

Raphaella Christine Paiva Regis

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM OSTRAS *Crassostrea*
gigas (THUNBERG, 1793) EXPOSTAS AO IBUPROFENO E
TAMOXIFENO**

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

Orientador: Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Florianópolis/SC
2018

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

Paiva, Raphaella Christine

Biomarcadores bioquímicos em ostras *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793) expostas ao ibuprofeno e tamoxifeno / Raphaella Christine Paiva ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy, 2018.

73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Biomarcadores. . 3. Defesa Antioxidante. I. Bainy, Afonso Celso Dias . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Biomarcadores bioquímicos em ostras *Crassostrea gigas*
(THUNBERG, 1793) expostas ao ibuprofeno e tamoxifeno**

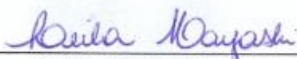
Por

RAPHAELLA CHRISTINE PAIVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

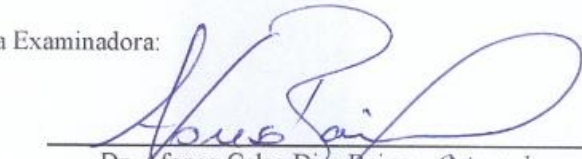
MESTRE EM AQUICULTURA

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. Camilo Dias Seabra Pereira - UNIFESP



Dra. Maria Risoleta Freire Marques - UFSC

AGRADECIMENTOS

Mais uma fase se “encerra” para o começo de novos ciclos...

Agradeço infinitamente a minha família Paiva, que sempre me deu total suporte e apoio na minha decisão de mudar pra Florianópolis, em busca do que eu tanto almejava. Obrigado por entenderem a minha ausência nesses anos, a saudade diária nos atormenta! Dedico este trabalho especialmente aos maiores incentivadores e admiradores da minha profissão e do meu trabalho, meus avós Luzia Paiva e Raimundo Ferreira, razão da minha vida, meus amores, minha inspiração e meu choro calado de saudades nos dias em que eu queria acordar em casa, com minha família para mais um almoço de domingo.

Ao meu orientador Afonso Bainy, pela oportunidade que me deu de adquirir tanto conhecimento, quando aceitou me orientar no mestrado, por toda atenção e boa vontade de sempre em me atender e por confiar no meu trabalho, muito obrigada!!!

A todos os meus amigos cientistas do LABCAI, a Flávia Zacchi e Isis Reis, essas manezinhas lindas que me ajudaram desde o primeiro dia que pisei nessa ilha. Obrigada meninas por todo o carinho de sempre. Aos meus queridos e “co-orientadores”, Daína Lima, Jacó Mattos e Bárbara Righetti, que me ajudaram em todas as análises, obrigada por toda assistência e ensinamentos, pelos puxões de orelha e pelos momentos de descontração, vou sentir saudades das cervejas IPA no fim de tarde... EITA!!!

A Daína, por toda ajuda nas análises, pelos conselhos, por toda atenção, por acreditar e me incentivar sempre, sem dúvidas sua amizade é um presente na minha vida!!! A minha amiga de profissão e de bancada, com nossas milhares de análises, Cissa Pellegrini, sempre me incentivando a usar o “R”, tirando todas as minhas dúvidas, obrigada meninas!

Ao LABCAI e a todos que me receberam com tanto amor e que vou lembrar com muito carinho, aos meus amigos Fran Veronese, Clei Piazza, Vera Helena, Luiz Otávio, Mila Lisarb, Tomás Pessati, Juliana Tisca e a todos que me acompanharam nessa caminhada.

A UFSC e a todos os professores da Pós-Graduação em Aquicultura, pelos ensinamentos e aprendizagem. Ao Carlito Klunk que sempre muito prestativo me ajudou nas burocracias e questões administrativas.

Aos professores Dr. Camilo Dias Seabra Pereira, Dra. Maria Risoleta Freire Marques, pela participação e contribuição deste trabalho como membros da banca, bem como os professores Dr. Eduardo Alves de Almeida e Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães, membros suplentes da banca.

A minha família amada, minha mãe Helena Paiva, meus irmãos Matheus Paiva e Laine Paiva, pelas visitas de sempre em Floripa e pelos registros fotográficos cheios de amor e boas lembranças desse tempo. Aos meus tios, Wellington Paiva e Helenice Paiva, a minha madrinha Claudinha Paiva, meus primos Camila e Nelson Jr., minha família, meu porto seguro!! Vó e Vô, não tenho palavras para agradecer esse amor, obrigada por cuidarem tão bem de Liza e por sempre me incentivarem em busca dos meus sonhos...

À “casinha da montanha”, onde vivi momentos inesquecíveis, que me fizeram acreditar que realmente essa ilha é mágica, e por dividir e entender toda essa loucura, à minha amiga Bianca e a minhas sobrinhas Bella, Deni e Otto que alegraram nossos dias. Às minhas amigas da Lagoa da Conceição, Tati Barradas, Viviane Haubert e Ângela Machado e por todos os momentos vividos nessa ilha da magia!

Aos meus amigos do Nordeste, que a distância nunca abalou a nossa amizade, que o nosso “Sol Quente” sempre brilhe e que nos proporcione momentos inesquecíveis juntos. Em especial ao meu amigo Lucas Rebouças, que me ajudou a escrever desde o projeto pra entrar no mestrado, a Jonas Vasconcelos que pacientemente me ensinou a usar o “R”, me incentivando a fazer coisas que eu nunca imaginei aprender, a todos os meus amigos de profissão e da vida, de risadas e cervejas, Juh, Ellano, Corró, Paulinha, Abílio, Lelinho, Renatinha, Romeika, Xandinho, Vanessa, Lyly, Guelson e aos meus amigos da UFERSA, que me acompanharam antes dessa jornada, sem vocês eu não teria chegado aqui, Hilbaty, Ellen, Raclas e a todos que torceram por mim, amo vocês amigos!

Aos Nordestinos que invadiram esta ilha e alegraram os meus dias, Jeisinha, Leycinha, Bianca Serra, Greyci, Ewerton, que trouxeram todo o sotaque e raízes do nosso “País” para cá. E a todos os meus amigos do mestrado, em especial a Lu e Marcelo, por todos os momentos juntos, sempre com muitas ostras e tainha. Que possamos nos encontrar nas próximas etapas dessa vida e dessa jornada acadêmica...

E por fim, a essa ilha mágica pelos momentos vividos, pelo autoconhecimento, por todo aprendizado, por todos os nasceres do sol, passeios a beira da lagoa, vai ser difícil descrever esses 2 anos tão maravilhosos em poucas palavras, foram anos intensos, porém com dias leves, apesar de todas as atribuições e da saudade de casa... com certeza, foi a melhor experiência profissional e pessoal da minha vida!!!

E que venham novos desafios....

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Organismos aquáticos estão sujeitos a toxicidade causada por xenobióticos continuamente lançados ao ambiente, principalmente via esgoto sanitário. Os fármacos, também conhecidos como “contaminantes emergentes”, são substâncias que possuem boa estabilidade química e baixa biodegradabilidade, o que dificulta a diminuição de seus níveis ou sua remoção após passarem por Estações de Tratamento de Esgoto. Estes compostos, quando presentes, mesmo em pequenas concentrações, podem induzir efeitos tóxicos causando danos aos organismos expostos. Os bivalves, como a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*, possuem grande importância comercial, sendo extensivamente cultivados na região costeira da Ilha de Santa Catarina, SC. Por serem animais filtradores, são capazes de acumular xenobióticos, e têm sido amplamente utilizados como espécies sentinelas em estudos de monitoramento. Exposições a fármacos podem induzir alterações nos sistemas de biotransformação e de defesas antioxidantes, podendo causar estresse oxidativo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar alterações de biomarcadores bioquímicos, em brânquias (BR) e glândula digestiva (GD) de *C. gigas* expostas aos fármacos, Tamoxifeno (TAM 10 e 100 ng.L⁻¹) e Ibuprofeno (IBU 10 e IBU 100 µg.L⁻¹) e a uma mistura, contendo os dois fármacos, “MIX 1” (TAM 10 ng.L⁻¹ + IBU 10 µg.L⁻¹) e “MIX 2” (TAM 100 ng.L⁻¹ + IBU 100 µg.L⁻¹), por 24 e 96 horas. Foram analisadas a atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glutathione-S-Transferase (GST) e Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PDH). Na BR das ostras expostas às duas concentrações de TAM por 24h apresentaram uma maior atividade da CAT. Na GD, foi observado uma maior atividade das enzimas que participam da degradação de peróxidos, CAT e GPx, assim como da enzima auxiliar GR após 24h de exposição, quando expostos as duas concentrações do fármaco. A GD foi mais responsiva à exposição a este fármaco. As BR das ostras expostas por 24h e 96h à maior concentração de IBU apresentaram uma maior atividade da GPx, possivelmente associada a um aumento na produção de H₂O₂. Não foram observadas alterações significativas na atividade destas enzimas na GD. As ostras expostas por 96h aos fármacos juntos nas maiores concentrações foi observado um aumento na atividade da GPx na GD, indicando um aumento no sistema de defesa antioxidantes a fim de proteger as células contra os efeitos deletérios causados por esses xenobióticos.

Palavras-chave: Aquicultura. Biomarcadores. Defesa Antioxidante.

ABSTRACT

Aquatic organisms are subject to toxicity due to xenobiotics continuously released to the environment, mainly via sanitary sewage. Pharmaceuticals, also known as "emerging contaminants", are substances that have good chemical stability and low biodegradability, which makes it difficult to reduce their levels or to remove them after passing in Sewage Treatment Plants. These compounds, when present, even in small concentrations, can induce toxic effects, causing damage to the exposed organisms. Bivalves, such as the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, have great commercial importance and are extensively cultivated in the coastal region of Santa Catarina Island, SC. Because they are filtering animals, they are able to accumulate xenobiotics, and have been widely used as sentinel species in monitoring studies. Exposure to drugs may induce changes in biotransformation systems and antioxidant defenses, which may cause oxidative stress. The aim of the present study was to evaluate the biochemical alterations in gills (BR) and digestive gland (GD) of *C. gigas* exposed to Tamoxifen (TAM 10 and 100 ng.L⁻¹) and Ibuprofen (IBU 10 and IBU 100 µg.L⁻¹), separately, and to two mixtures containing both drugs "MIX 1" (TAM 10 ng.L⁻¹ + IBU 10 µg.L⁻¹) and "MIX 2" (TAM 100 ng.L⁻¹+ IBU 100 µg.L⁻¹) for 24 and 96 hours. The activities of Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Reductase (GR), Glutathione-S-Transferase (GST) and Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase (G6PDH) were analyzed. Higher CAT activity was observed in the BR of the oysters exposed to TAM, when the organisms were exposed to two concentrations of the drug for 24 hours. In the GD, a significant increase in the activity of the enzymes that participate in the degradation of peroxides, CAT and GPx, as well as in the auxiliary enzyme GR was observed after 24h of exposure to the two concentrations of the drug. GD was more responsive to the exposure to TAM. In the BR of the oysters exposed to the IBU, a greater GPx activity was observed after 24h and 96h of exposure to the higher concentration, possibly associated to an increase in H₂O₂ production, and no significant changes were observed in the activity of these enzymes analyzed in GD. When the drugs were administered together, only GPx activity were enhanced in the GD of the 96h exposed animals at the highest concentration, indicating an increase in the antioxidant defense system in order to protect the cells against the deleterious effects caused by these xenobiotics.

Keywords: Aquaculture. Biomarkers. Antioxidant Defense.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da molécula, propriedades físicas e químicas e Coeficiente de Partição Octanol-Água ($\log K_{ow}$) do fármaco Tamoxifeno.	26
Figura 2- Estrutura química da molécula, propriedades físicas e químicas e Coeficiente de Partição Octanol-Água ($\log K_{ow}$) do fármaco Ibuprofeno.	27
Figura 3- Ilustração da ostra <i>C. gigas</i> e sua classificação taxonômica.	28
Figura 4- Atividade das principais enzimas antioxidantes celulares e enzimas auxiliares: Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR), Glicose 6-Fosfato-Desidrogenase e Glutaciona-S-Transferase (GST).....	32
Figura 5- A: Aclimação das ostras; B: Bioensaio LABCAI; C: Triplicata dos tratamentos; D: 5 ostras/aquário.....	41
Figura 6- Delineamento experimental da exposição das ostras <i>C. gigas</i> aos fármacos isolados.	41
Figura 7- Delineamento experimental da exposição das ostras <i>C. gigas</i> aos “Mix’s”.	42
Figura 8- Gráficos mostrando a média (+ DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em BR de <i>C. gigas</i> (n= 9) expostas ao Tamoxifeno (TAM) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), TAM 1 (10 ng.L ⁻¹) e TAM 2 (100 ng.L ⁻¹). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$).....	47
Figura 9- Gráficos mostrando a média (+ DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em GD de <i>C. gigas</i> (n= 9) expostas ao Tamoxifeno (TAM) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), TAM 1 (10 ng.L ⁻¹) e TAM 2 (100 ng.L ⁻¹). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$).....	48
Figura 10- Gráficos mostrando a média (+ DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em BR de <i>C. gigas</i> (n= 9) expostas ao	

Ibuprofeno (IBU) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), IBU 1 (10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e IBU 2 (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$)..... 51

Figura 11- Gráficos mostrando a média (+ DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutathiona-S-Transferase (GST), Glutathiona Peroxidase (GPx), Glutathiona Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em GD de *C. gigas* (n= 9) expostas ao Ibuprofeno (IBU) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), IBU 1 (10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e IBU 2 (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$)..... 53

Figura 12- Gráficos mostrando a média (+ DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutathiona-S-Transferase (GST), Glutathiona Peroxidase (GPx), Glutathiona Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em BR de *C. gigas* (n= 9) expostas às misturas (MIX) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), MIX 1- menor concentração (TAM 10 ng.L^{-1} + IBU 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e MIX 2- maior concentração (TAM 100 ng.L^{-1} + IBU 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$). 54

Figura 13- Gráficos mostrando a média (+ DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutathiona-S-Transferase (GST), Glutathiona Peroxidase (GPx), Glutathiona Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em GD de *C. gigas* (n= 9) expostas às misturas (MIX) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), MIX 1- menor concentração (TAM 10 ng.L^{-1} + IBU 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e MIX 2- maior concentração (TAM 100 ng.L^{-1} + IBU 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$). 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE's: Anti-inflamatórios Não-Esteroidais
BR: Brônquias
CAT: Catalase
CDNB: 1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
COX: Enzima Ciclooxygenase
CYP: Citocromo P450- número após a sigla representa família
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTT: Ditiotreitól
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPAGRI: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
ETA: Estação de Tratamento de Água
ETE: Estação de Tratamento de Esgoto
EU: União Europeia
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação; do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FDA: Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos; do inglês *Food and Drug Administration*
G6PDH: Glicose 6-Fosfato-Desidrogenase
GD: Glândula Digestiva
GPx: Glutathione Peroxidase
GR: Glutathione Redutase
GSH: Glutathione Reduzida
GSSG: Glutathione Oxidada
GST: Glutathione-S-Transferase
KCl: Cloreto de Potássio
LABCAI: Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
LMM: Laboratório de Moluscos Marinhos
NADP⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidada
NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
pH: Potencial Hidrogeniônico
PMSF: Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoreto
SERM: Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio; do inglês *Selective Estrogen Receptor Modulator*
Tris HCl: Tris (Hdroximetil) Aminometano-Hidrocloroeto
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos; do inglês *United States Environmental Protection Agency*

WHO: Organização Mundial de Saúde; do inglês *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

%: Porcentagem

$\mu\text{g.L}^{-1}$: Micrograma por litro

μg : Micrograma

μL : Microlitro

‰: Partes por mil

10x: 10 μl de sobrenadante/90 μl de tampão de homogeneização

20x: 5 μl de sobrenadante/95 μl de tampão de homogeneização

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio

K_{ow} : Coeficiente de partição octanol-água

L: Litro

M: Molar

mg: Miligrama

Milli-Q: Água ultrapura

min: Minutos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

n: Número amostral

ng: Nanograma

O_2^- : Ânion superóxido

$^{\circ}\text{C}$: Graus celsius

OH: Radical hidroxila

p: Significância estatística

t: Toneladas

xg: força centrífuga aplicada

ϵ : Coeficiente de extinção molar

SUMÁRIO

1.1	INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1.1	A quicultura e a problemática da contaminação ambiental	19
1.1.2	Contaminantes emergentes	21
1.1.3	Ocorrência de fármacos no ambiente	22
1.1.3.1	Fármaco Tamoxifeno (TAM)	25
1.1.3.2	Fármaco Ibuprofeno (IBU)	26
1.1.4	Organismo Sentinela: <i>Crassostrea gigas</i>	27
1.1.5	O Uso de Biomarcadores	28
1.1.6	Enzimas de defesa antioxidantes, auxiliares e de conjugação	29
1.1.6.1	Catalase (CAT)	30
1.1.6.2	Glutathione Peroxidase (GPx)	30
1.1.6.3	Glutathione-S-Transferase (GST)	31
1.1.6.4	Glutathione Redutase (GR).....	31
1.1.6.5	Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PDH)	32
1.2	OBJETIVOS	33
1.2.1	Objetivo Geral	33
1.2.2	Objetivos Específicos	33
1.3	ESTRUTURA DO TRABALHO	33
2	CAPÍTULO ÚNICO	35
2.1	INTRODUÇÃO	38
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.2.1	Exposição das ostras <i>C. gigas</i> aos fármacos	40
2.2.2	Processamento das amostras	43
2.2.3	Ensaio cinético	43
2.2.3.1	Catalase (CAT)	43
2.2.3.2	Glutathione-S-Transferase (GST).....	43

2.2.3.3	Glutationa Redutase (GR)	44
2.2.3.4	Glutationa Peroxidase (GPx)	44
2.2.3.5	Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PDH)	44
2.2.3.6	Proteínas Totais	44
2.2.4	Cálculo da Cinética Enzimática	45
2.2.5	Análise Estatística dos Dados	45
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
2.3.1	Respostas enzimáticas das ostras expostas ao Tamoxifeno.....	46
2.3.2	Respostas enzimáticas das ostras expostas ao Ibuprofeno.....	50
2.3.3	Respostas enzimáticas das ostras expostas ao Mix	53
2.4	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS ARTIGO	57
	REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL	63

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1.1 Aquicultura e a problemática da contaminação ambiental

Nas últimas décadas, a aquicultura vem apresentando relevantes contribuições para a produção de proteína de origem animal. Segundo dados apresentados pela *Food and Agriculture Organization*- (FAO, 2016), no ano de 2014, a pesca por captura foi responsável por 93,4 milhões de toneladas e a aquicultura representou 73,8 milhões de toneladas de pescados. Deste total produzido pela aquicultura, 49,8 milhões de toneladas foram de peixes, 16,1 milhões de toneladas de moluscos bivalves, 6,9 milhões de toneladas de crustáceos e 7,8 milhões de toneladas de outros animais aquático cultiváveis.

Dentre as atividades exercidas pela aquicultura, o cultivo de bivalves marinhos, conhecido como “Malacocultura”, ocupa o segundo lugar em volume de produção mundial. O Brasil, é o segundo maior produtor da América Latina, ficando somente atrás do Chile (FAO, 2016). Dos estados brasileiros, Santa Catarina é o maior produtor de moluscos, contribuindo com cerca de 98% da produção nacional (IBGE, 2015). No ano de 2016, o estado foi responsável pela produção, em escala comercial, de 15.381 toneladas. Deste total, 12.534 t foram de mexilhões (*Perna perna*), 2.821 t de ostras (*Crassostrea gigas*) e 26.9 t de vieiras (*Nodipecten nodosus*) (EPAGRI, 2016). Considerando apenas a ostreicultura, os municípios que mais contribuíram para a produção total do estado, foram Florianópolis/SC, com uma produção de 1.707 t, cultivadas extensivamente em suas baías Norte e Sul, seguido pelos municípios de Palhoça/SC (586 t) e São José/SC (399 t) e de outros municípios que contribuíram para a produção total do estado. (EPAGRI, 2016).

O litoral catarinense destaca-se por possuir características geográficas propícias à produção de bivalves, dispondo de baías e enseadas protegidas de ventos e marés, combinados com o clima e temperatura favorável ao cultivo, trazendo benefícios econômicos e socioambientais (GALLON *et al.*, 2011). A elevada taxa de crescimento demográfico na ilha de Santa Catarina e adjacências, aliados a um deficiente ou inexistente sistema de tratamento de efluentes, tem causado consequências a seus ecossistemas, uma vez que as áreas de produção estão localizadas em sua maioria em ambientes costeiros, próximos às áreas de maior adensamento populacional (CAMPOS, 2004). Estes contaminantes representam misturas complexas ricas em compostos químicos, também conhecidos como xenobióticos, impondo um maior

risco aos animais expostos, bem como aos organismos cultivados destinados ao consumo humano (LÜCHMANN, 2011).

Uma das principais preocupações com a atividade da maricultura, é a balneabilidade dos ecossistemas aquáticos e os cuidados sanitários nas áreas de cultivo, onde estão situadas as “fazendas marinhas”. De uma maneira geral, a aquicultura depende fundamentalmente da sanidade do ecossistema no qual está inserida (VALENTI, 2002). O ecossistema aquático é considerado o mais susceptível à contaminação, pois se caracteriza como o receptor final de vários tipos de xenobióticos (BERTOLETTI, 1990).

O esgoto sanitário é considerado uma das principais causas da diminuição da qualidade dos ecossistemas costeiros, pois é composto de uma enorme variedade de xenobióticos, de complexa caracterização, podendo conter, grandes quantidades de matéria orgânica e contaminantes, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), metais traço, detergentes e outros compostos designados como “contaminantes emergentes”, tais como produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, entre outros (PETROVIC; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003; ABESSA *et al.*, 2005).

Entre os contaminantes emergentes, destacam-se os fármacos, inseridos no ambiente, principalmente no compartimento aquático, via excreção de pacientes domiciliares ou hospitalares nas águas residuais. Devido às suas propriedades físicas, químicas e estruturais, como persistência, lipofilicidade, resistem a vários processos de tratamento convencional de água, sendo frequentemente encontrados em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), que não possuem capacidade de remoção total destes contaminantes (MAGALHÃES, 2016).

Para dar continuidade na liderança nacional na produção quali-quantitativa de bivalves, a capital Catarinense necessita garantir uma boa qualidade das águas marinhas, visto que estes animais são filtradores, capazes de absorverem toxinas, contaminantes químicos e biológicos, e comumente são consumidos *in natura* (FOLZKE, 2008).

Os bivalves são considerados excelentes espécies sentinelas, pois tendem acumular os contaminantes do meio em que se encontram e são animais sésseis (RAINBOW, 2002). Desta forma, considerando sua importância biológica e econômica para os ambientes costeiros e estuarinos, ostras da espécie *C. gigas* foram utilizadas para avaliar os efeitos que algumas destas substâncias podem causar nestes organismos.

Neste contexto, a análise de biomarcadores bioquímicos, tais como as enzimas de defesas antioxidantes e de conjugação de xenobióticos, podem fornecer informações importantes sobre a capacidade de defesa e

biotransformação dos organismos, frente a exposição a estes compostos (BURGEOT *et al.*, 1996). A utilização de enzimas de defesa antioxidante pode indicar alterações nos organismos, uma vez que o aumento ou a inibição da atividade enzimática, podem indicar algum tipo de resposta ao estresse ambiental (COGO *et al.*, 2009).

1.1.2 Contaminantes emergentes

Os Contaminantes Emergentes integram uma crescente classe de contaminantes, encontrados nos diferentes compartimentos ambientais (água, solo e sedimento), detectados em concentrações traço (DEBLOND *et al.*, 2011; GAFFNEY *et al.*, 2013). Estes compostos podem apresentar risco ao ecossistema e não estão incluídos em programas de monitoramento, ou seja, ainda não estão estabelecidos seus limites máximos permitidos (MONTAGNER *et al.*, 2017).

De acordo com a definição proposta pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, contaminantes emergentes são poluentes (bióticos e abióticos) não incluídos em programas de monitoramento e que podem causar efeitos sobre a saúde ambiental (USEPA, 2018).

Diversos grupos de substâncias têm sido considerados contaminantes emergentes, incluindo, novos agrotóxicos, drogas ilícitas, fármacos, produtos de higiene pessoal, hormônios, surfactantes, nanomateriais, entre outros (RICHARDSON; TERNES, 2017). Entre as classes mais estudadas de emergentes, os fármacos, possuem uma maior atenção por serem continuamente liberados no ambiente aquático e frequentemente detectados em esgotos brutos e tratados, águas superficiais e em água utilizada para o abastecimento público (MONTAGNER *et al.*, 2017).

Alguns órgãos regulatórios internacionais como a União Europeia (EU), Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), Organização Mundial de Saúde (WHO) e Programa Internacional de Segurança Química (IPSC) publicaram diretrizes e leis sobre matrizes ambientais. No Brasil, a legislação em vigor é a portaria do Ministério da Saúde n° 2914/11 (padrões de potabilidade da água), a resolução CONAMA n° 357/05 (padrões de classificação de corpos de água) e a resolução CONAMA n° 430/11 (lançamento de efluentes), porém nenhuma das resoluções dispõem de valores limites sobre resíduos de fármacos (CONAMA, 2005).

No Brasil, não há registros de programas oficiais voltados para a problemática dos contaminantes emergentes, e ainda não existem dados toxicológicos suficientes para a derivação de padrões de portabilidade.

Entretanto, outros países já apresentam métodos de monitoramentos destinados a avaliar a toxicidade de certos produtos farmacêuticos, para que sejam empregados diretrizes que orientam e estabelecem níveis seguros de concentração das substâncias no meio ambiente (ARIESE; ERNST; SIJM, 2001). Em 2016, a USEPA disponibilizou uma lista contendo contaminantes prioritários, monitorados nos sistemas públicos de água, que se incluem 97 produtos químicos e 12 contaminantes biológicos. Dentre estes contaminantes, incluem o 17β -estradiol, estriol, 17α -etinilestradiol, mestranol, testosterona, além de outros produtos farmacêuticos, industriais e agrotóxicos (EPA, 2017).

A União Europeia também apresenta uma lista de 33 substâncias consideradas prioritárias pela comissão de normas de qualidade ambiental (Directive on Priority Substances), como substâncias que oferecem risco significativo para o ambiente aquático ou à saúde humana, sendo estes, tóxicos, persistentes e bioacumulativos. Dentro desta, 11 foram identificadas como substâncias perigosas e prioritárias e outras 14 substâncias foram identificadas como estando sujeitas a exame para identificação como possível “substância perigosa prioritária” (RAIMUNDO, 2011).

Os estudos sobre os efeitos ambientais causados pelos baixos, porém contínuos níveis de fármacos nos recursos hídricos, poderão auxiliar na regulamentação dos níveis seguros à saúde humana e animal, sem que prejudique o ecossistema (PETROVIC; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003).

1.1.3 Ocorrência de fármacos no ambiente

Os fármacos são substâncias químicas moderadamente solúveis em água, lipofílicos e biologicamente ativos, características, que fazem com que os fármacos sejam considerados como de potencial efeito no ecossistema aquático, comprometendo a qualidade dos mesmos (FENT *et al.*, 2006; KUMMERER, 2009).

Estes compostos têm sido detectados em esgoto doméstico, em efluentes de ETE e em Estações de Tratamento de Água (ETAs), águas superficiais e subterrâneas, em concentrações na faixa de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$ (BILA; DEZOTTI, 2003). Diversas classes terapêuticas de fármacos tem sido observada no ambiente em várias regiões do mundo e em diversas matrizes ambientais, tais como antibióticos, hormônios, anti-lipêmicos, analgésicos, anti-inflamatórios, entre outros (MELO, 2009).

Em estudos de Pereira e colaboradores (2016), ao qual analisaram águas superficiais de Santos/SP e evidenciaram pela primeira vez a

presença de fármacos e drogas ilícitas em águas marinhas no litoral do Brasil. A presença do ibuprofeno nesta água foi detectado em concentrações que variam de 326,1 a 2094,4 ng.L⁻¹. No que se refere à contaminação do sedimento no Brasil, Beretta e colaboradores (2014), detectaram o ibuprofeno na concentração de 18,8 ng.g⁻¹.

Após o consumo destes compostos farmacológicos, cerca de 50 a 90% de uma dosagem de um fármaco é excretada inalterada e a outra parte dessas substâncias são metabolizadas e excretada pelas fezes e urina (MULROY, 2001; NIKOLAOU *et al.*, 2007). Outro fato que merece ser considerado e avaliado é o significativo aporte de fármacos no ambiente devido ao descarte de medicamentos não utilizados e/ou com o prazo de validade vencidos (BILA; DEZOTTI, 2003).

Nas ETE os fármacos são tratados em conjunto com outros constituintes orgânicos e inorgânicos contidos nas águas residuais (TOURAUD *et al.*, 2011). A eficiência de sua remoção nas ETE é fortemente dependente das suas características estruturais e das propriedades físicas e químicas das moléculas de cada composto, das configurações dos sistemas de tratamento de esgoto e das condições operacionais aplicada nas unidades de tratamento (MELO, 2009). As principais formas de remoção de compostos orgânicos em estações de tratamento de efluentes envolvem processos como adsorção em sólidos suspensos, a associação com ácidos graxos e óleos, a biodegradação aeróbica e anaeróbica, a degradação química por processos de hidrólise ou nitrificação e a volatilização (RAIMUNDO, 2007). Todo este processo envolve um tratamento preliminar, primário, secundário e terciário (ANDREOLI *et al.*, 2001).

No Brasil, o esgotamento sanitário é a área do saneamento com maior déficit de atendimento. Em 2010, apenas 39,7% da população possuía atendimento adequado, 50,7% apresentou um atendimento precário e 9,6% não possuía esse atendimento (PLANSAB, 2013).

O complexo de esgotamento sanitário de Florianópolis/SC se encontra legalmente como responsabilidade da Prefeitura Municipal de Florianópolis e é exercido através de contrato de programa pela concessionária CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Saneamento) que atua em 196 municípios Catarinenses, porém o esgotamento sanitário da companhia somente está presente em 16 municípios (CASAN, 2015). Seu índice de atendimento urbano de água tratada é de 96,5% e o índice de atendimento urbano de esgoto coletado é de 19,8%, isso significa que cerca de 80% da água servida ao consumidor, tem seu descarte final irregular (sem coleta e tratamento adequado) (CASAN, 2015).

O município de Florianópolis/SC encontra-se atualmente com 7 estações de tratamento de esgoto (CASAN, 2015). Na parte central da cidade, encontra-se a ETE-insular, considerada a maior estação em operação da companhia. Nesta estação existe o uso de lodo ativado e aeração prolongada para a remoção de sólidos grosseiros, um tratamento primário para a remoção da matéria orgânica e sólidos em suspensão, um tratamento secundário para a remoção da matéria orgânica já dissolvida, e terciário, onde são tratados os compostos não biodegradáveis e tóxicos. Ainda assim, existem bairros sem coleta e tratamento de esgoto sanitário na cidade de Florianópolis, como é o caso de grande parte do Ribeirão da Ilha, Armação, Pântano do Sul e na região norte da ilha, onde a abrangência não é completa, como em Sambaqui, Santo Antônio de Lisboa, bairros onde estão localizadas as maiores produções de ostras do estado (MEDEIROS, 2016; PMISB, 2010).

O comportamento e o destino de um fármaco no ambiente são influenciados por suas propriedades físicas e químicas, tais como, a sua estrutura molecular: o tamanho molecular, hidrofobicidade, sua carga, que, em geral, apresentam uma grande diversidade de estruturas moleculares, com vários grupos funcionais e massas molares (MIRANDA, 2014). A biodisponibilidade e o destino dos fármacos no ambiente, são estimados pela hidrofobicidade do composto, determinado pelo coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}). Este parâmetro estima a lipofilicidade através da razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formado por dois solventes imiscíveis (água e octanol), indicando a tendência destes compostos se ligarem à matéria orgânica e aos sedimentos (JONES *et al.*, 2004).

Quanto mais hidrofóbico for um composto, menos solúvel será em água e maior será a sua tendência para adsorver aos meios sólidos e partículas em suspensão. Fármacos que apresentem $K_{ow} < 2,5$ são caracterizados por alta hidrofiliabilidade e baixa tendência de absorção na biomassa e nas frações lipídicas dos sólidos suspensos. Aqueles que apresentam K_{ow} entre 2,5 e 4,0, possuem uma tendência moderada de absorção e os que apresentam $K_{ow} > 4$ são altamente hidrofóbicos e tem grande potencial de serem encontrados nos sistemas de tratamento de esgoto (AQUINO; BRANDT, 2013).

Para este estudo, os fármacos selecionados foram o antineoplásico Tamoxifeno (TAM) e o anti-inflamatório ibuprofeno (IBU). No primeiro caso, a escolha se justifica pela ocorrência ambiental desta droga em concentrações em níveis de nanograma por litro (ASHTON *et al.*, 2004). O TAM é frequentemente utilizado no tratamento de pacientes com câncer de mama pelo CEPON (Centro de Pesquisas Oncológicas,

Florianópolis/SC), acarretando no efeito aditivo de uma mistura de drogas citotóxicas nos efluentes (ARNOT; GOBAS, 2006), onde eventualmente o manguezal do Itacorubi, é o sumidouro de toda essa descarga de efluentes. O TAM também é usado preventivamente em pacientes já curados desta doença, como forma preventiva para mulheres com risco elevado de desenvolver o tumor.

O IBU foi escolhido para o estudo por apresentar-se como um fármaco frequentemente detectado em águas superficiais e esgoto, por possuir uma elevada taxa de consumo pela população, também relacionada ao alto consumo do medicamento, por ser isento de prescrição médica. Além dos efeitos isolados destes fármacos, também foi avaliado os efeitos da associação das duas substâncias juntas, uma vez que são encontradas no ambiente em forma de misturas, pois a contaminação não ocorre somente por intermédio de um composto, mas sim por diversos compostos farmacológicos, aos quais podem sofrer interações, acarretando em efeitos sinérgicos, de duas ou mais substâncias, potencializando seus efeitos.

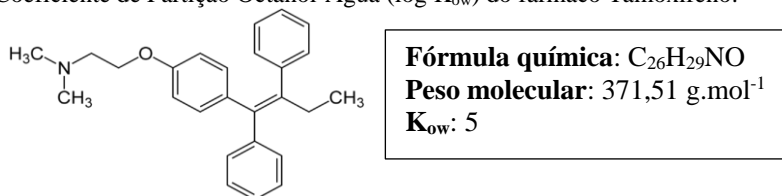
1.1.3.1 Fármaco Tamoxifeno (TAM)

O TAM é um modulador seletivo dos receptores de estrogênio (SERM- *selective estrogen receptor modulator*). Trata-se de uma das drogas antineoplásicas mais comumente prescritas no mundo, amplamente utilizada no tratamento e na quimioprevenção em mulheres de alto risco para o câncer de mama (POLIN; ASCHER, 2008). O seu uso é reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA), pois trata-se de um fármaco eficiente na terapia de determinados carcinomas mamários e que se encontra disponível no sistema público de saúde (HASKELL, 2003).

O TAM é facilmente absorvido após administração oral, atingindo os níveis plasmáticos máximos 4 a 7 horas após ingestão e sua absorção ocorre no trato gastrointestinal e a metabolização ocorre no fígado pelas enzimas do complexo citocromo P450 (MORELLO; WURZ; DEGREGORIO, 2003). Após metabolizado é excretado pela bÍlis e é eliminado através das fezes, e em pequenas quantidades na urina, ficando assim disponível no ambiente e podendo interferir no metabolismo dos organismos aquáticos (SUN *et al.*, 2007).

Alguns estudos já evidenciaram a presença do TAM no ambiente aquático em concentrações ambientais de até 212 ng.L⁻¹ e em efluentes domésticos até 740 ng.L⁻¹, possivelmente por não ter sido degradado nas ETE (ASHTON *et al.*, 2004; ROBERTS; THOMAS, 2006).

Figura 1- Estrutura química da molécula, propriedades físicas e químicas e Coeficiente de Partição Octanol-Água ($\log K_{ow}$) do fármaco Tamoxifeno.



Fonte: MATER *et al.* (2014).

Os efeitos tóxicos do TAM em organismos aquáticos, foram estudados por Sun *et al.* (2007) no desenvolvimento e reprodução de peixes *Oryzias latipes*. Resultados demonstraram que este fármaco alterou a capacidade reprodutiva, os níveis de vitelogenina em ambos os sexos e observaram alterações na histologia e no tamanho corporal da prole.

1.1.3.2 Fármaco Ibuprofeno (IBU)

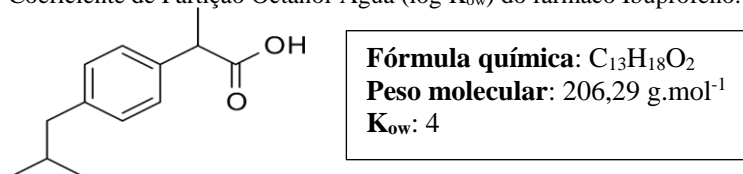
O IBU (ácido 2-[4-(2-metilpropil) fenil] propanóico), cuja sigla deriva das iniciais do ácido isobutilpropanoico-fenólico, é um fármaco do grupo dos Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINE) que constituem um grupo terapêutico de interesse, pois tem propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias. Este medicamento faz parte da lista de fármacos essenciais da Organização Mundial de Saúde (WHO), sendo uma das classes mais consumidas no mundo (OLIVEIRA; CAMPOS, 2014). É amplamente comercializado sem prescrição médica e consequentemente sua frequência de utilização está associada ao aumento de suas concentrações nos recursos hídricos (ARRUBLA *et al.*, 2016).

Os AINE formam um grupo de diversos compostos constituídos de um ou mais anéis aromáticos ligados a um grupamento ácido funcional e são considerados ácidos orgânicos fracos que atuam especialmente em tecidos inflamados (MONTEIRO, 2008). Seu mecanismo de ação está relacionado principalmente a capacidade de inibição específica das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), as principais enzimas responsáveis pela síntese das prostaglandinas, produzidas pelo corpo, causadoras da inflamação que contribuem para a percepção da dor pelo cérebro (KUMMER; COELHO, 2009).

O IBU é bem absorvido oralmente e eliminado completamente pelo metabolismo em 24 horas após sua última dose e após a administração, 70 a 80% da dose terapêutica é excretada na urina e fezes,

na forma do composto original inalterado com metabólitos (Carboxi-Ibuprofeno e o 2-Hidroxi-Ibuprofeno). Do IBU ingerido apenas cerca de 15% é excretado na forma inalterada, sendo 43% metabolizado em carboxi-Ibuprofeno e 26% em 2-Hidróxi-Ibuprofeno (PAROLINI *et al.*, 2011). Tanto o IBU não metabolizado, como seus metabólitos, possuem propriedades físicas e químicas semelhantes, caracterizando-se pela sua persistência no ambiente (ALVES, 2014).

Figura 2- Estrutura química da molécula, propriedades físicas e químicas e Coeficiente de Partição Octanol-Água ($\log K_{ow}$) do fármaco Ibuprofeno.



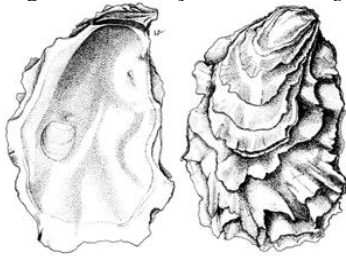
Fonte: BUSHRA; ASLAM (2010).

1.1.4 Organismo Sentinela: *Crassostrea gigas*

Estudos com biomarcadores bioquímicos em bivalves (ex.: ostras e mexilhões) como espécies sentinela, vêm sendo amplamente empregados, para avaliar os efeitos da exposição aos contaminantes (ALMEIDA *et al.*, 2007; SÁENZ *et al.*, 2010; LUCHMANN *et al.*, 2011).

Estes moluscos apresentam características favoráveis para estes estudos, pois são animais com ampla distribuição geográfica, ocorrendo em estuários e zonas costeiras, são sésseis, possuem hábitos filtradores e são espécies que possuem significativa importância econômica (BAINY *et al.*, 2000; RAINBOW, 2002; CAJARAVILLE *et al.*, 1996; ANDRADE, 2016). Dentre os bivalves, a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) uma espécie exótica, originária do leste asiático, ocupa posição de destaque, por ser o molusco marinho mais cultivado no mundo (FAO, 2016). Apresenta ampla tolerância às variações ambientais, rápido crescimento e existe muita informação disponível sobre a biologia desta espécie (MANZONI, 2001; SAAVEDRA; BACHERE, 2006).

Figura 3- Ilustração da ostra *C. gigas* e sua classificação taxonômica



Reino: Animalia
Filo: Mollusca
Classe: Bivalvia (LINNAEUS 1758)
Ordem: Ostreoida
Família: Ostreidae (RAFINESQUE 1815)
Gênero: *Crassostrea* (SACCO 1897)
Espécie: *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

Fonte: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en.

Conhecer a estrutura e a função que cada órgão desempenha no organismo é o primeiro passo para se rastrear as possíveis vias de incorporação/intoxicação, excreção/desintoxicação, bem como a ação desses contaminantes nos sistemas biológicos (GALVÃO *et al.*, 2009). Normalmente em estudos ecotoxicológicos com bivalves são analisadas as BR e a GD, por serem os principais órgãos envolvidos com a fisiologia respiratória e digestiva (SQUELLA, 2008).

As BR, além de realizarem as trocas gasosas, são responsáveis pela filtração das partículas para alimentação, sendo o órgão que estabelece o primeiro contato com o contaminante, que posteriormente é transportado para outros tecidos e para a GD, órgão envolvido na biotransformação e desintoxicação de substâncias xenobióticas (BARNES *et al.*, 2005; CARREIRA, 2011). A GD é responsável pelo processamento dos alimentos e pode acumular grandes quantidades de contaminantes (SALÁNKI *et al.*, 2002).

1.1.5 O Uso de Biomarcadores

Os xenobióticos exercem efeitos biológicos no ambiente que se traduzem em respostas fisiológicas nos organismos expostos (DEPLEDGE; FOSSI, 1994). Tais respostas biológicas podem ser utilizadas como biomarcadores.

De acordo com Walker *et al.* (1996), biomarcadores são definidos como alterações à nível celular, bioquímico, fisiológico, histológico ou comportamentais, que expressam a exposição e/ou efeito tóxico dos contaminantes sobre os organismos, mensuráveis em amostras de fluidos corporais, células e tecidos. Também podem ser medidas em um organismo inteiro, que indiquem a presença de poluentes ou a magnitude

da resposta do animal exposto (LINDE-ARIAIS *et al.*, 2006). Desta forma, diferentes biomarcadores vêm sendo utilizados em estudos de monitoramento da contaminação ambiental, com o intuito de evidenciar a exposição a xenobióticos e avaliar o risco, quando comparados a uma região referência (WHO, 1993).

Os biomarcadores podem ser subdivididos em três classes: biomarcadores de susceptibilidade, de exposição ou efeito. Os biomarcadores de susceptibilidade permitem elucidar a habilidade inerente das respostas de um organismo decorrentes da exposição aos agentes químicos ambientais. Os biomarcadores de exposição são utilizados para avaliar a exposição individual ou de um grupo, para uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna. Os biomarcadores de efeito incluem medidas mensuráveis de alterações bioquímicas e/ou fisiológicas nos tecidos ou fluidos de um determinado organismo, às quais podem ser reconhecidas em decorrência da exposição e absorção de xenobióticos (AMORIM, 2003).

Dentre os biomarcadores mais sensíveis, destacam-se as enzimas relacionadas com as defesas antioxidantes e de biotransformação de xenobióticos, cuja atividade nos organismos pode ser induzida ou inibida após sua exposição (COGO *et al.*, 2009). O processo de biotransformação pode ser definido como a conversão, catalisada por enzimas, de um composto xenobiótico em uma forma mais solúvel em água, que pode ser mais facilmente excretada do organismo (OOST *et al.*, 2003). A biotransformação pode ser dividida em 3 fases. As reações envolvidas na fase I incluem as de oxidação, redução e hidrólise. Nesta fase, geralmente um grupo polar é introduzido na molécula (ex.: um grupo hidroxila), e são mediadas por enzimas da família do Citocromo P450 (CYP) e monooxigenases. As reações de fase II são caracterizadas por reações de conjugação, realizada por enzimas transferases, sendo o produto resultante dessas reações mais hidrofílico facilitando a sua excreção (OMIECINSKI *et al.*, 2010). A fase III é constituído pelas enzimas transportadoras de membrana, tais como a glicoproteína P, responsável pela eliminação dos compostos tóxicos da célula (LUEDEKING; KOEHLER, 2004).

1.1.6 Enzimas de defesa antioxidantes, auxiliares e de conjugação

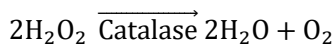
Durante a biotransformação de xenobióticos pode ocorrer um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), ocasionando um quadro de estresse oxidativo celular, refletido por um

desequilíbrio entre a produção e a remoção ou eliminação desses compostos, tais como o radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot), as quais podem causar degradação das proteínas, lipídios e danos ao DNA (WINSTON; DI GIULIO, 1991). A proteção celular contra os efeitos deletérios das EROs envolve um complexo mecanismo de defesa antioxidante composto por sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos, são cruciais para neutralizar a toxicidade das EROS, a fim de proteger as células contra os danos causados pelos mesmos, onde as principais enzimas envolvidas nestes processos incluem a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione-*S*-transferase (GST), Glutathione Peroxidase (GPx), e enzimas auxiliares Glutathione Redutase (GR) e Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PDH) (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

Alterações na atividade dessas enzimas são utilizadas como sinalizadores do estabelecimento de condições deletérias causadas pela exposição a agentes tóxicos, o que pode acarretar em aumentos ou diminuições significativas nas suas respectivas atividades, a fim de eliminar ou neutralizar esses compostos (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

1.1.6.1 Catalase (CAT)

CAT é uma hemoproteína, localizada principalmente no peroxissoma e também nas mitocôndrias, considerada como um componente primário de defesa antioxidante. Sua função catalítica está associada a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio molecular (O_2) e água (H_2O) (AEBI, 1984; HALLIWELL, 2009).



Para uma resposta eficaz contra lesões, a célula é capaz de aumentar a formação de peroxissomos para se defender desses produtos. Do sistema enzimático de defesas antioxidantes, a catalase é uma das mais importantes, juntamente com a superóxido dismutase e glutathione peroxidase (FERNANDES, 2005).

1.1.6.2 Glutathione Peroxidase (GPx)

Um importante sistema enzimático de defesa contra o aumento na formação de radicais livres na célula envolve as Glutathiones Peroxidases,

que exercem papel importante na desintoxicação de substâncias geradas pelos xenobióticos, como o peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos (TEKMAN *et al.*, 2008). O H_2O_2 é convertido a H_2O e O_2 pela Catalase nos peroxisomos e pela GPx no citoplasma e na mitocôndria que utiliza como doadora de elétrons a Glutaciona Reduzida (GSH) (HADDAD, 2002), que se transforma em Glutaciona Oxidada (GSSG), a qual não mais apresenta propriedades de proteção celular (HUBER *et al.*, 2008).

1.1.6.3 Glutaciona-S-Transferase (GST)

As GST são um grupo de enzimas com função importante na fase II de biotransformação. Pertencem a uma família multifuncional de proteínas envolvidas no processo de desintoxicação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos como drogas, herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais (COGO *et al.*, 2009). Estas enzimas representam uma família relacionada com a conjugação de uma variedade de metabólitos endógenos e exógenos (xenobióticos) tornando-os mais hidrossolúveis, e mais facilmente excretáveis pela célula (SHARMA *et al.*, 2004).

A diversidade de classes e polimorfismos das GSTs está associada às diferentes formas de atuação durante o processo de biotransformação de contaminantes e de conjugação de lipídios peroxidados (HOARAU *et al.*, 2001).

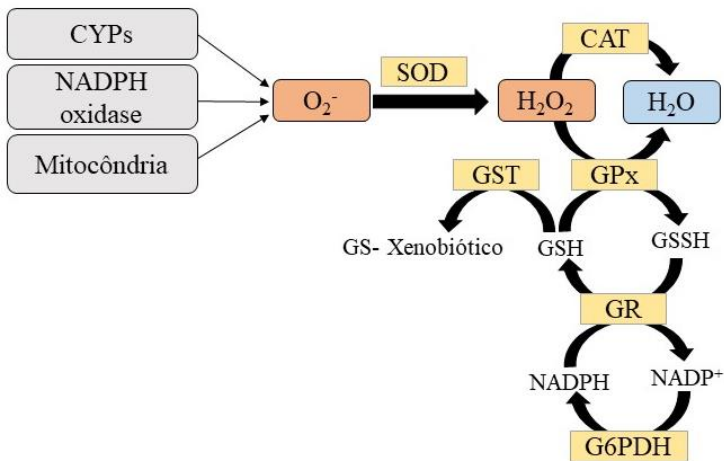
1.1.6.4 Glutaciona Redutase (GR)

Além das enzimas antioxidantes, o sistema de defesa conta com a atividade de enzimas auxiliares, como a Glutaciona Redutase, que auxiliam na manutenção do poder redutor intracelular (HERMES-LIMA *et al.*, 1998). Para a manutenção do ambiente redutor intracelular, a razão entre a Glutaciona Reduzida e Oxidada (GSH/GSSG) precisa ser mantida. Desta forma, esta enzima catalisa a redução da GSSG através da oxidação de NADPH, permitindo assim, a continua regeneração da GSH e da ação da GPx e outras enzimas dependentes de GSH (COUTO *et al.*, 2016). O NADPH é o principal nucleotídeo envolvido na proteção da célula contra os danos oxidativos (ZHANG *et al.*, 2000).

1.1.6.5 Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PDH)

A enzima Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase é considerada uma enzima antioxidante auxiliar, pois catalisa a oxidação da glicose-6 fosfato transferindo elétrons para NADP^+ formando NADPH para ser utilizado nas reações redutivas intracelulares, tais como pela GR na reciclagem de GSSG em duas GSH . Desta forma, se o fornecimento de NADPH for prejudicado, a função antioxidante da GSH também será afetada, acarretando um comprometimento do meio celular, provocando danos ao metabolismo celular (SLEKAR *et al.*, 1996).

Figura 4- Atividade das principais enzimas antioxidantes celulares e enzimas auxiliares: Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR), Glicose 6-Fosfato-Desidrogenase e Glutaciona-S-Transferase (GST).



Fonte: Figura adaptada de Bastolla, 2017.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade de enzimas de defesas antioxidantes, auxiliares e de conjugação em ostras da espécie *Crassostrea gigas*, expostas ao Tamoxifeno e Ibuprofeno e avaliar os potenciais riscos da exposição a estes fármacos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Analisar e quantificar a atividade das enzimas CAT, GPx, GR, GST e G6PDH em Brânquias e Glândula digestiva de ostras expostas por 24 e 96h a TAM;
- Analisar e quantificar a atividade das enzimas CAT, GPx, GR, GST e G6PDH em BR e GD de ostras expostas por 24 e 96h a IBU;
- Analisar e quantificar a atividade das enzimas CAT, GPx, GR, GST e G6PDH em BR e GD de ostras expostas por 24 e 96h a duas misturas dos dois fármacos (IBU e TAM);

1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO

Este documento está organizado em capítulo único, redigido sob a estrutura de artigo científico conforme os padrões da revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*, sendo apresentado como: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussões, Conclusão e Referências.

2 CAPÍTULO ÚNICO

Este capítulo está sendo preparado para publicação no periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety*. (Zootecnia/Recursos Pesqueiros- A2).

Biomarcadores bioquímicos em ostras *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793) expostas ao Ibuprofeno e Tamoxifeno

Raphaella Christine Paiva Regis¹, Clarissa Pellegrini Ferreira², Daína Lima³, Jacó Joaquim Mattos³, Tomás Bohn Pessatti⁴, Juliana Fabrício Tisca⁴, Maria João da Anunciação Franco Bebiano⁵; Afonso Celso Dias Bainy¹

¹.Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI). Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis/SC. e-mail: rafinhapaiva@hotmail.com

².Universidade do Estado de Santa Catarina/ UDESC. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

³.Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola– NEPAq- Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI). UFSC.

⁴.Programa de Pós-Graduação em Bioquímica/ UFSC.

⁵.Faculdade de Ciências do mar e do Ambiente da Universidade de Algarve/Portugal.

RESUMO

A constante descarga de contaminantes químicos no ambiente, pode acarretar efeitos adversos aos organismos. Os fármacos são considerados contaminantes emergentes liberados no ambiente aquático principalmente via esgoto sanitário. São compostos normalmente persistentes, com baixa biodegradabilidade, que podem permanecer pouco alterados após passar por processos convencionais nas estações de tratamento de esgoto (ETE). Apesar de detectados em pequenas concentrações, estes xenobióticos possuem a capacidade de bioacumular em organismos aquáticos, especialmente naqueles filtradores, como os bivalves, os quais são extensivamente cultivados nas regiões costeiras de Florianópolis/SC. No presente estudo foram avaliadas as atividades das

enzimas de defesas antioxidantes, de conjugação e auxiliares, como a Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione-S-Transferase (GST), Glutathione Redutase (GR) e Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PDH), em brânquias e glândula digestiva de ostras da espécie *Crassostrea gigas* expostas durante 24 e 96 horas ao antineoplásico Tamoxifeno (TAM 10 e 100 ng.L⁻¹), ao anti-inflamatório Ibuprofeno (IBU 10 e IBU 100 µg.L⁻¹) e a misturas contendo os dois fármacos em baixas (TAM 10 ng.L⁻¹ + IBU 10 µg.L⁻¹) e altas concentrações (TAM 100 ng.L⁻¹ + IBU 100 µg.L⁻¹). Uma maior atividade da CAT foi observada nas BR das ostras expostas ao TAM. Na GD foi verificado um aumento significativo na atividade das enzimas que participam da degradação de peróxidos, CAT e GPx, e da enzima auxiliar GR após 24h de exposição, onde a GD mostrou-se como um tecido mais responsivo à exposição a este fármaco. Não foram observadas alterações significativas nas enzimas na BR e GD dos animais expostos a IBU, com exceção da atividade da GPx na BR das ostras expostas a maior concentração (100 µg.L⁻¹). Os animais expostos às misturas dos fármacos, apresentaram apenas diferenças significativas na atividade da enzima GPx, quando analisadas nas GD expostas por 96h às maiores concentrações, representando um aumento no sistema de defesa antioxidantes para proteger as células contra os efeitos deletérios causados por esses xenobióticos.

Palavras-chave: Poluição. Fármacos. Defesa Antioxidante.

ABSTRACT

The constant discharge of contaminants into the environment can cause adverse effects to organisms. Pharmaceuticals are considered as emerging contaminants released into the aquatic environment mainly via sanitary sewage. They are normally persistent compounds with low biodegradability, which may remain slightly altered after passing through conventional processes in sewage treatment plants. Although detected in small concentrations, these xenobiotics have the ability to bioaccumulate in aquatic organisms, especially in the filtering organisms, such as bivalves, which are extensively cultivated in the coastal regions of Florianópolis / SC. In the present study, the activities of antioxidant, conjugation and auxiliary enzymes, such as Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione-S-Transferase (GST), Glutathione Reductase (GR) and Glucose-6- Phosphate dehydrogenase (G6PDH) were evaluated in gills (BR) and digestive glands (GD) of oysters *Crassostrea gigas* exposed for 24 and 96 hours to the antineoplastic Tamoxifen (TAM 10 and 100 ng.L⁻¹), to the anti-inflammatory Ibuprofen (IBU 10 µg.L⁻¹ and IBU 100 µg.L⁻¹) and to a mixture of both compounds at low (TAM 10 ng.L⁻¹ + IBU 10 µg.L⁻¹) and high concentrations (TAM 100 ng.L⁻¹ + IBU 100 µg.L⁻¹). Higher CAT activity was observed in BR of oysters exposed to TAM. In the GD, a significant increase in the activity of the enzymes involved in degradation of peroxides, CAT and GPx, and in the auxiliary enzyme GR after 24h of exposure was verified. GD showed to be the most responsive tissue after exposure to this drug. No significant changes were observed in the BR and GD enzymes of the IBU-exposed animals, except for the GPx activity in BR of the oysters exposed to the highest concentration (100 µg.L⁻¹). The animals exposed to the drug mixtures showed only significant differences in GPx in the GD of oysters exposed for 96 h at the highest concentrations, representing an increase in the antioxidant defense system to protect the cells against the deleterious effects caused by these xenobiotics.

Keywords: Pollution. Drugs. Antioxidant Defense.

2.1 INTRODUÇÃO

O lançamento de esgoto sanitário no meio hídrico, é uma das fontes mais comuns de poluição das áreas costeiras (ABESSA *et al.*, 2012). Estes efluentes apresentam uma complexa composição, que provém de várias fontes. Os contaminantes emergentes são compostos não regulamentados, encontrados em diversos compartimentos ambientais (DEBLOND *et al.*, 2011). Dentre estes contaminantes, estão os fármacos, frequentemente encontrados em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), em concentrações na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} (FENT *et al.*, 2006).

A contaminação dos ambientes aquáticos pelos fármacos ocorre principalmente via águas residuais e pelas excretas dos pacientes em tratamento (NIKOLAOU *et al.*, 2007), uma vez que nas estações de tratamento, geralmente, não são completamente degradadas (STUMPF *et al.*, 1999). Diferentes tipos de fármacos têm sido detectados no ambiente aquático, tais como anti-inflamatórios, antibióticos, analgésicos, antineoplásicos, hormônios, entre outros (FENT *et al.*, 2006).

Entre os anti-inflamatório não esteroidais (AINE) está o Ibuprofeno (IBU) integrante da lista dos fármacos essenciais da Organização Mundial de Saúde (WHO), que tem seu mecanismo de ação associado à inibição das ciclooxigenases (isoformas COX-1 e COX-2), e consequentemente biossíntese de prostaglandinas (GIERSE *et al.*, 1999). Este fármaco é rapidamente metabolizado e excretado, e consequentemente detectados em águas residuais (MIAO *et al.*, 2002). No Brasil, na baía de Santos/SP, estudos evidenciaram a presença do ibuprofeno em amostras de água do mar em concentrações que variavam de 326,1 a 2094,4 ng.L^{-1} (PEREIRA *et al.*, 2016).

Alguns trabalhos têm demonstrado que IBU pode causar efeitos tóxicos em animais expostos, como no estudo de Serrano e colaboradores, ostras *C. gigas* expostas ao IBU (0,1 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) mostraram um aumento na atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante, indicando uma possível alteração no equilíbrio redox das células.

O Tamoxifeno (TAM) é um fármaco da classe dos moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERM- *Selective Estrogen Receptor Modulator*), amplamente utilizado para o tratamento de câncer de mama, sua via de biotransformação ocorre através das enzimas do complexo citocromo P450 (CYP) (MORELLO *et al.*, 2003). Diversos estudos já relataram a presença do TAM em ambientes aquáticos, em estudos no Reino Unido, foram encontradas em concentrações ambientais de até 212 ng.L^{-1} e nos efluentes sanitários em concentrações de até 740 ng.L^{-1}

(ASHTON *et al.*, 2004; ROBERTS; THOMAS, 2006), entretanto no Brasil, ainda não há relatos.

Após sua eliminação, este composto encontra-se disponível no ambiente podendo interferir no metabolismo dos organismos aquáticos. Sun *et al.* (2007) observaram alterações histológicas, na capacidade reprodutiva, nos níveis de vitelogenina e no tamanho corporal de peixes expostos ao TAM (1, 5, 25, 125 e 625 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

O uso de organismos marinhos tem sido amplamente estudado em especial, os bivalves (REGOLI; PRINCIPATO, 1995; LUCHMANN *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2018) por possuírem características adequadas para estes estudos, como serem sésseis, hábito alimentar filtrador e sua capacidade de bioacumulação, o que torna estes animais susceptíveis aos efeitos dos contaminantes (RAINBOW, 2002). Dentre as espécies de bivalves utilizadas nesses estudos, as ostras *C. gigas* destacam-se como ótimos organismos sentinela em virtude do seu expressivo consumo e cultivo, pois são considerados um dos mais representativos no cenário da aquicultura (ZANETTE *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2008; TREVISAN *et al.*, 2012; FAO, 2016).

Uma vez detectados no ambiente, os fármacos, mesmo que em pequenas concentrações, podem causar toxicidade e danos aos organismos expostos. Assim, seus efeitos tóxicos podem ser avaliados através da análise de biomarcadores mensuráveis em diferentes níveis de organização biológica (molecular, bioquímico e/ou fisiológico) (WALKER *et al.*, 1996). Dentre estes, a atividade das enzimas antioxidantes, de biotransformação e auxiliares, tem sido amplamente utilizada como biomarcadores bioquímicos, cujas suas atividades nos organismos podem ser induzidas ou inibidas após exposição a substâncias xenobióticas. (MANDUZIO *et al.*, 2005; SOLÉ *et al.*, 1994; FABBRI; FRANZELLITTI, 2015).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de enzimas antioxidantes, de biotransformação e auxiliares em BR e GD de ostras *C. gigas* expostas por até 96h a diferentes concentrações de IBU e TAM, separadamente, ou em misturas, em condições controladas de laboratório. Através deste estudo pretende-se fornecer informações sobre os potenciais riscos de exposição destes fármacos em organismos marinhos.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes de ostras da espécie *C. gigas* (340 indivíduos), com comprimento total entre 6-8 cm, foram coletados na estação de cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM-UFSC), localizado na praia de Sambaqui, situado na baía norte de Florianópolis/SC. As ostras utilizadas nesse experimento foram provenientes de um mesmo lote e cultivadas nas mesmas condições. Após a coleta, foram transportadas em caixas térmicas, até a recepção no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica- (LABCAI/UFSC), onde foram lavadas para retirada do sedimento lodoso e dos bioincrustantes.

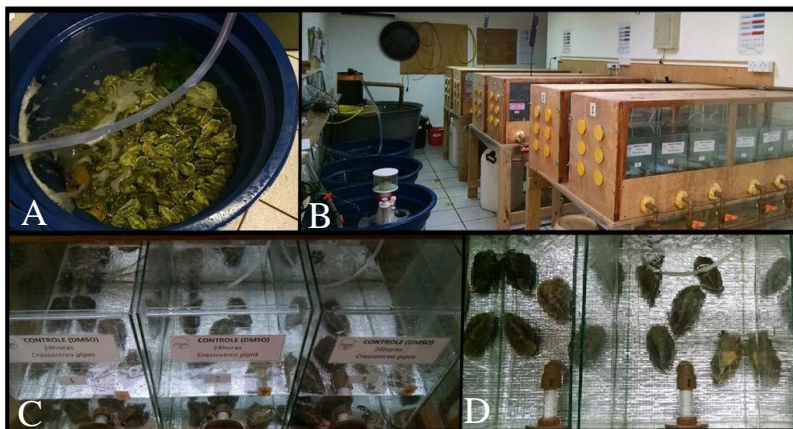
Em laboratório, os animais foram distribuídos em tanques, com um sistema de recirculação de água e aclimatados durante o período de 7 dias, nas seguintes condições: temperatura (22 °C), salinidade (30‰), pH 7,0, parâmetros semelhantes aos encontrados nos locais de onde foram cultivados/coletados.

2.2.1 Exposição das ostras *C. gigas* aos fármacos.

O experimento de exposição de *C.gigas* aos fármacos para avaliação dos biomarcadores bioquímicos, integrou o projeto de mestrado de Tomás Bohn Pessati e de doutorado de Juliana Fabrício Tisca, ambos do Programa de Pós-graduação em Bioquímica/UFSC.

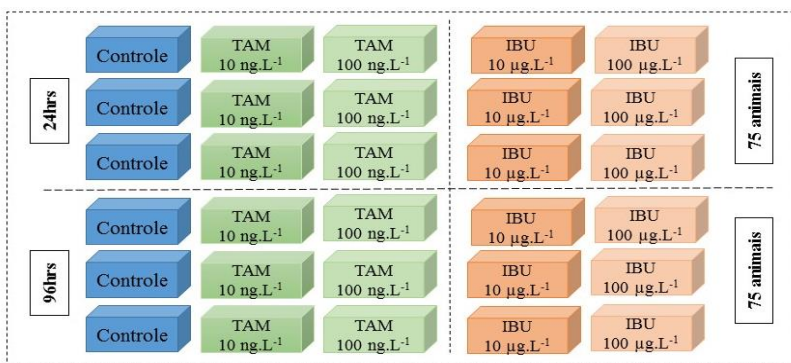
O experimento foi realizado na sala de bioensaios do LABCAI/UFSC com uma nova aclimação de 24 horas antes da exposição das ostras aos fármacos. Ao final do período de aclimação, os animais foram distribuídos em 30 aquários de vidro com volume total de 50 litros cada, que foram preenchidos com 10 litros de água do mar filtrada (5 ostras/aquário). Os aquários utilizados para cada tratamento foram mantidos dentro de estruturas de madeira hermeticamente fechadas, com aeração constante (Figura 5). Toda a água utilizada no experimento foi oriunda da estação de coleta de água do mar da UFSC, localizada no bairro da Barra da Lagoa/Florianópolis. Os fármacos utilizados nesse experimento foram adquiridos pela Sigma-Aldrich e as exposições foram realizadas em duas etapas.

Figura 5- A: Aclimação das ostras; B: Bioensaio LABCAI; C: Triplicata dos tratamentos; D: 5 ostras/aquário.



O primeiro experimento consistiu na exposição de 150 indivíduos (5 ostras/aquário) *C. gigas* ao TAM (1mL) 10 e 100 ng.L⁻¹, feita pela diluição do fármaco em Dimetilsulfóxido DMSO (1mL) e o IBU (1mL) 10 e 100 µg.L⁻¹ diluído em água ultrapura (1mL). Cada tratamento foi realizado em triplicata e utilizou-se um tratamento controle, diluído em DMSO, este sem adição dos fármacos, por um período de 24 e 96 horas de exposição para todos os tratamentos, como representado na figura 6.

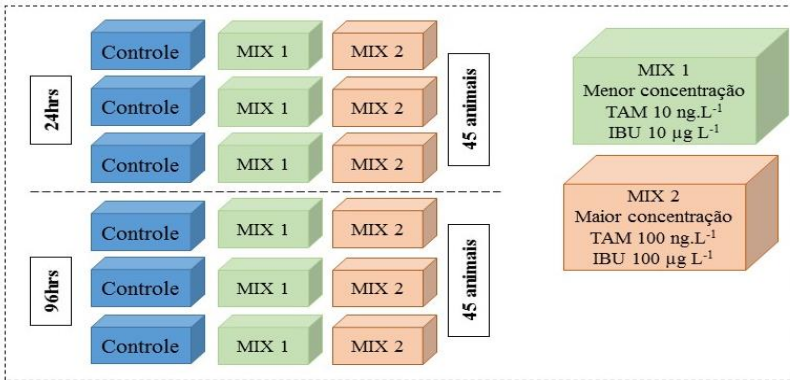
Figura 6- Delineamento experimental da exposição das ostras *C. gigas* aos fármacos isolados.



Fonte: Elaborado pela autora.

A segunda etapa do experimento consistiu na exposição de 90 indivíduos de ostras *C. gigas* utilizando 18 aquários de 50 litros, que foram preenchidos respectivamente com 10 litros de água do mar filtrada (5 ostras/aquário), contendo uma mistura dos dois fármacos, denominado “Mix 1”- TAM 10 ng.L⁻¹ + IBU 10 µg.L⁻¹ (menor concentração), e “Mix 2” TAM 100 ng.L⁻¹ + IBU 100 µg.L⁻¹ (maior concentração), diluídos respectivamente em DMSO e água ultrapura, expostas por 24 e 96 horas, como representado na figura 7.

Figura 7- Delineamento experimental da exposição das ostras *C. gigas* aos Mix.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para a alimentação das ostras durante o período de exposição, esvaziaram-se os aquários até a metade do volume (5 L) e, em seguida, era ofertado o volume total de algas (mix 50% *Isochrysis galbana* e 50% *Chaetoceros muelleri*), fornecidas a cada 36 horas. Após o período de alimentação (2 horas), os aquários eram preenchidos com o volume total (10 L), e em cada aquário eram adicionadas as concentrações correspondentes dos fármacos. Ao final do período de experimento, os resíduos líquidos eram filtrados por carvão ativado e posteriormente descartados.

Após 24 e 96 horas de exposição para todos os tratamentos, os animais foram pesados, medidos e dissecados para a retirada da brânquia e glândula digestiva, que foram devidamente acondicionadas em microtubos plásticos (2 ml), congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C para posterior realização das análises bioquímicas.

2.2.2 Processamento das amostras

Aproximadamente 100 mg de amostras de BR e GD de cada ostra foram pesadas separadamente e homogeneizadas individualmente em 500 μ l (1:5) de tampão de homogeneização, (Tris HCl 50 mM, EDTA 1 mM, sacarose 0,5 mM, KCl 0,15 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM e pH 7,6) utilizando o homogeneizador de tecidos *Tissue-Tearor*TM em gelo.

O homogenato foi centrifugado em 9.000xg por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante resultante dessa centrifugação foi armazenado em ultrafreezer a -80 °C, para posterior realização das análises bioquímicas.

2.2.3 Ensaio cinético

Para a realização das análises enzimáticas das amostras, foi utilizado o espectrofluorímetro de leitor de microplacas SpectraMax M5 e o software SoftMax e adaptações de metodologias para as enzimas.

2.2.3.1 Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi quantificada de acordo com Aebi (1984), que mede a velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através do decréscimo da absorbância a 240 nm (ϵ : 0,0436 $mM^{-1}cm^{-1}$). O ensaio foi realizado em microplaca UV-Star (Greiner), utilizando, respectivamente, 2,5 μ l de amostra de BR ou 1,0 μ l de amostra de GD, e em seguida adicionado 250 μ l do meio de reação contendo o tampão catalase (TRIS 1M, EDTA 5 mM e pH 8,0), 95 ml de água ultrapura, 12 μ L do detergente Triton e 108 μ L de peróxido de hidrogênio. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 240 nm, por 60 s a 25 °C.

2.2.3.2 Glutathiona-S-Transferase (GST)

A determinação da enzima GST foi realizada de acordo com o ensaio descrito por Keen *et al.* (1976), baseado na formação do conjugado CDNB-GSH, realizado em uma leitura a 340 nm por 5 min (ϵ : 9,6 $mM^{-1}cm^{-1}$). O ensaio foi realizado utilizando 2,5 μ l de amostra (para BR ou GD) adicionado em seguida 100 μ l o meio de reação contendo o tampão fosfato de potássio (0,1 M KPO₄, pH 7,0) e GSH (glutathiona reduzida). As amostras foram incubadas por 5 min a 25 °C. Após o período, foi adicionado 100 μ l do meio de reação contendo tampão fosfato (KPO₄) com adição de 10 mM de CDNB (0,000304 g diluído em 0,750 ml de

etanol). As leituras foram feitas em comprimento de onda de 340nm, totalizando 10 ciclos de 30 segundos, compreendendo o total de 5 min de reação.

2.2.3.3 Glutathione Redutase (GR)

A GR foi quantificada através da taxa de oxidação de NADPH para reduzir o substrato glutathione oxidada (GSSG), pelo decréscimo na absorbância no comprimento da onda a 340 nm (Carlberg e Mannervik, 1985). Foram misturados 10 μ l de amostra de sobrenadante de BR ou 5 μ l de GD, com 90 μ l de meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, EDTA 0,005 M, GSSG 2 mM, GSH 0,15 mM e NADPH 0,1 mM. As leituras foram realizadas durante 3 minutos a 25°C (ϵ : 6,22 mM⁻¹cm⁻¹).

2.2.3.4 Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade de GPx foi determinada conforme Wendel (1981), através do monitoramento da taxa de oxidação de NADPH a 340 nm, decorrentes da redução do substrato hidroperóxido de cumeno (CuOOH). Para este ensaio foram adicionados 20 μ l de sobrenadante de BR ou GD com 180 μ l do meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1M, (EDTA 0,005 M, pH 7,0, GR 0,2 U.mL⁻¹), GSH 0,1 M, NADPH 0,2 mM e água ultrapura, que foram incubadas por 5min a 30°C. Em seguida foram adicionados 10 μ l do segundo meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M e CuOOH 80% e a leitura foi realizada imediatamente a 340 nm durante 3 min (ϵ : 6,22 mM⁻¹cm⁻¹).

2.2.3.5 Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PDH)

Para a detecção da atividade da G6PDH, foi utilizada a metodologia descrita por Glock e Mclean (1953), onde a atividade foi quantificada através do aumento de absorbância a 340nm, decorrentes da redução de NADP⁺ a NADPH (ϵ : 6,22 mM⁻¹cm⁻¹). Foram misturados 5 μ l de sobrenadante de BR ou GD com 200 μ l do meio de reação composto por tampão Tris.HCL (0,1 M, pH 7,0, MgCl₂ 0,2 M, NADP⁺ 0,2 mM), e a reação foi monitorada durante 3 min a 25 °C.

2.2.3.6 Proteínas Totais

Para a quantificação de proteínas totais na fração sobrenadante de cada amostra, foi utilizada a metodologia de Bradford (BRADFORD,

1976). Esta quantificação é necessária para a realização dos cálculos das atividades específicas de todas as enzimas analisadas.

Este método, consiste na determinação de proteínas solúveis, utilizando como padrões o soro albumina bovina (BSA), realizada por meio da comparação de uma curva padrão. A solução utilizada de Bradford 20% foi diluída utilizando 100 mL do reagente Bradford Bio-Rad Dye Concentrate em 400 mL de água ultrapura, filtrada antes do uso (filtro Millipore) e acondicionado em banho Maria a 25°C durante todo o período da quantificação.

As amostras foram diluídas em microplacas de fundo “U”, em 10x para brânquia e 20x para glândula digestiva, agitadas por 10 s no espectrofluorímetro e mantidas em gelo constantemente. Em uma nova microplaca, foram pipetados em duplicata 10 µl do BSA (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 mg.mL⁻¹) e um branco (10 µl de tampão de homogeneização). Foram misturados 10 µl de sobrenadante de BR ou 5 µl de sobrenadante de GD das amostras já diluídas, em 200 µl de solução Bradford 20% em cada poço e as misturas foram incubadas por 5 min antes da leitura a 595 nm.

2.2.4 Cálculo da Cinética Enzimática

Para os cálculos da cinética enzimática, foram obtidas as médias das absorbâncias por minuto de cada amostra e a sua atividade calculada baseada a partir da fórmula:

$$\textit{Atividade} = \frac{\left(\left(\textit{Abs por } \frac{\textit{min}}{\varepsilon} \right) \times \textit{V. total} \right)}{([\textit{prot}] \times \textit{V. amostra})}$$

Onde: *Abs por min* = Δ absorbância da amostra;

ε = coeficiente de extinção molar;

V. total = volume final da reação;

V. amostra = volume de amostra;

[prot] = concentração de proteínas da amostra em mg.mL⁻¹.

2.2.5 Análise Estatística dos Dados

Todos os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados como média (± desvio padrão). Para identificar os valores *outliers*, foi

aplicado o teste de Grubbs, a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Bartlett's. Quando necessário, os valores foram normalizados utilizando a transformação logarítmica (Log_{10}). Os dados foram submetidos a uma análise de variância de uma via (ANOVA *one-way*) para cada tempo de exposição, complementado pelo pós-teste de Tukey para determinar as diferenças estatísticas entre as médias, com a finalidade de comparação entre o grupo controle e os grupos expostos aos fármacos. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* R, considerando diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Os gráficos foram confeccionados utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Respostas enzimáticas das ostras expostas ao Tamoxifeno

A atividade das enzimas de defesa antioxidantes, de conjugação e auxiliares analisadas em BR e GD de ostras expostas por 24 e 96 h ao TAM (10 e 100 ng.L^{-1}) estão representadas nas figuras 8 e 9, respectivamente.

A BR das ostras expostas por 24 h ao TAM nas concentrações de 10 e 100 ng.L^{-1} apresentaram uma maior atividade da CAT, respectivamente, de 1,9 e 1,7 vezes em relação ao controle (Figura 8). Um resultado semelhante foi observado na GD destes animais, em que a enzima CAT foi 1,6 e 1,4 vezes maior, respectivamente, nos animais expostos ao TAM nas concentrações de 10 e 100 ng.L^{-1} por 24h (Figura 9). Também observados na GD a atividade da GPx foi 1,5 e 1,7 vezes maiores nos animais expostos às mesmas concentrações de TAM, respectivamente. Neste mesmo tecido, a atividade da GR foi significativamente maior nos animais expostos por 24h a menor concentração de TAM.

Nas BR das ostras expostas ao TAM, a atividade das enzimas GST, GPx, GR e G6PDH não diferiram estatisticamente entre os grupos, independentemente dos períodos e concentrações de exposição. Também não foram observadas alterações na atividade das enzimas GST e G6PDH na GD dos animais tratados com TAM nas duas concentrações e períodos de exposição.

Figura 8- Gráficos mostrando a média (\pm DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em BR de *C. gigas* (n= 9) expostas ao Tamoxifeno (TAM) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), TAM 1 (10 ng.L⁻¹) e TAM 2 (100 ng.L⁻¹). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$).

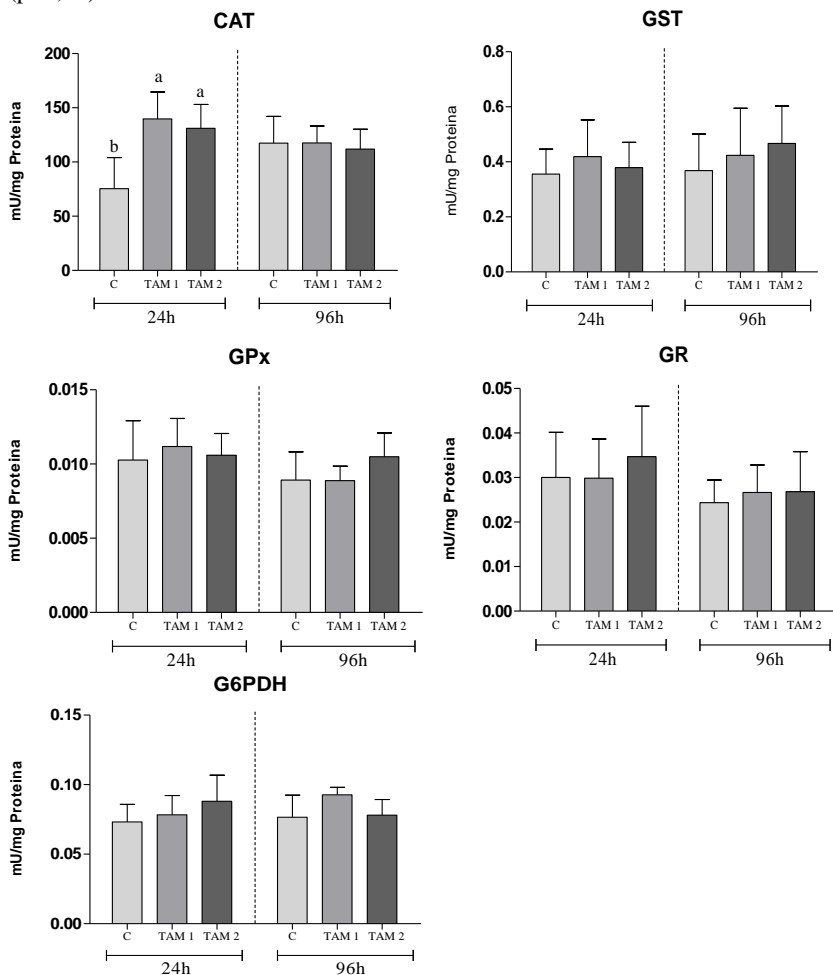
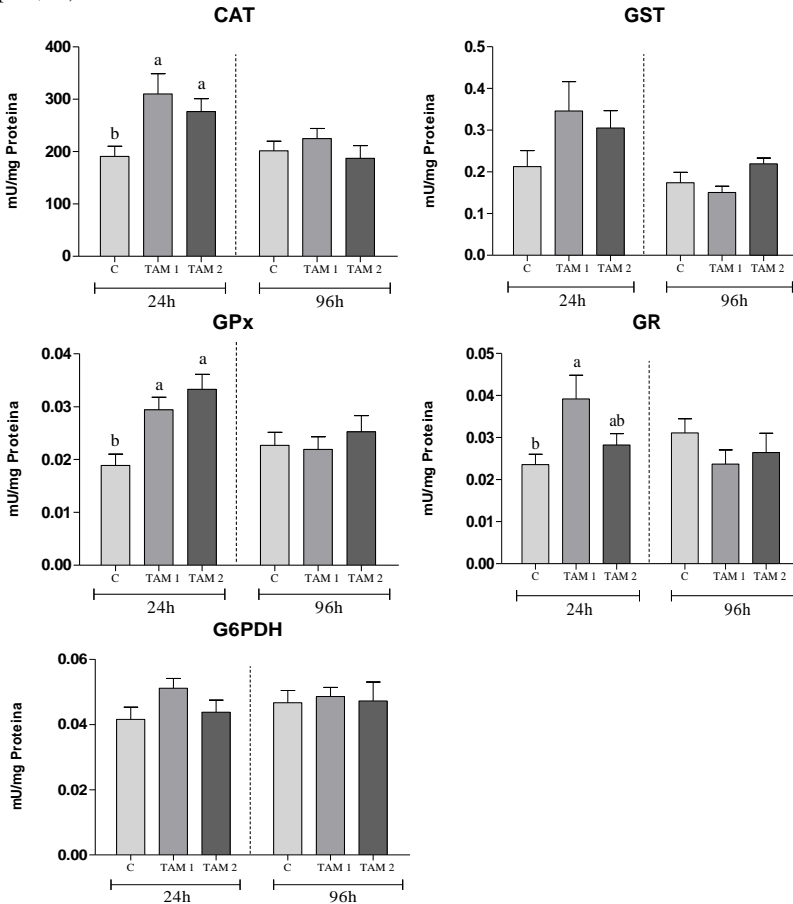


Figura 9- Gráficos mostrando a média (\pm DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutationa-S-Transferase (GST), Glutationa Peroxidase (GPx), Glutationa Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em GD de *C. gigas* (n= 9) expostas ao Tamoxifeno (TAM) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), TAM 1 (10 ng.L⁻¹) e TAM 2 (100 ng.L⁻¹). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$).



O aumento na atividade da CAT observado nas BR e GD, e a maior atividade da GPx e GR na GD nas ostras expostas por 24h a TAM evidenciam que as ostras apresentaram uma resposta de aumento, a curto

prazo, nos sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos. Tanto a CAT, como a GPx normalmente apresentam uma alta atividade catalítica em bivalves (ALMEIDA *et al.*, 2007). O aumento da atividade destas enzimas sugere uma maior necessidade de decompor os peróxidos, a fim de proteger os organismos contra uma possível situação de estresse oxidativo (LIVINGSTONE *et al.*, 1992). Estes resultados, evidenciam a interação funcional da CAT com a GPx na glândula digestiva. A CAT e GPx são enzimas presentes nas células eucarióticas, que atuam na decomposição do peróxido de hidrogênio produzido em maior quantidade durante a biotransformação. Fonseca e colaboradores (2018) também observaram um aumento de 2 vezes na atividade da CAT em poliqueta *Nereis diversicolor* expostos a quimioterápicos.

Inexistem estudos sobre os efeitos de TAM à nível de transdução de sinal em bivalves, entretanto, trabalhos realizados em células HeLa (células epiteliais de carcinoma cervical humano) mostraram que TAM ativa c-jun *N*-terminal cinase (JNK-1) e cinases reguladas extracelulares (ERK2) (DUH *et al.*, 1997). Estas cinases são capazes de ativar fatores de transcrição que modulam a transcrição de genes que codificam enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante (KEUM *et al.*, 2003). Além disso, Bekele e colaboradores, (2016) observaram que TAM induziu estresse oxidativo em células cancerígenas mamárias causando um aumento no fator-2 de transcrição relacionado a eritroide nuclear 2 (Nrf2), que ativa o elemento de resposta antioxidante (ARE). Desta forma, pode-se levantar a hipótese de que exista um mecanismo similar de ativação dos sistemas antioxidantes induzido por TAM em bivalves, o que explicaria os resultados observados a curto prazo. No período maior de exposição (96 h) estes efeitos não foram tão evidentes, possivelmente devido a capacidade de adaptação deste animal às condições pró-oxidantes.

Os efeitos tóxicos do TAM foram estudados em outros organismos aquáticos, como rotíferos, crustáceos e peixes. Quando analisados em peixes da espécie *Oryzias latipes*, Sun e colaboradores (2007), observaram alterações na capacidade reprodutiva, nos níveis de vitelogenina, na histologia e no tamanho corporal. Em crustáceos, foi observado uma inibição naupliar (ANDERSEN *et al.*, 2001).

Interessante observar que as respostas encontradas variaram de acordo com o tecido analisado. A GD apresentou maior atividade das enzimas CAT, GPx e GR e foi mais responsiva ao TAM. Isto se deve possivelmente por ser um tecido com maior capacidade de bioacumulação de substâncias mais hidrofóbicas, que é o caso deste antineoplásico.

2.3.2 Respostas enzimáticas das ostras expostas ao Ibuprofeno

A atividade das enzimas de defesa antioxidantes, de conjugação e auxiliares analisadas em BR e GD de ostras expostas por 24 e 96 h ao IBU (10 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) estão representadas nas figuras 10 e 11, respectivamente.

A GD das ostras expostas a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de IBU apresentaram uma atividade da GPx significativamente maior em relação ao grupo controle, sendo um aumento de 0,6 vezes, após 24h e 0,8 vezes após 96h de exposição. Esta maior atividade possivelmente estava associada a um aumento na produção de H_2O_2 . Por apresentarem isoformas citosólicas e mitocondriais, a GPx seria uma alternativa eficiente para manter os baixos níveis de H_2O_2 na célula, uma vez que pouca quantidade de CAT é encontrada nestes compartimentos celulares (GAGNÉ *et al.*, 2005).

Parolini e colaboradores (2011) também observaram alterações na atividade das enzimas GPx e GST, em mexilhões-zebra (*Dreissena polymorpha*) expostos a IBU (0,2, 2 e 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Estudo realizado por Gonzalez-Rey e Bebianno (2011) verificaram alterações do equilíbrio oxidativo em brânquias da espécie de mexilhão *Mytilus galloprovincialis* expostos ao IBU (250 ng.L^{-1}).

Para diminuir os níveis de H_2O_2 nas células, os sistemas de defesas antioxidantes são induzidos via Nrf2/ARE, que oferecem proteção antioxidante contra agentes tóxicos (COVAS, 2011). Em invertebrados, a ativação do gene da GPx envolve a interação do fator de transcrição Nrf2 com o elemento de resposta antioxidante (ARE) localizado na região promotora deste gene (DANIELLI, 2017). A ativação da Nrf2 é mediada pela interação de um agente oxidante e a proteína KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), localizada preferencialmente no citosol, que participa do complexo de proteínas auxiliares (DANIELLI, 2017). Em condições basais o Nrf2, encontra-se no citoplasma, inativo pela sua ancoragem à KEAP1. É possível que a exposição ao IBU promova um aumento de EROs e a KEAP1 seja dissociada da Nrf2. Neste caso, o Nrf2 poderia ativar a transcrição da GPx. A atividade em conjunto Nrf2/KEAP1 é considerada de grande importância para o estado redox intracelular, ativando a transcrição de genes citoprotetores (DINKOVA-KOSTOVA *et al.*, 2010).

Outra hipótese para explicar o aumento na atividade da GPx poderia estar relacionada a um possível acúmulo do ácido araquidônico nas células, devido a inibição da via metabólica das ciclooxigenases, promovendo o incremento na produção de H_2O_2 (SERRANO *et al.*, 2015). Em humanos a ação anti-inflamatória do Ibuprofeno baseia-se na

capacidade de promover a inibição não seletiva das isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), responsáveis por regular a biossíntese das prostaglandinas, a partir do ácido araquidônico (FENT *et al.*, 2006). Em bivalves, a atividade da COX é, também, responsável pela formação de prostaglandinas, que participam de diversos processos fisiológicos associados a reprodução, transporte de água, equilíbrio iônico e defesa química (DERIDOVICH; REUNOVA, 1992).

Para reforçar esta hipótese, a inibição da enzima COX foi observada em mexilhões de água doce *Elliptio complanata* injetados com concentrações crescentes de IBU, evidenciando a possibilidade dos efeitos inibitórios da COX em bivalves, induzida tanto nas brânquias, quanto na glândula digestiva (GAGNÉ *et al.*, 2005).

Considerando que o fármaco IBU possui uma molécula de natureza ácida e caráter lipofílico ($\log K_{ow}=4$), a ausência de diferenças significativas na atividade das enzimas antioxidantes, de conjugação e auxiliares na glândula digestiva dos animais expostos pode estar relacionada com a possível ionização do IBU em contato com a água do mar, tornando-se menos lipofílico, dificultando seu transporte através das membranas celulares, diminuindo sua capacidade de bioconcentrar nos tecidos das ostras (SERRANO *et al.*, 2015). Pode-se sugerir que as brânquias tenham atuado como uma primeira barreira contra este composto, diminuindo a entrada desta substância para outros tecidos e possivelmente diminuindo sua toxicidade ao organismo.

Figura 10- Gráficos mostrando a média (\pm DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutationa-S-Transferase (GST), Glutationa Peroxidase (GPx), Glutationa Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em BR de *C. gigas* (n= 9) expostas ao Ibuprofeno (IBU) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), IBU 1 (10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e IBU 2 (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$).

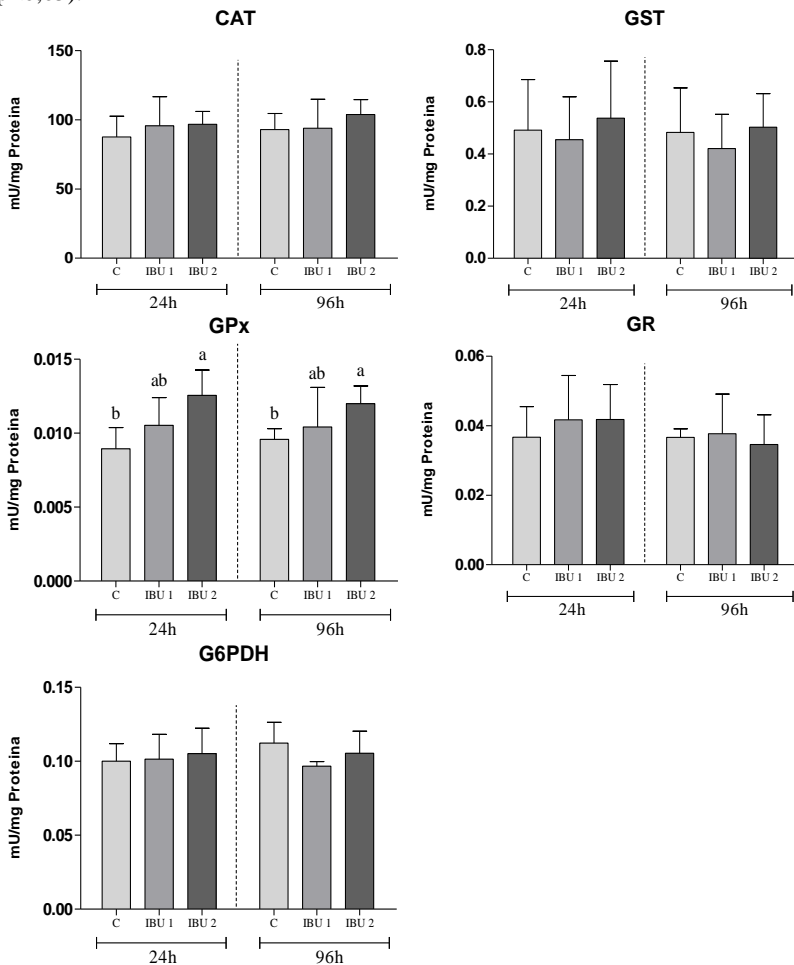
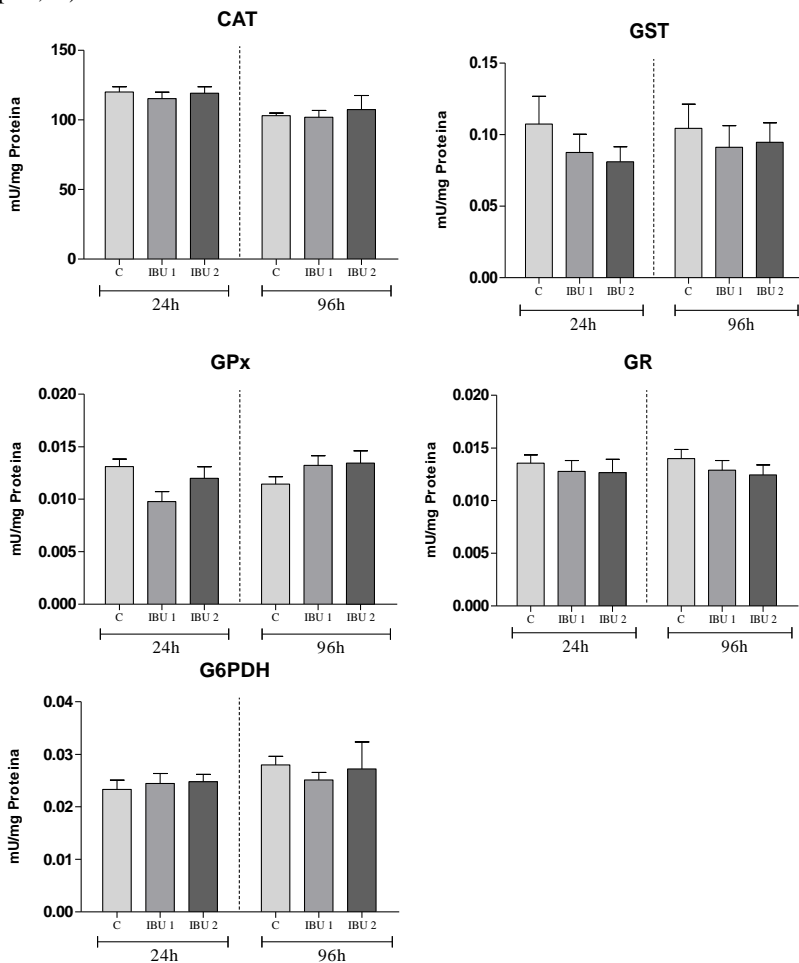


Figura 11- Gráficos mostrando a média (\pm DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em GD de *C. gigas* (n= 9) expostas ao Ibuprofeno (IBU) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), IBU 1 (10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e IBU 2 (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$).



2.3.3 Respostas enzimáticas das ostras expostas ao Mix

A atividade das enzimas analisadas em BR e GD de ostras expostas por 24 e 96 h as misturas (MIX), em diferentes concentrações, estão representadas nas figuras 12 e 13, respectivamente.

Interessante observar que algumas respostas observadas nos tecidos das ostras expostas aos compostos isolados não foram evidentes quando TAM e IBU foram administrados simultaneamente. Foram observadas alteração apenas na atividade da enzima GPx, analisada na GD das ostras expostas por 96 h, à maior concentração (Mix 2- TAM 100 ng.L⁻¹ + IBU 100 µg.L⁻¹).

A maioria dos estudos analisa a toxicidade de um único composto, entretanto, os fármacos estão normalmente presentes nos ecossistemas sob a forma de misturas complexas, em diferentes concentrações e a toxicidade dessas misturas é muito difícil de prever.

Estudos semelhantes realizados por Parolini e Binelli (2012), mostraram um aumento na atividade das enzimas GPx e GST em bivalves de água doce *Dreissena polymorpha* expostos a paracetamol em uma mistura com outros fármacos antiinflamatórios não-esteróides (diclofenaco de sódio e ibuprofeno). Sibonga e colaboradores (1998), mostraram que o IBU antagoniza a ação seletiva do TAM, bloqueando completamente os efeitos benéficos do fármaco e parcialmente dos efeitos do 17β-estradiol. Estes resultados demonstram que o IBU antagoniza as ações dos estrogênios, ao qual sugerem que a via da ciclooxigenase é importante para a cascata induzida por estrogênio. Todos estes trabalhos evidenciam a importância da realização de estudos com misturas complexas, principalmente que apresentem diferentes mecanismos de toxicidade.

Figura 12- Gráficos mostrando a média (\pm DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em BR de *C. gigas* (n= 9) expostas às misturas (MIX) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), MIX 1- menor concentração (TAM 10 ng.L⁻¹ + IBU 10 μ g.L⁻¹) e MIX 2- maior concentração (TAM 100 ng.L⁻¹ + IBU 100 μ g.L⁻¹). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$).

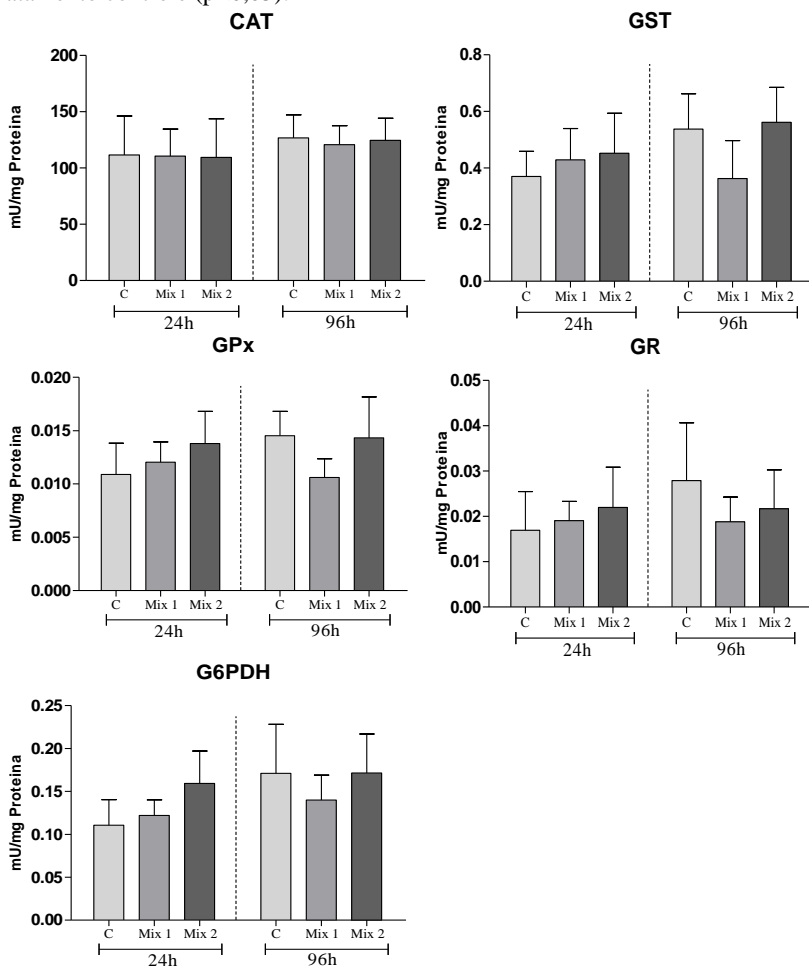
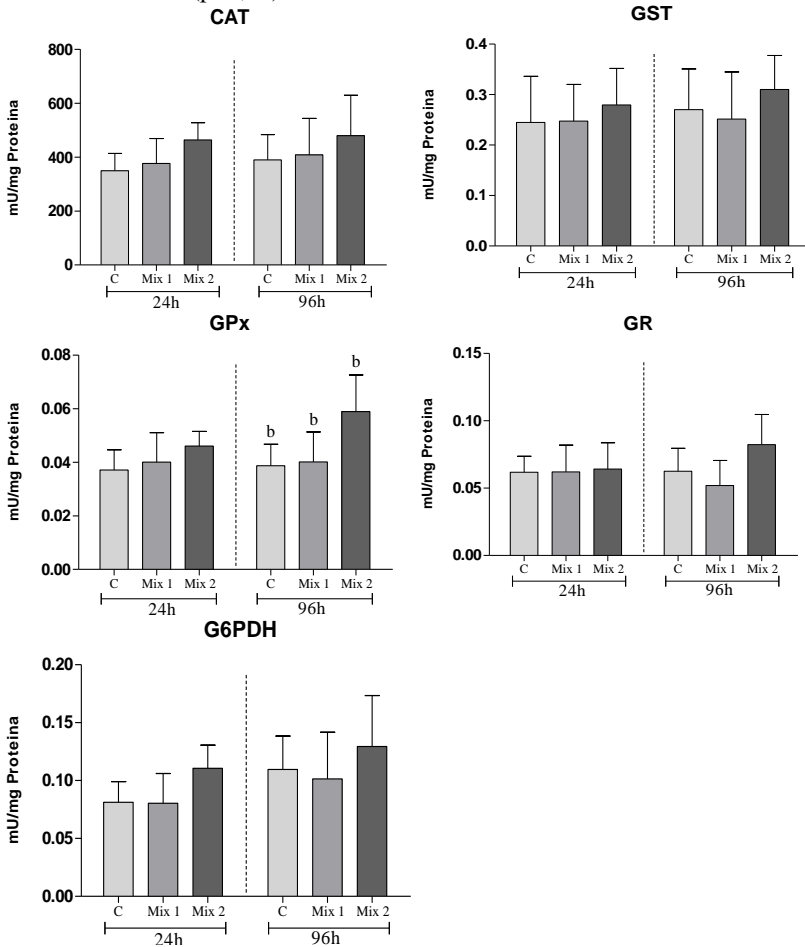


Figura 13- Gráficos mostrando a média (\pm DP) da atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR), e Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) em GD de *C. gigas* (n= 9) expostas às misturas (MIX) por 24 e 96 h: C (tratamento controle), MIX 1- menor concentração (TAM 10 ng.L⁻¹ + IBU 10 μ g.L⁻¹) e MIX 2- maior concentração (TAM 100 ng.L⁻¹ + IBU 100 μ g.L⁻¹). Os dados foram submetidos a ANOVA de uma via para cada período de exposição. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$).



2.4 CONCLUSÕES

- TAM causou um aumento na atividade da CAT nas BR e GD, e GPx e GR na GD nas ostras expostas por 24h a TAM indicando que, a curto prazo, as ostras apresentaram uma resposta nos sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos, possivelmente decorrente de uma situação pró-oxidante induzida pela exposição a este fármaco. Após 96h de exposição estes efeitos não foram evidentes.

- A brânquia das ostras expostas ao IBU apresentaram um aumento na atividade da GPx após 24 e 96h de exposição, indicando que este fármaco tenha causado um aumento na produção de peróxidos intracelulares. No entanto as demais enzimas antioxidantes, de biotransformação e auxiliares não foram alteradas pelo tratamento com este fármaco, corroborando estudos anteriores.

- Enquanto o TAM teve um efeito mais significativo a curto prazo nas enzimas analisadas na GD, o IBU afetou mais a brânquia nos dois períodos. Esta resposta pode estar associada às propriedades químicas destes fármacos no meio marinho que podem afetar sua biodisponibilidade aos organismos. Análise química dos tecidos deverão ser realizadas para confirmar esta hipótese.

- Os animais tratados com TAM e IBU apresentaram respostas distintas dos animais tratados com os compostos isolados, evidenciando a interação das drogas no metabolismo dos animais.

- Com base nos resultados obtidos não fica claro que tenha se estabelecido um quadro de estresse oxidativo nas BR e nas GD dos animais expostos a ambos fármacos.

REFERÊNCIAS ARTIGO

ABESSA, D.M.S., de Rachid, B.R.F., de Moser, G.A.O., Oliveira, A.J.F.C., 2012. **Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão.** O Mundo da Saúde 36, 643–661, 2012.

AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.

ALMEIDA, Eduardo Alves de, *et al.* Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA

damage. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p.588-600, 2007.

ANDERSEN, H. R, *et al.* Development of copepod nauplii to copepodites - A parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. **Environmental Toxicology and Chemistry**, p. 2821–2829, 2001.

ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K.V. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. **Science of the Total Environment**, v. 333, n. 1-3, p.167-184, 2004.

BEKELE, Raie T. *et al.* Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: implications for tamoxifen therapy and resistance. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-17, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

CARLBERG, I; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-90, 1985.

COVAS, Gonçalo Neff Valadares Gomes. **Regulação do factor de transcrição NRF2 pelo Peróxido de Hidrogênio em células HELA**. 90 f. Tese - Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Faculdade de Ciências, Lisboa, 2011.

DANIELLI, Naissa Maria. **INDUÇÃO DE DEFESAS ANTIOXIDANTES EM OSTRAS *Crassostrea gigas***. 99 f. Tese - Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

DEBLONDE, Tiphanie; COSSU-LEGUILLE, Carole; HARTEMANN, Philippe. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p.442-448, 2011.

DELLAGRECA, Marina *et al.* Phototransformation products of tamoxifen by sunlight in water. Toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 67, n. 10, p.1933-1939, 2007.

DERIDOVICH, I.I.; REUNOVA, O.V. Prostaglandins: reproduction control in bivalve molluscs. **Comparative Biochemistry Physiology**, 104 A: 23– 7, 1992.

DINKOVA-KOSTOVA, Albena T. *et al.* An Exceptionally Potent Inducer of Cytoprotective Enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p.33747-33755, 2010.

DUH, Jauh- Lin *et al.* Activation of signal transduction Kinases by Tamoxifen. **Pharmaceutical Research**, Vol 14, N°2, 1997.

FABBRI, Elena; FRANZELLITTI, Silvia. Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. **Environmental Toxicology And Chemistry**, v. 35, n. 4, p.799-812, 2015.

FAO. 2016. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016**. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma, 224 pp.

FENT, Karl; WESTON, Anna A.; CAMINADA, Daniel. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p.122-159, 2006.

GAGNÉ, F. *et al.* Inflammatory properties of municipal effluents to *Elliptio complanata* mussels- lack of effects from anti-inflammatory drugs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology**, v. 141, n. 4, p.332-337, 2005.

GIERSE, James K. *et al.* Kinetic basis for selective inhibition of cyclooxygenases. **Biochemical Journal**, v. 339, p. 607-614, 1999.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **The Biochemical journal**, v. 55, n. 3, p. 400–8, 1953.

- GONZALEZ-REY, Maria; BEBIANNO, Maria João. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 2, p.361-371, 2012.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p.6183–6188, 1976.
- KEUM, Y. S. *et al.* Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). **Pharmaceutical Research**. 2003.
- LIMA, Daína *et al.* Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. **Chemosphere**, v. 209, p.307-318, 2017.
- LIVINGSTONE, R. D. *et al.* Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. **Marine Biology** 112, 265-276, 1992.
- LÜCHMANN, Karim Hahn. *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.
- MANDUZIO, H.; ROCHER, B.; DURAND, F., GALAP, C., LEBOULENGER, F., **The point about oxidative stress in molluscs.** ISJ 2, 91–104, 2005.
- MEDEIROS, Igor D. *et al.* Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 3, p.362-365, 2008.
- MIAO, Xiu-sheng; KOENIG, Brenda G; METCALFE, Chris D. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.952, n. 1-2, p.139-147, 2002.

MORELLO, Karla C.; WURZ, Gregory T.; DEGREGORIO, Michael W.. Pharmacokinetics of Selective Estrogen Receptor Modulators. **Clinical Pharmacokinetics**, p. 361-372, 2003.

NIKOLAOU, Anastasia; MERIC, Sureyya; FATTA, Despo. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p.1225-1234, 2007.

RAINBOW, Philip S. Trace metals concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**. 497-507, 2002.

REGOLI, Francesco 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.

REGOLI, Francesco; PRINCIPATO, Giovanni. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 31, n. 2, p.143-164, 1995.

SERRANO, Miguel A. S. *et al.* Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p.17375-17385, 2015.

SIBONGA, Jean D.; BELL, Norman H.; TURNER, Russel T.. Evidence That Ibuprofen Antagonizes Selective Actions of Estrogen and Tamoxifen on Rat Bone. **Journal Of Bone And Mineral Research**, v. 13, n. 5, p.863-870, 1998.

SOLÉ M, Porte C, Albaiges J. Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens. **Aquatic Toxicology**. p.271-283, 1994.

STUMPF, Marcus; A TERNES, Thomas; WILKEN, Rolf-dieter. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro,

Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p.135-141, 1999.

SUN, Liwei. *et al.* Tamoxifen effects on the early life stages and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 1, p.23-29, 2007.

TREVISAN, Rafael *et al.* Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 108, p.85-93, 2012.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology: Taylor & Francis**, 321p. 1996.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, n. 1967, p.325–333, 1981.

ZANETTE, Juliano *et al.* Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 10, p.1976-1983, 2011.

REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL

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

ALMEIDA, Eduardo Alves de, *et al.* Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p.588-600, 2007.

ALVES, Liliana Andreia Gonçalves da Costa. **Avaliação da Ecotoxicidade do Ibuprofeno e seus Metabólitos usando Microalgas**. 121 f. Dissertação-Faculdade de Farmácia, Universidade de Porto, Portugal, 2014.

AMORIM, Leiliane Coelho André. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Belo Horizonte/MG, v. 6, n. 2, p.158-170, 2003.

ANDRADE, Gilberto José Pereira Onofre de. Maricultura em Santa Catarina: a cadeia produtiva gerada pelo esforço coordenado de pesquisa, extensão e desenvolvimento tecnológico. **Revista Eletrônica de Extensão**, v. 13, n. 24, p.204-217, 2016.

ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. Lodo de esgotos: tratamento e disposição final. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias), Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Belo Horizonte/UFMG, v. 6. cap. 5, p. 159-259. 2001.

AQUINO, Sérgio Francisco de; BRANDT, Emanuel Manfred Freire; CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Eng. Sanitária e ambiental** Ouro Preto/MG, v. 18, n. 3, p.187-204, 2013.

ARIESE, Freek; ERNST, Wilfried H.O; SIJM, Dick T.H.M. Natural and synthetic organic compounds in the environment—a symposium

- report. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, n. 3, p.65-80, 2001.
- ARNOT, A. Jon; GOBAS, Frank A.P.C. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. **Environmental Reviews**, v. 14, n. 4, p.257-297, 2006.
- ARRUBLA, Juan Pablo et al. Pharmaceutical and personal care products in domestic wastewater and their removal in anaerobic treatment systems: Septic tank – up flow anaerobic filter. **Ingeniería e Investigación** v. 36, p.70-78, 2016.
- AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 9-10, p.817-834, 2004.
- BAINY, A.C.D.; ALMEIDA, E.A.; MÜLLER, I.C.; VENTURA, E.C.; MEDEIROS, I.D., Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 50, p.411-416, 2000.
- BARNES, Robert D., RUPPERT Edward E., FOX, Richard S. **Zoologia dos invertebrados**. 7^o ed. Editora Roca, São Paulo. p.1145, 2005.
- BASTOLLA, Camila Lisarb Velasquez. **BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM BRÂNQUIAS DE OSTRAS *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) EXPOSTAS A DOIS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**. Monografia- Graduação em Engenharia de Aquicultura/UFSC. Florianópolis, 2017.
- BERETTA, M. *et al.* Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in marine sediments in the Todos os Santos Bay and the north coast of Salvador, Bahia, Brazil. **J Soils Sediments**, 14:1278–1286p, 2014.
- BERTOLETTI, Eduardo. Ensaio biológicos com organismos aquáticos e suas aplicações no controle da população. São Paulo: CETESB, 1990.
- BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p.523-530, ago. 2003.

BRANDT, Emanuel Manfred Freire. **Avaliação da remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em sistemas simplificados de tratamento de esgoto (reatores UASB seguidos de pós-tratamento)**. 143 f. Dissertação - Curso de Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

BUSHRA R.; ASLAM, N. An overview of clinical pharmacology of ibuprofen. **Oman Medical Journal**, 25:155-1661, 2010.

BURGEOT, T. *et al.* Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series**. v. 131, p. 125-141, 1996.

CAJARAVILLE, M. P. *et al.* In Vitro Activities in Mussel Hemocytes as Biomarkers of Environmental Quality: A Case Study in the Abra Estuary (Biscay Bay). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, artigo n° 0108, p. 253-260, 1996.

CALABRESE, Edward J.; BLAIN, Robyn B. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, v. 61, n. 1, p.73-81, 2011.

CAMPOS, Édson Telê. **A gestão territorial urbana no município de Florianópolis: uma abordagem sobre a expansão imobiliária e seus impactos ambientais**. 219 f. Dissertação - Curso de Pós-graduação em Administração, UFSC, 2004.

CANESI, L. *et al.* Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. **Chemosphere**, v. 69, n. 6, p.994-1002, 2007.

CARREIRA, Sara Neusa Monteiro de Alcântara. **Qualidade de Bivalves Estuarinos Explorados Para Consumo Potencial risco para a espécie *Ruditapes decussatus*: Um estudo de caso**. 74 f. Dissertação - Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Universidade Nova de Lisboa, 2011.

COGO, Antônio Jesus Dorighetto; SIQUEIRA, A.F.; RAMOS, A.C.; CRUZ, Z.M.A.; SILVA, A.G. **Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais**. Natureza on line, ISSN 1806-7409, vol.7, no.1, pp (37-42), 2009.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005, publicada no DOU nº 053, págs. 58-63.

CONAMA, 2005. Resolução n. 430, de 13 de maio de 2011. Publicado no DOU nº 92, pág. 89.

COUTO, Narciso; WOOD, Jennifer; BARBER, Jill. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 95, p.27-42, jun. 2016.

DEPLEDGE, M.H; FOSSE, M.C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology** 3, 161-172, 1994.

EPA 2017 (Environmental Protection Agency). Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination. Disponível em: <https://www.epa.gov/ccl>

EPAGRI - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **Síntese Informativa da Maricultura 2016**.

EPAGRI - **Síntese Informativa da Maricultura 2014**.

FAO. 2016. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016**. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma, 224 pp.

FERNANDES, F.A. The use of Biomarkers in Aquatic Toxicology Studies. **Revista Portuguesa de Zootecnia**. v 12, número 001. Portugal, 2005.

FOLZKE, Cristiane Tarouco. **Avaliação da balneabilidade de praias da ilha de Santa Catarina**. 65 f. Monografia- Curso de Curso de

Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

FONSECA, T.G. *et al.* Environmental relevant levels of the cytotoxic drug cyclophosphamide produce harmful effects in the polychaete *Nereis diversicolor*. **Science of The Total Environment**, v. 636, p.798-809, 2018.

GAFFNEY, Vanessa de Jesus *et al.* Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p.138-149, 2014.

GALLON, Alessandra Vasconcelos; NASCIMENTO, Cristiano do; PFITSCHER, Elisete Dahmer. **A gestão de cadeia produtiva de moluscos catarinense e suas limitações operacionais**. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, Paraná. v.4, n.2, 2011.

GALVÃO, Petrus Magnus Amaral. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v.13, n.2, p.59-66, 2009.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Edgar David *et al.* Metals and Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceuticals Drugs Present in Water from Madín Reservoir (Mexico) Induce Oxidative Stress in Gill, Blood, and Muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, n. 2, p.281-295, 2014.

HADDAD, John J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. **Cellular Signalling**, v. 14, n. 11, p.879-897, 2002.

HALLIWELL, Barry. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. Oxford University Press (OUP). **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p.253-265, 2009.

HASKELL, Sall. G. Selective Estrogen Receptor Modulators. **Southern Medical Journal**, v. 96, n. 5, p.469-476, 2003

HERMES-LIMA, Marcelo; STOREY, Janet M.; STOREY, Kenneth B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comparative**

Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 120, n. 3, p.437-448, 1998.

HOARAU, Pascal *et al.* Differential induction of glutathione S-transferases in the clamruditapes decussatusexposed to organic compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 3, p.523-529, 2001.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; FÁTIMA, Ângelo de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008.

IBGE 2015. Produção da Pecuária Municipal. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 36p. 2015.

JONES, O. A. H.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. N. Potential Ecological and Human Health Risks Associated With the Presence of Pharmaceutically Active Compounds in the Aquatic Environment. **Critical Reviews In Toxicology**, v. 34, n. 4, p.335-350, 2004.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 5, n. 4, 2002.

KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p.417-434, 2009.

LINDE-ARIAS, Ana Rosa *et al.* Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. **Science of The Total Environment**, v. 399, n. 1-3, p.186-192, 2008.

LIVINGSTONE, R. D. *et al.* Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. **Marine Biology** 112, 265-276, 1992.

LÜCHMANN, Karim Hahn. **Respostas bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, *crassostrea brasiliana*, exposta a diferentes contaminantes ambientais**- 166p. Tese- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFSC/ Florianópolis, 2012.

LUEDEKING, Alexander; KOEHLER, Angela. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 69, n. 1, p.1-10, 2004.

MAGALHÃES, Mauro Filipe Machado Costa de. **REMOÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS DA ÁGUA UTILIZANDO CASCAS DE CARVALHO**. 104 f. Dissertação - Mestrado em Engenharia do Ambiente, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real, 2016.

MANZONI, G. C. **Ostras: Aspectos bioecológicos e técnicas de cultivo**. 1. ed. ITAJAI: UNIVALI, 1, 30 p. 2001.

MATER, N. *et al.* In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water. **Environment International**, v. 63, p.191-200, 2014.

MEDEIROS, Elisa Pereira. **Esgotamento sanitário e sustentabilidade em meio urbano: A experiência do município de Florianópolis**. Monografia- Curso de Graduação em Ciências Econômicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MELO, Silene Alessandra Santos *et al.* Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p.188-197, 2009.

MIRANDA, Susana Isabel Marmelo. **Remoção de Fármacos de Águas Contaminadas. Avaliação de vários Substratos**. 168 f. Dissertação- Curso de Análises Químicas Ambientais, Departamento de Química, Universidade de Évora, Évora, 2014.

MONTAGNER, Cassiana C.; VIDAL, Cristiane; ACAYABA, Raphael. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 22, n. 10, p.1094-1110, 2017.

MONTEIRO, Elaine Cristina Almeida *et al.*, **Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)**. Temas de reumatologia clínica - vol. 9 - nº 2, 2008.

MOURA, Leonardo de Lima; SILVA, Ronaldo Ferreira da. Medicamentos antineoplásicos no meio ambiente: a contribuição de um hospital universitário de alta complexidade. Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 5, n. 1, p.313-333, 2016.

MULROY A. Monitoring and Analysis of Water and Wastes. **Water Environment Technology**, p. 32-36, 2001.

OLIVEIRA, Laira Lúcia Damasceno de. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**. 279 f. Tese- Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

OLIVEIRA, V. C. B.; CAMPOS, R. **Estudos de equivalência farmacêutica de comprimidos de ibuprofeno**. Cadernos da Escola de Saúde- UNIBRASIL, 11: p.56-64, 2014.

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, 2010.

OOST, Ron Van Der; BEYER, Jonny; 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.

PAROLINI, Marco; BINELLI, Andrea. Sub-lethal effects induced by a mixture of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. **Ecotoxicology**, v.221, p. 379-392, 2012.

PAROLINI, Marco; BINELLI, Andrea; PROVINI, Alfredo. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 6, p.1586-1594, 2011.

PEREIRA, C.D.S. *et al.* Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, 548–549:148– 154p, 2016.

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

PLANSAB- Plano Nacional de Saneamento Básico, 2013.

PMISB- Plano Municipal Integrado de Saneamento Básico, versão consolidada final – Prefeitura de Florianópolis, relatório n°: RL-0309-800-942-MPB-011, 2011.

POLIN, S.A; ASCHER, S.M. The effect of tamoxifen on the genital tract. **Cancer Imaging**. p.135-45, 2008.

RAIMUNDO, Cassiana Carolina Montagner. **CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUA TRATADA E SEUS MANANCIASIS: SAZONALIDADE, REMOÇÃO E ATIVIDADE ESTROGÊNICA**. 203 f. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química, Campinas/SP, 2011.

RAIMUNDO, Cassiana Carolina Montagner. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 126 f. Dissertação- Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química, Campinas/SP, 2007.

REGOLI, Francesco *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.

RICHARDSON, Susan D.; TERNES, Thomas A..Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 1, p.398-428, 2017.

ROBERTS, Paul H.; THOMAS, Kevin V.; The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluente and surface Waters of the lower

Tyne catchment. **Science of the Total Environment** v.356, p.143-153, 2006.

SAAVEDRA, Carlos; BACHÈRE, Evelyne. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p.1-14, 2006.

SÁENZ, Luis Alberto *et al.* Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p.796-804, 2010.

SALÁNKI, János *et al.* Molluscs in biological monitoring of water quality. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p.403-410, 2003.

SHARMA, Rajendra *et al.* Antioxidant Role of GlutathioneS-Transferases: Protection against Oxidant Toxicity and Regulation of Stress-Mediated Apoptosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 6, n. 2, p.289-300, 2004.

SLEKAR, Kimberly Hudak; KOSMAN, Daniel J.; CULOTTA, Valeria Cizewski. The Yeast Copper/Zinc Superoxide Dismutase and the Pentose Phosphate Pathway Play Overlapping Roles in Oxidative Stress Protection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p.28831-28836, 1996.

SQUELA, Francisco José Lagreze. **Taxas fisiológicas alimentares de crescimento da Vieira *Nodipecten nodosus* (L.1758) cultivada em ambiente com concentração de seston**. Dissertação- Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, UFSC, Brasil, 54p, 2008.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.29, p. 1715-1733. 1996.

SUN, Liwei. *et al.* Tamoxifen effects on the early life stages and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 1, p.23-29, 2007.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F.P. Metabolismo de Fármacos. In GOLAN DE, TASHIJIAN AH, ARMSTRONG EJ, ARMSTRONG

AW. Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia, 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

TEKMAN, Bilge *et al.* Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 2, p.117-121, 2008.

TOURAUD, Evelyne *et al.* Drug residues and endocrine disruptors in drinking water: Risk for humans? **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p.437-441, 2011.

VALAVANIDIS, Athanasios *et al.* Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p.178-189, 2006.

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

WHO. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles, Geneva, 1993.

WINSTON, Gary W.; DI GIULIO, Richard T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic toxicology**, p. 137-161, 1991.

ZHANG, Zhiqian; YU, Jia; STANTON, h C. A Method for Determination of Pyridine Nucleotides Using a Single Extract. **Analytical Biochemistry**, v. 285, n. 1, p.163-167, 2000.