identificado através do íon de quantificação (razão massa/carga, m/z). A quantificação foi realizada por razões entre os padrões internos e o composto de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 5 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

2.2.4 Confirmação molecular das espécies

A confirmação molecular das três espécies de ostras foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Pie et al. (2006). Foi realizada extração de DNA genômico (gDNA) de manto em *Crassostrea gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae* utilizando o Kit *DNeasy Blood and Tissue* (QIAGEN). O gDNA extraído (=50 ng/ μ L) foi submetido à RFLP-PCR, com amplificação do gene rDNA16S, sequências: (16S.AR: ‘5-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3’) e 16S.BR (‘5-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3’). Após, foi realizada a digestão com enzima de restrição Anza 68 BsuRI (Invitrogen) e o produto foi analisado em gel de agarose 3%. Para diferenciação das espécies foram utilizados controles positivos com base nos diferentes tamanhos de produto: *C. gigas*: 395 pb, *C. gasar*: 235 pb, *C. rhizophorae*: 261 pb.

2.2.5 Ensaios enzimáticos

As amostras de brânquias e glândulas digestivas de ostras expostas ao CHR e seus respectivos grupos controle foram pesadas 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 para obtenção da fração citosólica. O sobrenadante foi separado em alíquotas e congelado a -80°C para ensaios das atividades enzimáticas. A concentração de proteínas totais dissolvidas na fração citosólica 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 foram utilizados para o cálculo de atividade específica de cada enzima.

A atividade SOD (EC 1.15.1.1) foi quantificada conforme método indireto descrito por McCord e Fridovich (1969), através da inibição da redução do citocromo C na presença do sistema gerador $O_2^{\cdot-}$ de xantina/xantina oxidase. O ensaio foi realizado em microplaca e quantificado em 550 nm a 25 °C. A atividade está apresentada em U/mg de proteína.

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi verificada de acordo com a metodologia proposta por Aebi (1984), com base na decomposição de H_2O_2 ($\epsilon = 0,0436 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). 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) e H_2O_2 10,4 mM. A atividade está apresentada em U/mg de proteína.

A atividade da GPx (EC 1.11.1.9) 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 e GSH 0,1 M. A atividade está apresentada em mU/mg de proteína.

De acordo com Keen (1976), as atividades de GST (EC 2.5.1.18) total foram detectadas através da reação de conjugação com o 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. A atividade está apresentada em mU/mg de proteína.

Ao reduzir glutatona dissulfídica, atividade da GR (EC 1.8.1.7) é mensurada pela taxa de oxidação de NADPH, a 340 nm por 5 min a 25 °C, conforme a metodologia descrita por Carlberg 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 está apresentada em mU/mg de proteína.

A metodologia descrita por Glock e McClean (1953) para detecção da atividade da G6PDH (EC 1.1.1.49) 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, Glicose 6-fosfato registrado durante 5 minutos a 25°C. A atividade está apresentada em mU/mg de proteína.

2.2.6 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão. Os dados de atividade enzimática foram analisados estatisticamente quanto à presença de *outliers* (Teste de Grubbs), normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Bartlett). Para avaliar comparativamente o consumo de CHR na água dos aquários de cada espécie foi aplicada ANOVA, seguido de pós-teste para comparação de médias Tukey (5%), quando necessário. Para a comparação das atividades enzimáticas nos grupos controle das espécies de ostras foi utilizada análise de variância ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey (5%) para comparação de médias, quando necessário. Para comparação das respostas bioquímicas

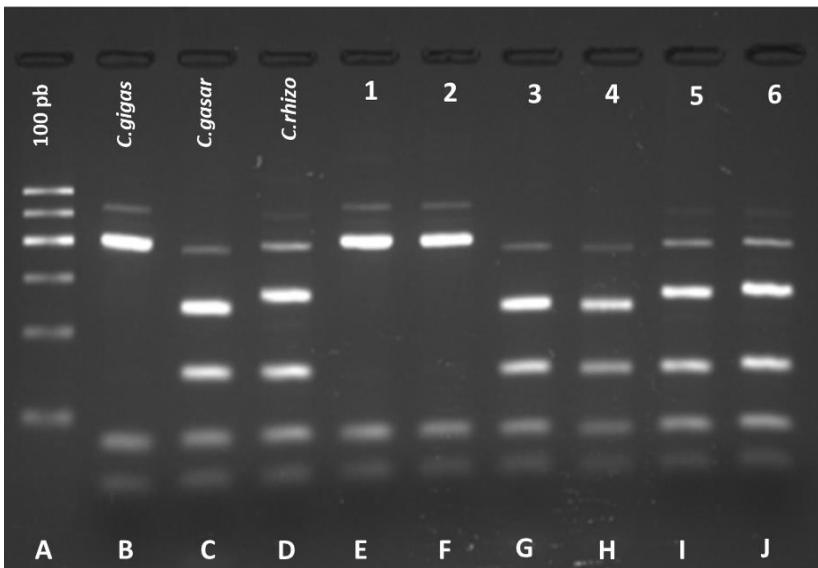
entre os grupos controle e expostos de cada espécie foi utilizado Teste t (5%). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas e apresentação dos gráficos foram geradas utilizando o *Software GraphPad Prism 7.0*

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Confirmação molecular das espécies via PCR-RFLP

De acordo com o RFLP-PCR (Figura 9), foi possível observar que as amostras analisadas pertenciam às respectivas espécies *C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae*, anteriormente diferenciadas fenotipicamente.

Figura 9. Imagem do gel de eletroforese em agarose 3% do produto da PCR após digestão com a enzima de restrição Anza 68 BsuRI.



Fonte: Elaborado pela autora

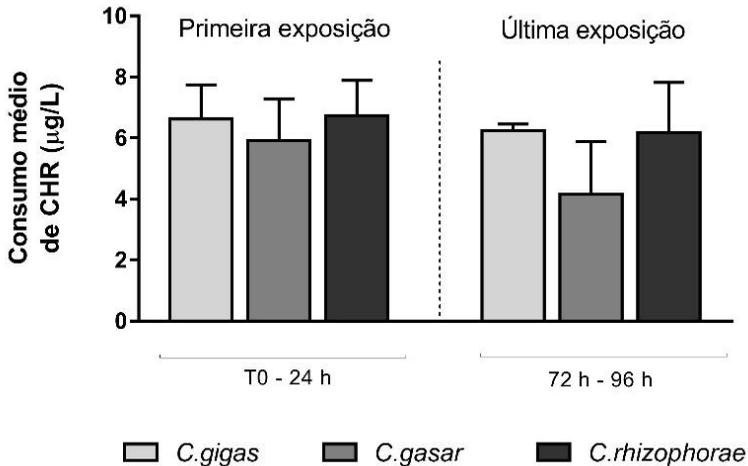
Nota: (A) marcador molecular de 100 pb, (B) controle positivo para a espécie *Crassostrea gigas* com 395 pb, (C) controle positivo para a espécie *Crassostrea gasar* com 235 pb, (D) controle positivo para a espécie *Crassostrea rhizophorae* com 261 pb, (E, F) indivíduos correspondentes à espécie *C. gigas*, (G, H) à espécie *C. gasar*, e (I, J) à espécie *C. rhizophorae*.

2.3.2 Concentração do CHR na água dos aquários e nos tecidos moles das ostras

A concentração de crisenol na água (Figura 10) foi monitorada durante 4 tempos: t0, 24 h, 72 h e 96 h nos aquários de *C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae*. Os valores estão apresentados sob a forma de consumo médio por espécie (média \pm desvio padrão) e foi estimado através da diferença (Δ) entre o período de exposição (t0, 72 h) e o respectivo período de consumo (24 h, 96 h). Nossos resultados sugerem que as três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* avaliadas no presente estudo apresentaram consumo médio do CHR na água dos aquários, em ambos tempos de exposição.

Ao final de 24 h de exposição foi observado consumo de CHR na água dos aquários (Δ t0-24 h) da ostra nativa *C. rhizophorae*, de cerca de 6,73 $\mu\text{g/L}$. Semelhante à esta espécie, ostras *C. gigas* apresentaram consumo médio de 6,62 $\mu\text{g/L}$ de CHR. Em *C. gasar* foi observado consumo médio de 5,91 $\mu\text{g/L}$ de CHR. Ao final de 96 h, não foram observadas variações entre o consumo médio (Δ 72 h-96 h) em *C. gigas* em relação à primeira exposição, que apresentou concentração de 6,24 $\mu\text{g/L}$ de CHR na água dos aquários. Entretanto, nas espécies nativas observou-se leve decréscimo no consumo médio CHR na água dos aquários, ainda que não significativamente, em relação à primeira exposição: 4,17 $\mu\text{g/L}$ em *C. gasar* e 6,20 $\mu\text{g/L}$ em *C. rhizophorae*.

Figura 10. Representação gráfica do consumo médio de CHR realizado pelas ostras do gênero *Crassostrea* expostas à 10 µg/L de criseno.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os dados estão apresentados sob a forma de consumo médio de CHR (µg/L) de criseno extraído em solvente n-hexano. O consumo médio das respectivas espécies foi estimado considerando a diferença entre o momento da exposição e a respectiva coleta dos animais (Primeira exposição: Δ tempo zero-24 h e última exposição: Δ 72 h-96 h).

O termo “*ecosystem engineers*” é utilizado para denominar organismos que apresentam papel ecológico relacionado ao controle da disponibilidade de recursos para outras espécies, através de mudanças nos processos bióticos e abióticos (Gutiérrez et al., 2003). Os moluscos bivalves são organismos filtradores com grande potencial de bioacumulação, através da cadeia trófica, ou bioconcentração de contaminantes do ambiente por outras vias de absorção (Schöne; Krause, 2016; Yancheva et al., 2018).

As brânquias são órgãos envolvidos diretamente nos processos de respiração, alimentação e absorção e, conseqüentemente, estabelecem primeiro contato com os contaminantes presentes no ambiente aquático (Gosling, 2003). Nesse sentido, é plausível inferir que o desaparecimento do CHR observado na água dos aquários do presente estudo esteja relacionado, com a bioconcentração deste contaminante nos animais,

apesar de que este contaminante poder também ter se aderido ao próprio aquário ou às conchas das ostras.

No entanto, as pequenas diferenças observadas nos valores médios de consumo de CHR nas três espécies pode indicar a existência de diferentes estratégias fisiológicas existente entre elas. Bivalves possuem a capacidade de modificar determinados comportamentos frente a uma adversidade ambiental, tais como abertura ou fechamento das valvas, alteração na frequência e padrão de batimento ciliar, aumento ou redução na área do sifão exalante e na distância interfilamentar das brânquias (Cranford; Ward; Shumway, 2011).

Outros parâmetros fisiológicos, como taxa de filtração e de clareamento, também podem variar em bivalves e refletir um panorama do estado de saúde dos organismos, além de indicar possíveis efeitos de longo prazo resultante de exposição a agentes estressores e químicos ambientais (Bayne et al., 1979). Taxa de filtração e de clareamento podem ser definidas como o volume de água que flui pelas brânquias dos animais em determinada unidade de tempo, expressos em litro por hora por grama de tecido seco (= L/h/g). São parâmetros passíveis de sofrer influência significativa resultante de variáveis bióticas (espécie, tamanho, sexo e idade) e abióticas (salinidade, temperatura, concentração de partículas) e podem apresentar diferentes respostas intra e inter-específicas (Gosling, 2003).

Em ostras *C. gigas*, a taxa de filtração nas brânquias pode ser equivalente a 3,92 DW^{0,50} a 20 °C (Bougrier et al., 1995). Em contrapartida, foi relatado que a espécie nativa *C. rhizophorae* apresenta 4,6 vezes maior capacidade de remoção de partículas que se encontram em suspensão na água em relação à ostra exótica, com taxa de filtração de 17,99 DW^{0,76} a 25 °C. Esse valor é muito superior a maioria dos valores encontrados na literatura para bivalves e um dos mais altos para o gênero *Crassostrea* (Sroczyńska; Barroso; Chícaro, 2012). Embora não tenham apresentado diferenças estatísticas, nossos resultados mostram pequenas diferenças no consumo de CHR na água dos respectivos aquários das três espécies avaliadas, com destaque para consumo observado em *C. rhizophorae*, corroborando dados da literatura.

Estudos relatam que a taxa de clareamento em bivalves é sensível a contaminantes orgânicos (Donkin et al., 1989; Takayanagi et al., 2000; Toro; Navarro; Palma-Fleming, 2003). Entretanto, as estratégias fisiológicas observadas em bivalves expostos à HPAs podem variar em função da concentração e tempo de exposição. Ostras *C. gigas* expostas à 10 HPAs (50 µg/L) durante 7 dias não apresentaram alterações na taxa de clareamento em relação ao grupo controle. Entretanto, quando expostas à

maior concentração (200 µg/L) e condicionadas à exposição crônica (4 semanas) apresentaram significativa diminuição na taxa de clareamento (Jeong e Cho., 2007).

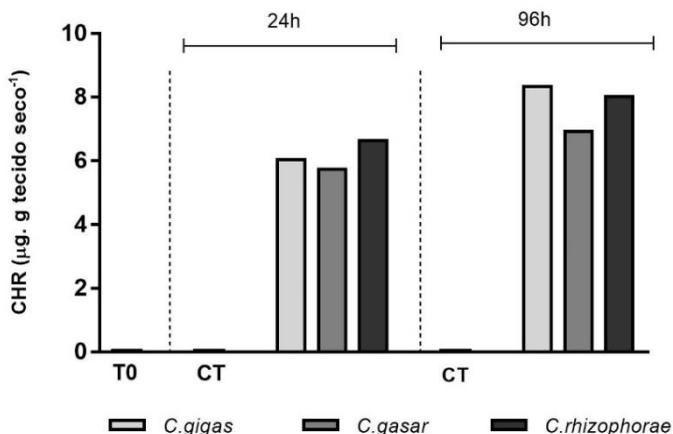
Além disso, também foi observado um efeito narcótico inespecífico de HPAs sobre os cílios branquiais em *Mytilus edulis* que poderiam favorecer a ingestão e bioacumulação destes contaminantes (Axiak; George, 1987). Nesse sentido, pode-se sugerir que o consumo de CHR na água e o padrão similar observado na primeira e última exposição em *C. gigas* e *C. rhizophorae* estejam relacionados com estes fatores (Figura 10). Em contrapartida, bivalves podem diminuir o bombeamento de água como uma estratégia fisiológica de defesa, a fim de reduzir a ingestão destes. Estudos com mexilhões *Mytilus edulis* relatam o fechamento das valvas e o decréscimo de 50-97% na taxa de clareamento como parte das respostas fisiológicas resultantes da exposição à B[a]P, fluoranteno e óleo diesel (Eertman et al., 1995; Redmond et al., 2016).

Apesar da quantificação do CHR na água dos aquários indicar distintos comportamentos fisiológicos entre as espécies de ostras expostas, a determinação da concentração nos tecidos moles é necessária para avaliar a real ingestão destes e o potencial de concentração nos tecidos moles. Ostras *C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae* expostas à 10 µg/L de CHR durante 24 h e 96 h, e seus respectivos grupos controle, tiveram seus tecidos moles coletados e quantificados para verificar a bioconcentração do contaminante e avaliar possíveis efeitos na atividade das enzimas de antioxidantes e de biotransformação (Figura 11).

A concentração de crisenos no tempo zero (T0) e respectivos grupos controle para cada espécie foram inferiores ao limite de detecção do método (0,025 µg/g tecido seco), portanto estão representadas de forma única no gráfico abaixo. Ao final de 24 h de exposição, nossos resultados mostram que houve bioconcentração de crisenos nas três espécies de ostras avaliadas. Ostras *C. rhizophorae* apresentaram a maior bioconcentração de CHR em relação às demais, aproximadamente 6,63 µg/g de tecido seco. Em ostras *C. gigas* a concentração foi de 6,03 µg/g tecido seco e em *C. gasar* 5,73 µg/g tecido seco. Esses resultados corroboram com a quantificação do CHR na água dos aquários (Figura 10) realizada ao final de 24 h, em que mostra consumo do contaminante em ostras *C. rhizophorae*. Ao final de 96 h, também foi observado aumento na concentração de crisenos nos tecidos das ostras expostas, conforme padrão apresentado em 24 h de exposição. As ostras *C. gigas* e *C. rhizophorae* apresentaram as maiores concentrações de CHR, de 8,34 µg/g e 8,02 µg/g tecido seco, respectivamente. Em *C. gasar* foi observada

menor bioconcentração de CHR em relação às demais espécies, aproximadamente 6,91 $\mu\text{g/g}$ de tecido seco.

Figura 11. Quantificação de CHR nos tecidos das ostras *C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae* expostas à 10 $\mu\text{g/L}$ de CHR durante 24 h e 96 h, e respectivos grupos controle (CT).



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: T0 (tempo zero) representa ostras coletadas no início do experimento. A análise foi realizada em um *pool* de seis ostras ($n = 6$) para cada grupo.

O potencial de interação dos HPAs com as membranas biológicas pode ser mensurado através da lipofilicidade, determinado pelo respectivo coeficiente de partição octanol-água (P_{ow}) em solventes orgânicos (Librando; Sarpietro; Castelli, 2003). Nesse contexto, CHR apresenta K_{ow} de 5,91 e, portanto, demonstra alta capacidade de interação com as membranas biológicas em relação a outros HPAs com 3 e 4 anéis aromáticos em sua composição, como fenantreno ($K_{ow} = 4,63$) e pireno ($K_{ow} = 5,22$) (Bruggeman; Van der Steen; Hutzinger, 1982).

Resultados similares foram observados no estudo realizado por Guo et al., (2017) que observou um rápido e significativo aumento na concentração de CHR nos tecidos moles de vieiras *Chlamys farreri*, e que foram influenciados pela dose ou tempo de exposição. Em camarões *L. vannamei* expostos à 0,3 $\mu\text{g/L}$ de CHR também foi observada uma rápida e significativa bioconcentração deste HPA nas brânquias, atingindo uma saturação ou “efeito platô” em 6 dias. Entretanto, no hepatopâncreas não

foi observado o mesmo padrão em animais expostos à 2,1 e 14,7 µg/L de CHR (Ren; Pan; Wang, 2015).

2.3.3 Atividade das enzimas antioxidantes e de biotransformação

Após a exposição à criseno na concentração de 10 µg/L durante 96 h, dez ostras de cada espécie (*C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae*) e seus respectivos grupos controle foram utilizados para análise de biomarcadores bioquímicos. As atividades das enzimas SOD, CAT, GPx, GR, G6PDH e GST foram analisadas nas brânquias e glândulas digestivas.

2.3.3.1 Distinções constitutivas: comparação entre os grupos controles das três espécies

Em uma visão global das respostas bioquímicas, por biomarcador, nos respectivos grupos controles (Tabela 2) é possível observar diferenças nas atividades das enzimas do sistema de defesa antioxidante e de biotransformação entre as três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* utilizadas no presente estudo em ambos tecidos-alvo.

As ostras do mangue, com destaque para *C. gasar*, apresentaram maior atividade nas enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante em brânquias e glândulas digestivas, em relação à espécie exótica *C. gigas* (Tabela 2). As enzimas auxiliares GR e G6PDH variaram significativamente entre as três espécies em função do tecido-alvo analisado. Nas brânquias, as ostras nativas, com destaque para *C. rhizophorae*, apresentaram maior atividade GR em relação à *C. gigas*. Entretanto, nas glândulas digestivas foi observada maior atividade na espécie *C. gigas* e *C. rhizophorae*, respectivamente, em relação à *C. gasar*. A atividade G6PDH foi, aproximadamente, duas vezes maior na espécie nativa *C. gasar* em brânquias e glândulas digestivas, em comparação às demais espécies de ostras. Não foram observadas diferenças significativas entre espécies em relação a enzima de biotransformação GST nas brânquias das ostras, entretanto, a atividade GST foi significativamente maior nas glândulas digestivas de *C. gigas* em relação à atividade em brânquias de *C. gasar* e *C. rhizophorae*.

Tabela 2. Dados comparativos referentes a atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona-S-Transferase (GST) Glutaciona Redutase (GR) e Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em brânquias e glândulas digestivas dos grupos controle nas três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* avaliadas.

Tecido	Espécie	Biomarcadores Bioquímicos					
		SOD	CAT	GPx	GR	G6PDH	GST
Brânquias	<i>C.gigas</i>	105,34 ± 22,11 ^a	86,43 ± 16,38 ^a	9,72 ± 1,30 ^a	14,69 ± 5,19 ^a	74,7 ± 7,78 ^a	157,53 ± 70,01
	<i>C.gasar</i>	138,04 ± 32,40 ^b	172,84 ± 30,09 ^b	13,70 ± 2,61 ^b	26,53 ± 8,21 ^b	122,9 ± 14,68 ^b	122,91 ± 24,25
	<i>C.rhizo</i>	134,88 ± 4,43 ^b	77,7 ± 23,74 ^a	11,6 ± 1,78 ^{a,b}	37,23 ± 6,77 ^c	53,2 ± 5,32 ^c	108,72 ± 28,72
Glândula digestiva	<i>C.gigas</i>	185,02 ± 50,16 ^a	118,30 ± 19,06 ^a	23,07 ± 2,44 ^a	31,81 ± 6,86 ^a	26,3 ± 5,66 ^a	470,6 ± 215,65 ^a
	<i>C.gasar</i>	288,71 ± 58,97 ^b	480,19 ± 80,08 ^b	27,8 ± 4,84 ^b	23,9 ± 11,53 ^b	45,39 ± 7,20 ^b	221,3 ± 35,20 ^b
	<i>C.rhizo</i>	249,1 ± 34,95 ^b	270,56 ± 60,82 ^c	21,71 ± 2,70 ^a	29,15 ± 5,47 ^c	21,74 ± 4,24 ^a	72,8 ± 17,85 ^c

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Os dados de atividades enzimáticas referente aos grupos controles estão apresentados sob a forma de média ± desvio padrão (n=10). Os resultados foram separados por espécie e respectivo tecido avaliado. Assim, para fins comparativos entre espécie e tecido, a leitura da tabela deve ser realizada na vertical. As letras demonstram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às espécies avaliadas por tecido para o biomarcador.

Interessante observar que, de uma maneira geral, *C. gigas* apresenta uma menor atividade dos sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos, acompanhado de uma maior atividade da enzima GST, tanto na brânquia, como na glândula digestiva (Tabela 2). As diferenças nas respostas bioquímicas apresentadas nestas três espécies do gênero *Crassostrea* podem estar relacionadas com a plasticidade fenotípica deste gênero, potencialmente traduzidas em diferenças quanto ao metabolismo energético, a fisiologia, o crescimento e a resposta ao estresse (Li et al., 2018). Os moluscos bivalves, em especial as ostras, são considerados modelos ideais para estudos de evolução adaptativa, pois apresentam hábito sésil, alto grau de polimorfismo genômico e de plasticidade fenotípica (Zhang et al., 2012; Li et al., 2017).

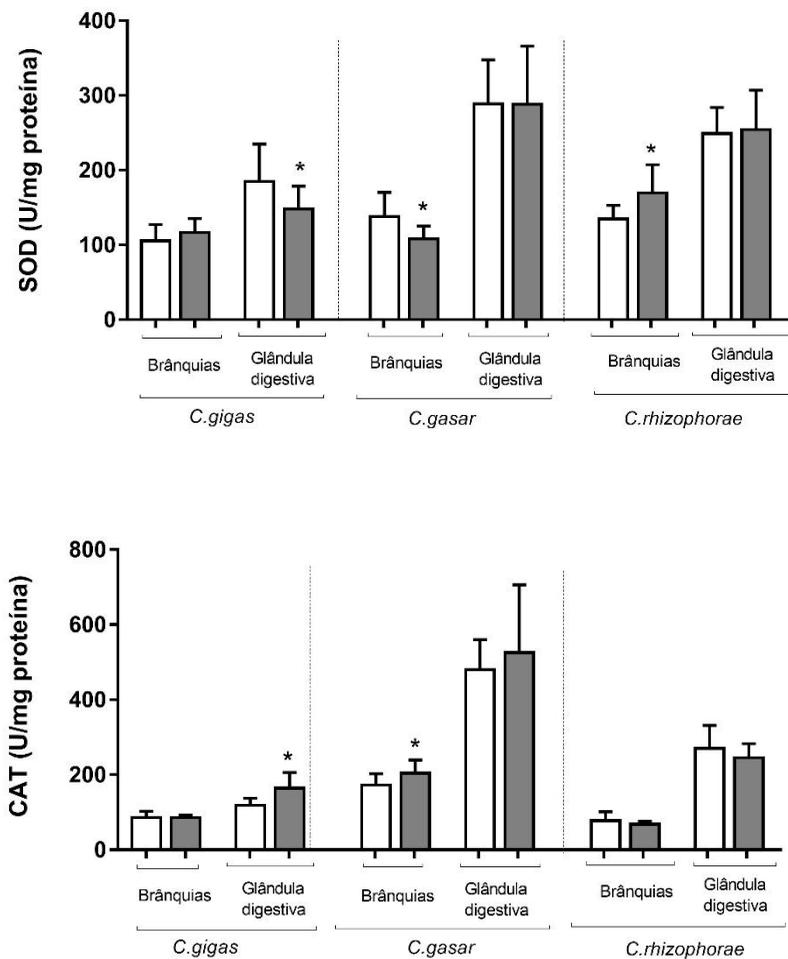
Ademais, múltiplos fatores intrínsecos devem ser considerados na avaliação das respostas bioquímicas apresentadas por determinada espécie: sexo, idade, tamanho, estágio reprodutivo, estado nutricional e metabólico e variabilidade genética individual (Oost; Beyer; Vermeulen, 2003; Benedetti; Giuliani; Regoli, 2014).

Quando expostas a xenobióticos presentes no ambiente, a biotransformação pode resultar na produção, em taxas mais elevadas que as condições normais ou basais, de subprodutos mais tóxicos que o próprio composto parental. Esse cenário pode levar à um desequilíbrio entre pró-oxidantes e oxidantes, em favor dos primeiros, também denominado estresse oxidativo. Assim, o sistema de defesa antioxidante enzimático atua na redução, remoção ou prevenção dos ataques pró-oxidantes gerados nesse processo frente à diferentes macromoléculas (Omiecinski et al., 2011; Halliwell; Gutteridge, 2015; Lei et al., 2015).

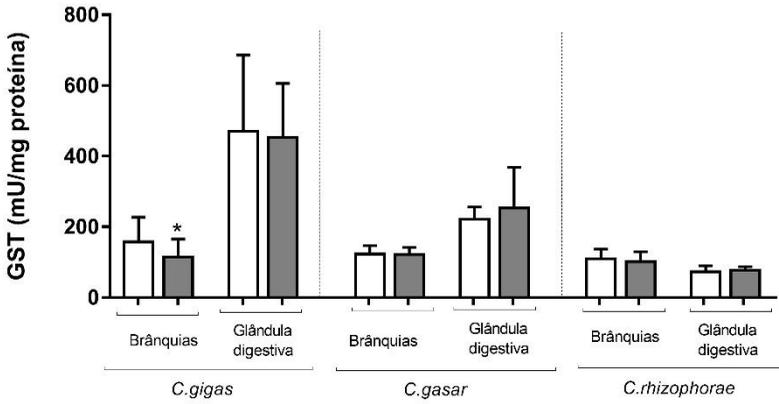
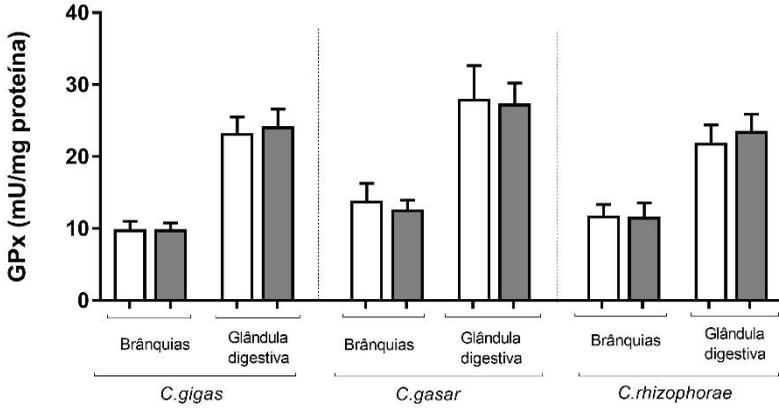
2.3.3.2 Alterações enzimáticas em decorrência da exposição ao CHR: Comparação dos grupos controle e expostos em cada espécie

As alterações no sistema enzimáticos de defesa antioxidante e de biotransformação resultantes da exposição ao CHR nas três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* estão apresentados na Figura 12. Os resultados apresentados abaixo estão discutidos comparativamente por espécie em relação aos seus respectivos grupos controle e tecido avaliado.

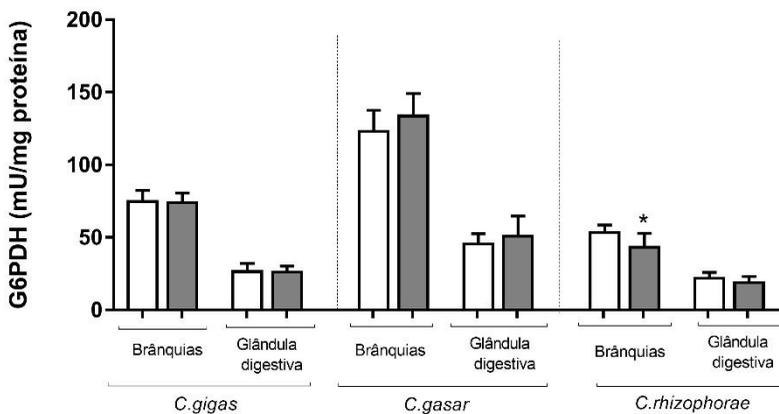
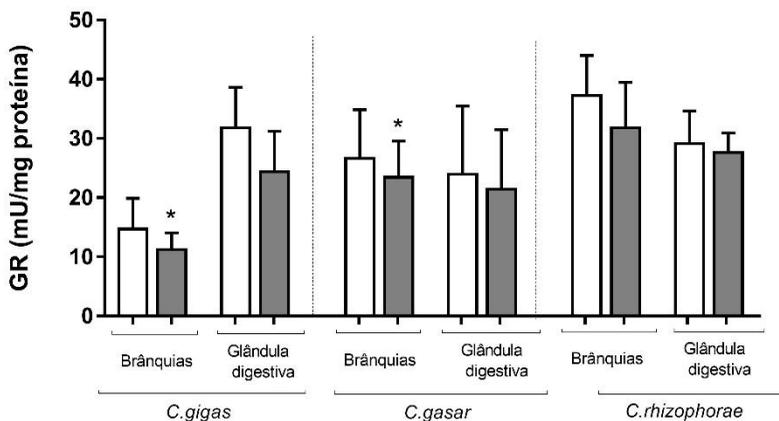
Figura 12. Representação gráfica da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona-S-Transferase (GST) Glutaciona Redutase (GR) e Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em brânquias e glândulas digestiva de ostras *C.gigas*, *C.gasar* e *C.rhizophorae* expostas à 10 µg/L de criseno por 96h.



Continuação



Conclusão



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Os dados estão apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão (n=10). As barras claras representam o grupo controle e barras escuras representam o grupo exposto. Os asteriscos demonstram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Ostras *C. gigas* expostas ao CHR apresentaram significativo decréscimo na atividade SOD nas glândulas digestivas, em relação ao grupo controle. O mesmo padrão foi observado em brânquias da ostra do mangue *C. gasar*. Esses resultados sugerem que ambas espécies foram mais sensíveis à exposição ao CHR em relação à *C. rhizophorae*. As SOD representam a primeira linha de defesa do sistema antioxidante frente ao ataque pró-oxidante resultante da biotransformação de xenobióticos. São metaloenzimas responsáveis por catalisar a conversão de ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2).

Em eucariotos, a isoforma CuZn-SOD apresenta maior predominância, com ampla distribuição no citosol e peroxissomos (Akinloye, 2018). A inibição da atividade SOD pode decorrer de elevados níveis de EROs no meio intracelular e, assim, sugere um possível aumento na produção de O_2^- (Holmström; Finkel, 2014). Nossos resultados corroboram estudos anteriores realizados com vieiras *C. farreri* expostas por 24 h a 0,1 e 1 $\mu\text{g/L}$ de CHR (Guo et al., 2017) e animais da mesma espécie expostos a 3,2 $\mu\text{g/L}$ de CHR durante 15 e 21 dias, antes e pós desova (Xiu et al., 2015). Outros trabalhos também relatam inibição da atividade SOD em vieiras *Nodipecten nodosus* depuradas após exposição à 200 $\mu\text{g/L}$ de fenantreno (PHE) durante 96 h (Piazza et al., 2016) e *C. brasiliiana* expostas a 20% WAF (do inglês, fração de óleo diesel acomodada em água) durante por 96 h (Lüchmann et al., 2011).

Diferentemente das demais espécies avaliadas, *C. rhizophorae* apresentou aumento significativo na atividade SOD nas brânquias, o que sugere uma melhor capacidade de defesa antioxidante como medida de compensação para a produção de ânion superóxido resultante à exposição, similarmente ao observado em estudos realizados com *C. farreri* expostas à CHR durante 96 h (Xiu et al., 2015). O mesmo padrão de resposta foi observado também em camarões *Litopenaeus vannamei* após 21 dias de exposição a duas concentrações (2,1 e 14,7 $\mu\text{g/L}$) de CHR (Ren; Pan; Wang, 2015). Os diferentes padrões de resposta observados entre espécies podem estar relacionado a distintas adaptações fisiológicas e possíveis diferenças nos sistemas de biotransformação de fase I, visto que na brânquia das ostras *C. rhizophorae* expostas a CHR foi observada uma diminuição no nível de transcritos dos genes *CYP1-like* e *CYP2-like*, enquanto que em *C. gigas* nenhuma diferença foi observada (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que, possivelmente, na brânquia de *C. rhizophorae* tenha ocorrido um aumento na taxa de formação de O_2^- , que ao mesmo tempo causou um efeito repressor na transcrição de

algumas isoformas de CYP e um aumento na SOD para evitar um consequente estresse oxidativo.

O H_2O_2 resultante da atividade SOD pode ser decomposto em O_2 e H_2O a partir de duas vias catalisadas pela CAT ou GPx. Localizada principalmente nos peroxissomos, a CAT utiliza os íons ferro ou manganês como cofatores na decomposição de peróxido de hidrogênio (Ighodaro; Akinloye, 2018). No presente estudo foi observado uma maior atividade da CAT nas glândulas digestivas e brânquias de *C. gigas* e *C. gasar*, respectivamente, em relação aos grupos controle. Esses resultados sugerem um aumento na produção de H_2O_2 e, conseqüentemente, uma maior necessidade de minimizar danos celulares associados ao estresse oxidativo. Foram observados resultados similares em ostras *C. brasiliiana* expostas por 96 h a 100 $\mu\text{g/L}$ de PHE (Lima et al., 2018), em vieiras *N. nodosus* depuradas após exposição a 50 e 200 $\mu\text{g/L}$ de PHE (Piazza et al., 2016) e em vieiras *C. farreri* expostas em ambas concentrações e tempos de exposição ao CHR (Guo et al., 2017). Não foram observadas alterações significativas na CAT em *C. rhizophorae*, entretanto, outros estudos com a espécie apontam aumento na atividade CAT nesta espécie em locais poluídos por HPAs (Ramdine et al., 2012).

A glutatona apresenta papel fundamental como co-substrato na reação catalítica de algumas enzimas antioxidantes e de biotransformação de xenobióticos, como a GPx, GR e GST (Hellou; Ross; Moon, 2012). A glutatona em estado reduzido (GSH) participa da redução de peróxidos que resultarão em intermediários oxidados (GS) que formam glutatona dissulfídica (GSSG), reação catalisada pela Se-GPx (Hellou; Ross; Moon, 2012). Apesar dos resultados observados para CAT, não foram observadas alterações significativas GPx nas três espécies do gênero *Crassostrea* avaliadas no presente estudo.

Entretanto, foi observada uma menor atividade da GR em brânquias de *C. gigas* e *C. gasar* expostos ao CHR, em relação aos respectivos grupos controle. Apesar de não apresentar diferença significativa, o mesmo padrão foi observado em *C. rhizophorae*. A GR possui papel fundamental na manutenção da glutatona reduzida intracelular, através utilização de elétrons oriundos da oxidação de NADPH necessária à regeneração de GSSG em GSH (Oost; Beyer; Vermeulen, 2003). Estudos prévios relatam depleção de GSH em ostras *Pinctada martensii* expostas por 7 dias a pireno (PYR) (Xie et al., 2017) e em *Chlamys farreri* expostas por 24 h a 1 $\mu\text{g/L}$ de CHR e às misturas CHR+B[a]P (0.1 + 0.1, 1 + 1 $\mu\text{g/L}$) (Guo et al., 2017). Esse padrão de decréscimo na relação GSH: GSSG também foi observado em *Litopenaeus vannamei* expostos a CHR (2,1 e 14,7 $\mu\text{g/L}$) durante todos

os períodos de exposição (1, 3, 6, 10, 15, e 21 dias) (Ren; Pan; Wang, 2015).

Paralelamente, em ostras *C. rhizophorae* expostas à CHR foi observada uma menor atividade da enzima G6PDH nas brânquias, em relação ao grupo controle. Nas demais espécies avaliadas não foram observadas alterações significativas. A G6PDH, reguladora da via das pentoses fosfato, possui papel coadjuvante no sistema de defesa antioxidante, pois é responsável por fornecer os intermediários redutores (NADPH) necessários à atividade GR (Bainy et al., 1996). Além disso, o NADPH possui papel fundamental como doador de elétrons para o ciclo catalítico dos CYP, na reação catalisada pela NADPH-citocromo P450 redutase (CPR), na fração microssomal (Kandel; Lampe, 2014). Portanto, os intermediários equivalentes fornecidos pela atividade G6PDH também atuam como coenzima para atividade EROD em brânquias e glândulas digestivas, fração microssomal, de *C. brasiliiana* (Siebert et al., 2017).

Nossos resultados sugerem que a exposição ao CHR pode comprometer a capacidade antioxidante e a manutenção dos níveis de glutatona celular (GSSG: GSH). Na literatura foi relatado que possíveis desequilíbrios nos níveis de NADPH celular e glutatona também podem influenciar negativamente na capacidade antioxidante dos organismos expostos, assim como na atividade enzimática de CAT (modificação conformacional alostérica necessária para ativação) e SOD (regulação da atividade), de forma que favorece a potencial geração de danos oxidativos às macromoléculas frente à exposição aos HPAs (Stanton, 2012).

No presente estudo não foram avaliados biomarcadores de estresse oxidativo, entretanto diversos trabalhos destacam carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica e a formação de adutos de DNA como os efeitos deletérios em vieiras *C. farreri* e no bacalhau *Gadus morhua* expostos à CHR (Xiu; Pan; Jin., 2014; Ren; Pan; Wang, 2015; Xiu; Pan; Jin, 2016; Pampanin et al., 2016; Guo et al., 2017; Enerstvedt, Sydnes, Pampanin, 2017; Enerstvedt et al., 2018).

Além das enzimas antioxidantes, no presente estudo foi avaliada também a atividade GST total nas três espécies de ostras. Classicamente reconhecida como uma superfamília de enzimas envolvidas na fase II de biotransformação, as GSTs apresentam grande variedade de classes e polimorfismos que conferem as isoformas a habilidade de conjugação, mediada pela GSH, com diferentes substratos durante a biotransformação de xenobióticos (Hayes; Flanagan; Jowsey, 2005; Hellou; Ross; Moon, 2012).

No presente estudo apenas foi observado significativo decréscimo na atividade GST nas brânquias de *C. gigas* expostas ao CHR, em relação

ao respectivo grupo controle. Nossos resultados são similares aos obtidos por Guo et al., (2017) onde foi observada uma diminuição na atividade da GST em vieiras *C. farreri* expostas à 1 µg/L de CHR e respectivas misturas (B[a]P + CHR) e concentrações durante 10 e 15 dias. Resultados similares também foram observados em brânquias de ostras *C. brasiliana* expostas à 100 µg/L de PHE durante 96 h (Lüchmann et al., 2014).

Em contrapartida, estudos anteriores relatam aumento na atividade GST em bivalves expostos à CHR (Ren; Pan; Wang, 2015; Xiu et al., 2015; Xiu; Pan; Jing, 2016) e outros HPAs (Lima et al., 2018). É importante destacar que a avaliação da GST realizada neste trabalho quantifica a atividade total da enzima, uma vez que diversas isoformas utilizam o CDNB como substrato. Assim, esta avaliação não permite a quantificação de isoformas específicas envolvidas na biotransformação dos organismos avaliados (Trisciani et al., 2012).

De fato, estudos prévios com os bivalves *Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes philippinarum* e *Corbicula fluminea* expostos à microcistinas mostraram um padrão diferencial de respostas na atividade das isoformas citosólicas de GST (Carneiro et al., 2017). Também foi observada indução diferencial da atividade GST em *Ruditapes decussatus* expostos a compostos orgânicos. As isoformas GST que utilizam ácido etacrínico como substrato foram significativamente induzidas nos animais expostos a B[a]P, em relação ao CDNB e PNBC (Hoarau et al., 2001).

Portanto, pode-se sugerir que espécies de ostras do gênero *Crassostrea* avaliadas no presente estudo apresentem respostas específicas frente à exposição ao CHR que levem à modulação de classes específicas de GST. De fato, em ostras *C. brasiliana* e *C. gigas* expostas à 100 µg/L de PYR foi observada uma maior atividade da isoforma GSTm em brânquias, em relação aos grupos controle (dados não publicados, informação pessoal com Zacchi, F.L).

Quando analisadas em conjunto, a atividade das enzimas antioxidantes e de biotransformação em *C. gigas*, *C. gasar* e *C. rhizophorae* expostas ao CHR apresentaram padrões distintos. Em uma visão global das respostas bioquímicas, as espécies *C. gigas* e *C. gasar* foram mais responsivas ao CHR, em relação à espécie nativa *C. rhizophorae*, sugerindo as primeiras apresentaram maior sensibilidade à exposição ao CHR.

As três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* avaliadas no presente estudo ocupam nichos ecológicos distintos ao longo da costa brasileira. As espécies nativas *C. gasar* e *C. rhizophorae*, também conhecidas popularmente como “ostras do mangue”, são encontradas nas

regiões estuarinas e de manguezal e habitam a região intertidal (Baldan; Bendhack, 2009). A ostra *C. rhizophorae* recebe este nome devido sua ocorrência, predominantemente, associada as raízes aéreas do mangue vermelho *Rhizophora mangle* ou fixadas aos costões rochosos (Carriker; Gaffney, 1996). Em contrapartida, a espécie *C. gasar* é encontrada, preferencialmente, na porção infra e mesolitoral de costões rochosos e manguezal (Nascimento, 1983; Christo; Absher, 2006).

Na região intertidal e no manguezal, as constantes variações na dinâmica de maré promovem alterações na concentração de oxigênio (O_2), resultando em eventos alternados de hipóxia e reoxigenação aos animais residentes destes ambientes. Por sua vez, modificações na disponibilidade e na concentração de O_2 podem afetar significativamente a respiração mitocondrial, assim como o balanço redox mitocondrial e celular (Sokolova; Sokolov; Haider, 2019). Ostras, em geral, são consideradas espécies intertidais tolerantes à hipóxia, pois apresentam resiliência aos eventos hipóxia-reoxigenação e se recuperam rapidamente, entretanto os efeitos gerados variam em função da espécie e do grau de estresse hipóxico (Meng et al., 2018; Sokolova, 2018). Devido ao ambiente extremo a que são adaptadas, é plausível inferir que *C. rhizophorae* esteja particularmente adaptada às variações de oxigênio e, portanto, tenda a desenvolver respostas menos marcadas a situações pró-oxidantes, como aquelas observadas em situações de exposição a contaminantes orgânicos.

Nesse contexto também, é possível sugerir que o maior consumo de CHR na água dos aquários e bioconcentração observados nas ostras *C. rhizophorae* esteja associado a estratégia adaptativa apresentada pela espécie que consistiria em otimizar os processos envolvidos na respiração e captura de alimentos em condições aeróbicas favoráveis. Ademais, o aumento na capacidade antioxidante como medida preventiva frente ao estresse oxidativo resultante dos eventos de reoxigenação (*burst*) é descrito como comum em animais residentes em regiões intertidais (Moreira et al., 2016; Sokolova, 2018), de forma que corrobora com os resultados observados sob a atividade das enzimas antioxidantes em *C. gasar* e *C. rhizophorae*.

Em oposição à *C. rhizophorae*, as respostas observadas em *C. gasar* demonstram maior sensibilidade à exposição ao CHR. Apesar da espécie apresentar menor consumo e bioconcentração de CHR em relação à *C. gigas* e *C. rhizophorae*, *C. gasar* apresentou maior número de alterações observadas nas enzimas antioxidantes e auxiliares nas brânquias em resposta a exposição ao CHR. As brânquias são o primeiro órgão de contato com o xenobiótico e está envolvida, portanto, com os

processos de ingestão, bioconcentração, detoxificação e excreção (Piazza et al., 2016). Portanto, as brânquias parecem desempenhar papel inicial na biotransformação de xenobióticos e no sistema de defesa antioxidante frente à exposição ao CHR em ostras *C. gasar*.

Apesar de não ser adaptada a ambientes extremos como o manguezal, a ostra exótica *C. gigas* é a espécie que apresenta maior rusticidade em relação às demais, o que justifica sua introdução para fins de maricultura em diversos países (Miossec, 2009). A espécie se distribui nas zonas intertidal inferior (até 40 m de profundidade) e apresenta capacidade de adaptação à diversas condições ambientais e flutuações de temperatura, salinidade e oxigênio (Miossec, 2009; Amaral; Simone, 2014).

Diferentemente das demais espécies avaliadas, *C. gigas* apresentou respostas bioquímicas em ambos tecidos avaliados. De maneira geral, as glândulas digestivas foram mais responsivas em relação às enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, enquanto nas brânquias se observou maior responsividade em relação às enzimas envolvidas na biotransformação, como a GST e a GR. Esses resultados sugerem que a participação de ambos tecidos pode ser utilizada como uma estratégia da espécie para otimizar a biotransformação de xenobióticos.

2.4 CONCLUSÃO

Os resultados observados no presente estudo sugerem que a exposição à 10 µg/L de CHR durante 96 h altera significativamente as respostas bioquímicas nas três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* avaliadas. As espécies consumiram CHR na água dos aquários e apresentaram bioconcentração nos tecidos moles ao longo do período de exposição. As ostras *C. rhizophorae* apresentaram menor número de alterações nas respostas bioquímicas resultantes à exposição, sugerindo uma maior capacidade antioxidante da espécie e adaptação à elevados níveis de EROs, em relação à *C. gigas* e *C. gasar*. Comparativamente, as distintas respostas na biotransformação (fase II) e defesa antioxidante observadas pelas espécies podem estar relacionadas com a plasticidade fenotípica em função dos nichos ecológicos que ocupam e a adaptação às respectivas condições ambientais.

2.5 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos (PPGAQI/UFSC). Ao Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Projeto Universal nº 425840/2016-6 pelos recursos financeiros prestados para execução do presente trabalho. Ao Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC) pela reprodução, manutenção e disponibilidade dos animais utilizados, assim como as microalgas. Ao IO-USP pelo auxílio nas análises químicas de bioconcentração nos tecidos dos animais (Projeto FAPESP 2016/18348-1).

2.6 REFERÊNCIAS

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, p.121-126.
- Amaral, V. S; Simone, L. R. L., 2014. Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) of Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 94, n. 04, p.811-836.
- Axiak, V.; George, J. J. 1987. Effects of exposure to petroleum hydrocarbons on the gill functions and ciliary activities of a marine bivalve. **Marine Biology**, v. 94, p. 241–249.
- Bainy, A. C. D. et al., 1996. 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.
- Baird, W. M.; Hooven, L.A.; Mahadevan, B., 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, n. 2-3, p.106-114.
- Baldan, A.P.; Bendhack, F., 2009. Maricultura sustentável no litoral do Paraná, Brasil: atualidades e perspectivas. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v.7, p.491-497.
- Bayne, B. L. et al., 1979. Measurement of the Responses of Individuals to Environmental Stress and Pollution: Studies with Bivalve Molluscs [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 286, n. 1015, p.563-581.

- Benedetti, M.; Giuliani, M. E.; Regoli, F., 2014. Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: molecular and biochemical biomarkers in environmental toxicology. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1340, n. 1, p.8-19.
- Bougrier, S. et al., 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**, v. 134, n. 1-2, p.143-154, 1995.
- Bradford, M. M., 1976. 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.
- Bruggeman, W.A.; Van der Steen, J.; Hutzinger, O., 1982. 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.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**. 113,484-490.
- Carneiro, M. et al., 2017. Modulation of hepatic glutathione transferases isoenzymes in three bivalve species exposed to purified microcystin-LR and Microcystis extracts. **Toxicol**, v. 137, p.150-157.
- Carriker, M.R.; Gaffney, P.M., 1996. A catalogue of selected species of living oysters (Ostreacea) of the world. The Eastern Oyster: *Crassostrea virginica*. **Maryland Sea Grant**, Maryland, p. 1-18, 1996.
- Christo, S. W.; Absher, T. M. 2006. Reproductive period of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) and *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: ostreidae) in Guaratuba bay, Paraná, Brazil. **Journal of Coastal Research**, SI 39, p. 1215 - 1218.
- Cranford, P. J.; Ward, J. E.; Shumway, S. E., 2011. Bivalve filter feeding: variability and limits of the aquaculture biofilter. In:

Shumway, S. E. (Ed.). **Shellfish Aquaculture and the Environment**. Wiley Online Library. Cap. 4, p. 81-124.

Donkin, Peter et al., 1989. Quantitative structure-activity relationships for the effect of hydrophobic organic chemicals on rate of feeding by mussels (*Mytilus edulis*). **Aquatic Toxicology**, v. 14, n. 3, p.277-293.

Eertman, R.H.M. et al., 1995. Response of the blue mussel *Mytilus edulis* L. following exposure to PAHs or contaminated sediment. **Marine Environmental Research**, v. 39, n. 1-4, p.169-173.

Enerstvedt; Sydnes; Pampanin., 2017 Study of the plasma proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effect of exposure to two PAHs and their corresponding diols. **Chemosphere**, v. 183, p.294-304.

Enerstvedt et al., 2018. Screening for protein adducts of naphthalene and chrysene in plasma of exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Chemosphere**, v. 200, p.67-79.

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

Guo, R. et al., 2017. The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene and chrysene. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 191, p.36.

Glock, G.E., McLean, P., 1953. Further studies on the properties and assay of glucose6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of ratliver. **Biochem. J.** 55, 400-408.

Gutiérrez, J. L. et al., 2003. Mollusks as ecosystem engineers: the role of shell production in aquatic habitats. **Oikos**, v. 101, n. 1, p.79-90.

- Halliwell, B; Gutteridge, J. M., 2015. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press.
- Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R., 2005. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p.51-88.
- Hellou, J.; Ross, N. W.; Moon, T.W., 2012 Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 6, p.2007-2023.
- Hoarau, P. et al., 2001. 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.
- Holmström, K. M.; Finkel, T., 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p.411-421.
- Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A., 2018. Firstline defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p.287-293.
- Jeong, W.; Cho, S., 2007. Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacific oyster, **Crassostrea gigas**. **Aquaculture**, v. 265, n. 1-4, p.343-350.
- Kandel, S. E.; Lampe, J. N., 2014. Role of protein–protein interactions in cytochrome P450-mediated drug metabolism and toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, p. 1474–1486, 2014.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188.
- Omicinski, C. J. et al., 2011. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to

- Predictors of Major Toxicities. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 1, p.49-75.
- Oost, R. V. D.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p.57-149.
- Lei, X. G. et al., 2015. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 307-364.
- Li, A. et al., 2017. Temperature, energy metabolism, and adaptive divergence in two oyster subspecies. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 16, p.6151-6162.
- Li, L. et al., 2018. Divergence and plasticity shape adaptive potential of the Pacific oyster. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, n. 11, p.1751-1760.
- Librando, V.; Sarpietro, M.G.; Castelli, F., 2003 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.
- Lima, D. et al., 2018. Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene. **Chemosphere**, v. 209, p.307-318.
- Lüchmann, K.H. et al., 2011. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction **Aquatic Toxicology**, 105, pp. 652-660
- Lüchmann, K. H. et al., 2014. 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.
- Macleod, W.D. et al., 1986. 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.

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (Hemocuprein). **Journal of Biology Chemistry.** 244, 6049–6055.

Meng, J. et al., 2018. Inducible variation in anaerobic energy metabolism reflects hypoxia tolerance across the intertidal and subtidal distribution of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Marine Environmental Research**, v. 138, p.135-143.

Miossec, L., Le Deuff, R-M., Gouletquer, P. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). **ICES Cooperative Research Report** No. 299. p. 42, 2009

Nascimento, I.A. 1983. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, SP, 35(7): 871-876.

Newell, R.I.E; Koch, E.W. 2004. Modelling seagrass density and distribution in response to changes in turbidity stemming from bivalve filtration and seagrass sediment stabilization. **Estuaries and Coasts**, 27 (5), pp. 793-806

Pampanin, D. M. et al., 2016. Biological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their first metabolic products in in vivo exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 79, n. 13-15, p.633-646.

Piazza, R. S. et al., 2016. 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.

Pie, M.R., et al., 2006. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia, Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research**, v.37, p.1598-1600.

- Ramdine, G. et al., 2012. 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.
- Redmond, K. J. et al., 2016. Effect of dispersed crude oil on the feeding activity, retention efficiency, and filtration rate of differently sized blue mussels (*Mytilus edulis*). **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part A, v. 79, n. 13-15, p.658-674.
- Ren, X.; Pan, L.; Wang, L., 2015. The detoxification process, bioaccumulation and damage effect in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to chrysene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p.44-51.
- Reynaud, S; Deschaux, P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 2, p.229-238.
- Rewitz, K. F. et al. Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging Insights from vertebrate and insect analogies. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 143, n. 4, p. 363–381, 2006.
- Schöne, B. R.; Krause, R. A., 2016. Retrospective environmental biomonitoring – Mussel Watch expanded. **Global And Planetary Change**, v. 144, p.228-251.
- Siebert, M. N. et al., 2017. Characterization of ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) in oyster *Crassostrea brasiliana*. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 203, p.115-121.
- Stanton, R. C., 2012. Glucose 6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. **Iubmb Life**, v. 64, n. 5, p.362-369.
- Sokolova, I., 2018. Mitochondrial Adaptations to Variable Environments and Their Role in Animals Stress Tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, v. 58, n. 3, p.519-531.

- Sokolova, I. M.; Sokolov, E. P.; Haider, F. 2019. Mitochondrial Mechanisms Underlying Tolerance to Fluctuating Oxygen Conditions: Lessons from Hypoxia-Tolerant Organisms. **Integrative and Comparative Biology**, p.1-15.
- Sroczyńska, K.; Barroso, G.; Chícharo, L., 2012. In situ effective clearance rate measurement of mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in a tropical estuary in Brazil. **Ecohydrology and Hydrobiology**, v. 12, n. 4, p.301-310.
- Takayanagi, K. et al., 2000. Acute toxicity of formaldehyde to the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. **Water Research**, v. 34, n. 1, p.93-98.
- Toro, B.; Navarro, J. M.; Palma-Fleming, H., 2003. Relationship between bioenergetics responses and organic pollutants in the giant mussel, *Choromytilus chorus* (Mollusca: Mytilidae). **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 3, p.257-269.
- Trisciani, A. et al., 2012. 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.
- Walker, C. H. et al., 2016. **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, p. 321.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymology**, v. 77, p. 325-333.
- Xie, J. et al., 2017. Effects of pyrene exposure on immune response and oxidative stress in the pearl oyster, *Pinctada martensii*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 63, p. 237-244.
- Xiu, M.; Pan, L.; Jin, Q., 2014. Bioaccumulation and oxidative damage in juvenile scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and chrysene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p.103-110.

- Xiu, M. et al., 2015. Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 170, p.50-59.
- Xiu, M.; Pan, L.; Jin, Q., 2016. Toxic effects upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 44, p.75-83.
- Yao, L. et al., 2017. Expression profiles of different glutathione S-transferase isoforms in scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene and chrysene in combination and alone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p.480-488.
- Yancheva, V. S. et al., 2018. Mussels in Ecotoxicological Studies - Are They Better Indicators for Water Pollution Than Fish? **Ecologia Balkanica**, v. 10, n. 1, p.57-84.
- Zhang, G. et al., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p.49-54.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

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, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.

ABSHER, T. M. **Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná - Desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento**. Tese. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 1989. 185p.

AGUIRRE-RUBÍ, J. et al. Assessment of ecosystem health disturbance in mangrove-lined Caribbean coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae* as sentinel species. **Science of The Total Environment**, v. 618, p.718-735, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.098>.

AMARAL, V. S; SIMONE, L. R. L. Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) of Brazil. **Journal of The Marine Biological Association of The United Kingdom**, v. 94, n. 4, p.811-836, 2014. <http://dx.doi.org/10.1017/s0025315414000058>.

ANDRADE, G. J. P. O. Maricultura em Santa Catarina: a cadeia produtiva gerada pelo esforço coordenado de pesquisa, extensão e desenvolvimento tecnológico. **ExtensioUFSC: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 13, n. 24, p.204-217. 2016. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). <http://dx.doi.org/10.5007/1807-0221.2016v13n24p204>.

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.

BAIRD, W. M.; HOOVEN, L.A.; MAHADEVAN, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, n. 2-3, p.106-114, 2005. <http://dx.doi.org/10.1002/em.20095>.

BALDAN, A.P.; BENDHACK, F. Maricultura sustentável no litoral do Paraná, Brasil: atualidades e perspectivas. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v.7, p.491-497, 2009.

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>.

BOUTET, I., TANGUY, A., MORAGA, D. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. **Marine Biology**, n. 146, p. 53–642004, 2004.

CAJARAVILLE, M. 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. 2-3, p.295-311, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697\(99\)00499-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697(99)00499-4).

CARRIKER, M.R.; GAFFNEY, P.M. A catalogue of selected species of living oysters (Ostreacea) of the world. The Eastern Oyster: *Crassostrea virginica*. **Maryland Sea Grant**, Maryland, p. 1-18, 1996.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). 2005. Resolução nº 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>.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). 2007. Resolução nº 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://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=541>

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). 2009. Resolução nº 420, 28 dez 2009. Dispõe sobre os critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades

antrópicas. Disponível em:

<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). 2012. Resolução nº 454, 01 nov 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=693>

CHANG, T.K.H.; WAXMAN, D.J. Cytochrome P450 Nomenclature. In: PHILLIPS, I.R.; SHEPHARD, E.A. (Ed.). **Cytochrome P450 Protocols**. 2. ed. New Jersey: Humana Press Inc, 2006. p. 73-84.

CHRISTO, S. W. **Biologia Reprodutiva e Ecologia de Ostras do Gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): um subsídio do cultivo**. 2006. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências, Zoologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 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>.

DENISON, M. S. et al. Exactly the same but different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) receptor. **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 1, p. 1–22, 2011.

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

FAO Food and Agriculture Organization. 2018. **The State of Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome. 227p. 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>

FERREIRA, J.F.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; FERREIRA, F.M., Produção programada e rastreabilidade de larvas e sementes de moluscos em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.192-197, 2011.

FRANCO, M. E.; LAVADO, R. Applicability of in vitro methods in evaluating the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish: Advances and challenges. **Science of The Total Environment**, v. 671, p.685-695, 2019.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.394>.

FLORES-NUNES, F. 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.

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

GUO et al. The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene and chrysene. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 191, p.36-51, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.09.004>.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – *quo vadis?* **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p.125-130, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002.I>

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 2015.

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>.

IBAMA, Instituto Brasileiro de Meio Ambiente. **Estatística da pesca 2007: Grandes regiões e unidades da federação**. Brasília, 2007, 157p.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2017: Resultados preliminares**. Rio de Janeiro, 2017, v.7, p.1-108.

IGNACIO, B. L. et al. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. **Marine Biology**, v. 136, n. 6, p.987-991, 2000. <http://dx.doi.org/10.1007/s002270000252>.

LAPÈGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEUERTEBISE, S.; GARCIA, P.; THIRIOT-QUIÉVREUX, C.; BOUDRY, P., Trans-Atlantic distribution of mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**, v.202, p.232-242, 2002.

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>.

LESSER, M. P. OXIDATIVE STRESS IN MARINE ENVIRONMENTS: Biochemistry and Physiological Ecology. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p.253-278, 2006. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>.

LIMA, D. et al. Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. **Chemosphere**, v. 209, p.307-318, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.094>

LÜCHMANN, K. H. et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 652–660, 2011.

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.021>.

MANSOUR, C. et al. Combination of polycyclic aromatic hydrocarbons and temperature exposure: In vitro effects on immune response of European clam (*Ruditapes decussatus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 67, p.110-118, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.008>.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. **Reviews in**

Fish Biology and Fisheries, v. 15, n. 1-2, p.75-88, 2005.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>.

MILLER, A. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. **Febs Letters**, v. 586, n. 5, p.585-595, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.048>.

MIOSSEC, L., LE DEUFF, R-M., GOULLETQUER, P. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). **ICES Cooperative Research Report No. 299**. p. 42, 2009

MONSERRAT, J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p.221-234, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.012>.

NASCIMENTO, I.A. 1983. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, SP, 35(7): 871-876.

NASCIMENTO, I.A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck) in South and Central American. In: Menzel, W. Estuarine and marine bivalve mollusk culture. Boston: **CRC Press**, p. 125-134. 1991.

NAYAK, A. S. et al. A catabolic pathway for the degradation of chrysene by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04. **Fems Microbiology Letters**, v. 320, n. 2, p.128-134, 31 maio 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02301.x>.

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

OMIECINSKI, C. J. et al. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 1, p.49-75, 2011. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfq338>.

OOST, R. V. D.; BEYER, J.; VERMEULEN, Nico P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a

review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p.57-149, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6).

PEREIRA, C. D. S. et al. Ecological relevance of Sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. **Marine Environmental Research**, v. 96, p.118-126, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.11.002>

PESSATI, T.B. et al. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliiana* exposed in situ to urban effluents, Florianopolis Bay, Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 172-180, 2015.

PIE, M.R., et al., A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia, Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research**, v.37, p.1598-1600, 2006.

REBELO, M. F. et al. Is There a CYP1A1 in Marine Bivalves? Expressed Sequences Related to Cytochrome P450 in *Crassostrea rhizophorae*. **Comments on Toxicology**, v. 9, n. 5-6, p.279-287, 2010. <http://dx.doi.org/10.1080/08865140390450377>.

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>.

REYNAUD, S; DESCHAUX, P. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 2, p.229-238, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.10.018>.

REWITZ, K. F. et al. Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging Insights from vertebrate and insect analogies. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 143, n. 4, p. 363–381, 2006.

SALVI, D.; MACALI, A.; MARIOTTINI, P. Molecular phylogenetics and systematics of the bivalve family Ostreidae based on rRNA

sequence-structure models and multilocus species tree. **PLoS One**, v.9, n.9., e108696, 2014.

SANTA CATARINA, Secretaria do Estado da Agricultura e da Pesca, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese informativa da maricultura, 2017**. Florianópolis. 8p. 2017. Disponível em:
http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_epagri/Cedap/Estatistica-Sintese/Sintese-informativa-da-maricultura-2017.pdf

SANTANA, M. S. et al. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. **Environmental Pollution**, v. 242, p.449-461, 2018.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.004>.

SANTOLINI, Jerome et al. The Redox Architecture of Physiological Function. **Current Opinion in Physiology**, 2019.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cophys.2019.04.009>.

SIEBERT, M. N. et al. Characterization of ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) in oyster *Crassostrea brasiliiana*. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 203, p.115-121, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.10.002>.

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.

SILVA, A. Z. et al. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel

oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 3, p.376-382, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.008>.

SOUZA FILHO, J. **Custo de produção da ostra cultivada**. Florianópolis: Instituto Cepa/SC, 2003. 23p. (Cadernos de indicadores agrícolas 3).

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 Perspectives**, v. 90, p. 101-109, 1991.

TANSEL, B. et al. Persistence profile of polyaromatic hydrocarbons in shallow and deep Gulf waters and sediments: Effect of water temperature and sediment–water partitioning characteristics. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 12, p.2659-2665, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.026>.

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>

UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development** Working Paper No. A/RES/70/1. Disponível em: <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>

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

VINATEA, L., 2004. **Fundamentos de Aquicultura**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 349.

VIKAS, M.; DWARAKISH, G.S. Coastal Pollution: A Review. **Aquatic Procedia**, v. 4, p.381-388, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqpro.2015.02.051>.

XIU, M.; PAN, L. JIN, Q. Bioaccumulation and oxidative damage in juvenile scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene,

benzo[b]fluoranthene and chrysene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p.103-110, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.016>.

XIU et al. Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 170, p.50-59, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.02.003>.

XIU; PAN; JIN. Toxic effects upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 44, p.75-83, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.04.001>.

YAO, et al. Expression profiles of different glutathione S-transferase isoforms in scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene and chrysene in combination and alone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p.480-488, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.050>.

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.

ZACCHI, F. L. et al. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v. 183, p.94-103, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.016>.

ZANETTE, J.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p.187-195, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.001>.

ZANETTE, J. 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.

ZHANG, J. et al. Estimating population exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbon in the United States - Part II: Source apportionment and cancer risk assessment. **Environment International**, v. 97, p. 163–170, 2016a.

ZHANG, Y. et al. Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 809–824, 2016b.